

OZAN TEKDEMİR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019



← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**SÜT SIĞIRLARINDA GÖRÜLEN MASTİTİN ÖNLENMESİ
İÇİN KOLOFAN VE TEREBENTİN İÇEREN YENİLİKÇİ,
ORAL DOZAJ FORMLARININ HAZIRLANMASI VE İN
VİVO-İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

OZAN TEKDEMİR

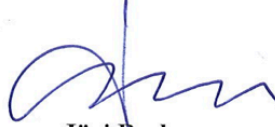
**DANIŞMAN
PROF. DR. YILDIZ ÖZSOY**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

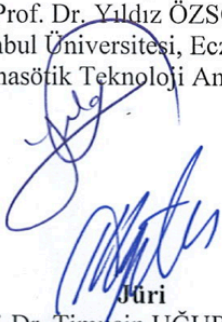
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora öğrencisi Ozan TEKDEMİR tarafından Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY 'un danışmanlığında hazırlanan SÜT SİĞİRLARINDA GÖRÜLEN MASTİTİN ÖNLENMESİ İÇİN KOLOFAN VE TEREVENTİN İÇEREN YENİLİKÇİ, ORAL DOZAJ FORMLARININ HAZIRLANMASI VE İN VİVO-İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 24/10/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı**

Prof. Dr. Ahmet Oğul ARAMAN
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri-Danışman

Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Erdal CEVHER
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Timuçin UĞURLU
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmamın kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Ozan TEKDEMİR

İTHAF

Eşime ve aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın konusunu seçmeme imkan tanıyan ve tezin her aşamasında tartışılmaz deneyimi ile her zaman destek olan, öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY**'a;

Tezimin ilerlemesinde, veteriner alandaki yapılacak tüm çalışmalarda desteğini esirgemeyen ikinci tez danışman hocam Sayın **Prof. Dr. İsmail ABAŞ**'a,

Her türlü ilgi, desteklerinden dolayı İstanbul Üniversitesi Farmasötik Teknoloji AnaBilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Ahmet Oğul ARAMAN**'a,

Tez çalışmamın konusu olan bitki analizlerinde desteklerini esirgemeyen Sayın **Prof. Dr. Murat KARTAL** hocama ve çalışmaktan büyük zevk aldığım Sayın **İlker DEMİRBOLAT**'a,

Süt analizlerinin gerçekleştirilmesinde desteklerinden dolayı Sayın **Prof. Dr. Ömür KOÇAK** hocama,

Tez konuma ait çalışmalarda formülasyonların üretiminde ekipman kullanımı ve madde tedarikinde destek olan babam Sayın **Vet. Hek. İsmail TEKDEMİR**'e,

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde ve akademik çalışmalarımda beni her zaman destekleyen Marmara Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın **Prof. Dr. Timuçin UĞURLU**'ya,

Viskozite çalışmalarının gerçekleştirilmesinde desteklerinden dolayı Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Sevinç ŞAHBAZ** hocama,

Uçucu yağ miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesinde desteklerinden dolayı Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Ali ŞEN** hocama,

DSC analizinin gerçekleşmesinde desteklerinden dolayı **Abdi İbrahim İlaç San. A.Ş. firmasına** ve ilgili çalışanlarına,

Doktora eğitimim boyunca her zaman güleryüzlü ve yardımsever yaklaşımlarıyla destek olan İstanbul Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde emeği geçen sevgili annem **Canseven TEKDEMİR** ve babam **İsmail TEKDEMİR**'e, kardeşlerim **Ceren TEKDEMİR** ve **İrem TEKDEMİR**'e,

Tezin her aşamasında moralimi yüksek tutarak beni ayağa kaldıran, biricik eşim **Hazal TEKDEMİR**'e,

Akademik hayata geçtikten sonra her zaman destek olan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesindeki hocalarıma ve arkadaşlarıma içten sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-26395

İÇİNDEKİLER

İTHAF	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET.....	XVI
ABSTRACT	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolofan ve Terebentin Hakkında	3
2.1.1. Kolofan ve Terebentin Elde Edilen <i>P. Brutia Ten.</i> 'in Özellikleri	3
2.1.1.1. <i>P.Brutia Ten</i> 'in Morfolojik Özellikleri ve Dağılımı	3
2.1.1.2. <i>P. Brutia Ten.</i> Türkiye’de Bulunan Taksonları	4
2.1.2. <i>P. Brutia Ten.</i> Ağacından Reçine Eldesi.....	4
2.1.3. Çam Reçinesinin Fizikokimyasal Özellikleri.....	6
2.1.3.1. Çam Reçinesinin Fiziksel Özellikleri.....	6
2.1.3.2. Çam Reçinesinin Fiziksel Özelliklerini Tespit Yöntemleri.....	6
2.1.3.3. Çam Reçinesinin Kimyasal Bileşenleri.....	7
2.1.4. Çam Reçinesinin Terapötik Özellikleri.....	9
2.1.4.1. Terebentin Kısımının Terapötik Özellikleri	9
2.1.4.2. Kolofan Kısımının Terapötik Özellikleri	9
2.1.5. Kolofan ve Terebentinin Oral Terapötik Dozları	10
2.1.6. Çam Reçinesinin Toksisitesi	11
2.1.6.1. Terebentinin Toksisitesi	11
2.1.6.2. Kolofanın Toksisitesi	11
2.2. Süt Sığırlarında Mastit ve Somatik Hücre Sayısı.....	12
2.2.1. Sığır Meme Anatomisi ve Fizyolojisi	12
2.2.2. Sığır Memesinde Enfeksiyonlara Karşı Savunma Mekanizmaları	13
2.2.3. Süt Sığırcılığında karşılaşılan enfeksiyöz hastalıklar	13

2.2.4. Mastit	13
2.2.4.1. Klinik Mastit.....	14
2.2.4.2. Subklinik Mastit.....	14
2.2.5. Somatik Hücre Sayısı.....	15
2.2.6. Somatik Hücre Sayısını Etkileyen Faktörler	16
2.2.6.1. Enfeksiyon Durumu	16
2.2.6.2. Enfekte Olan Meme Bölümü Sayısı.....	16
2.2.6.3. Hayvanın Yaşı.....	16
2.2.6.4. Laktasyon Dönemi	16
2.2.6.5. Mevsim	17
2.2.6.6. Doğum sayısı	17
2.2.6.7. Gün içi ve Günler Arası Varyasyonlar	17
2.2.7. Mastit tedavisi için yeni yaklaşımlar	17
2.2.8. Mastitin önlenmesi için yaklaşımlar	18
2.2.9. Mastit, Somatik Hücre Sayısı ve Süt miktarı arasındaki ilişki.....	18
2.3. Veteriner alanda kullanılan oral dozaj şekilleri.....	19
2.3.1. Tozlar	20
2.3.1.1. Toz etme yöntemleri.....	20
<i>Kesme metodu</i>	21
<i>Basınç metodu</i>	22
2.3.1.2. Tozların Karıştırılması	23
2.3.1.3. Tozların Karıştırılmasında kullanılan cihazlar	24
2.3.1.4. Toz karışımlarının hazırlanmasında karşılaşılan problemler.....	25
<i>Partikül büyüklüğünün etkisi</i>	25
<i>Partikül yoğunluğunun etkisi</i>	25
<i>Partikül şekillerinin etkisi</i>	26
2.3.1.5. Tozlarda yapılan kontroller.....	26
<i>Optik mikroskop</i>	27
2.3.2. Süspansiyonlar.....	31
<i>Floküle ve defloküle sistemler</i>	31
2.3.2.1. Süspansiyon Formülasyonlarında kullanılan maddeler.....	32
<i>Flokülasyon ajanları</i>	32
<i>Viskozite artırıcılar</i>	33

<i>Islatma ajanları</i>	34
2.3.2.2. Süspansiyon formülasyonlarında yapılan kontroller.....	35
<i>Çökme hacmi</i>	35
<i>Flokülasyon derecesi</i>	35
<i>Redispersiyon hızı</i>	35
<i>Reolojik Özelliklerin Tayini</i>	35
2.3.3. Boncuklar (Beads)	36
2.3.3.1. Aljinik asitin özellikleri ve kullanım alanları	36
2.3.3.2. Aljinat Boncuklarının hazırlanmaları.....	36
2.3.3.3. Boncuklarda yapılan kontroller.....	36
<i>Çap ölçümü</i>	36
<i>Yüklenmiş ilaç miktarı</i>	36
<i>Aşınma testi</i>	37
<i>İn vitro ilaç salımı</i>	37
2.3.4. Peletler.....	37
2.3.4.1. Peletlerde yapılan kontroller.....	38
<i>Partikül büyüklüğü dağılımı ve partikül şekli</i>	38
<i>Sertlik ve Friabilite</i>	38
<i>Dissolüsyon ve Disintegrasyon</i>	38
<i>Küresellik</i>	39
2.4. Ambalajlama	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Gereçler.....	41
3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler.....	41
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler.....	41
3.1.2.1. Kullanılan Aletler.....	41
3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler	42
3.1.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları	43
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Formülasyon çalışmaları	43
3.2.1.1. KTK'nın Toz Edilmesi ve KTK'da Yapılan Kontroller	43
<i>Toz Edilen Kolofan, Terebentin Karışımında Terebentin Miktarının Tespiti</i>	49
3.2.1.2. Süspansiyon Formülasyonlarının Hazırlanması	51

3.2.1.3. Pelet formülasyonlarının Hazırlanması	54
3.2.1.4. Boncuk formülasyonlarının Hazırlanması	55
3.2.2. Formülasyona Karar Verilme Kriterleri	59
3.2.3. Karar verilen formülasyon üzerinde yapılan kontroller	60
3.2.3.1. Partikül Şekli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	60
3.2.3.2. Hausner oranı ve % Sıkışabilirlik	61
3.2.3.3. Yığın açısı ve Akma Süresi	61
3.2.3.4. Ağırlık Sapması Testi	61
3.2.3.5. İçerik Homojenitesi Testi	61
3.2.3.6. DSC Analizi	62
3.2.3.7. Stabilite Testleri	62
Kolofan analizine ait Kromatografik Şartlar	63
Test Çözeltilisinin Hazırlanması	63
Terebentine ait Kromatografik Şartlar	63
3.2.4. Ambalajlama	64
3.2.5. İn-vivo çalışmalar	64
3.2.5.1. Sığırların seçilmesine ait kriterler	64
3.2.5.2. Rekonstitüe Süspansiyonun Uygulanması	65
3.2.5.3. Süt Numunelerinin Alınması	66
3.2.5.4. Süt Numunelerinin Analizi	68
3.2.6. Deney Sonuçlarının İstatistiksel olarak değerlendirilmesi	68
4. BULGULAR	69
4.1. KTK'nın Toz edilmesi ve Toz KTK'da Yapılan Kontroller	69
4.1.1. KTK'nın Toz Edilmesi	69
4.1.2. Toz Edilen KTK'da Yapılan Kontroller	70
4.1.2.1. KTK materyalindeki yabancı madde miktarları	70
4.1.2.2. % Sıkışabilirlik (Carr İndeksi) ve Hausner Oranı	71
4.1.2.3. Yığın Açısı ve Akma Süresi	73
4.1.2.4. Elek Analizi	73
4.1.2.5. Toz Edilen KTK'daki Terebentin Miktarı	77
4.1.3. KTK'nın DSC Analizi	78
4.2. Süspansiyon Kontrolleri	79
4.2.1. Çökme Hacmi, Flokülasyon Derecesi, Redispersiyon Hızına ait Bulgular	79

4.2.2. Reolojik Tayinlere ait Bulgular	80
4.3. Pelet Oluşturmak Amacıyla Denenen Formülasyonlara ait Bulgular	81
4.4. Sodyum Aljinat Boncuklarına ait Bulgular.....	81
4.4.1. Çap Ölçümü.....	84
4.5. Formülasyona Karar Verilmesine ait Bulgular	84
4.6. Karar Verilen F11 Formülasyonunda Yapılan Kontroller.....	85
4.6.1. F11 Formülasyonunun DSC Analizine ait Bulgular.....	85
4.6.2. Partikül Şekli, Partikül Büyüklüğü Ve Dağılımına AİT Bulgular.....	85
4.6.2.1. Optik Mikroskop ile Partikül Şekillerinin İncelenmesi.....	85
4.6.2.2. Elek Analizi ile Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının bulunması	88
4.6.3. Hausner Oranı ve % Sıkışabilirliğe ait Bulgular	91
4.6.4. Yığın Açısı Ve Akma Süresi	92
4.6.5. Ambalajlanmış F11 formülasyonunun Ağırlık Sapması Testi	94
4.6.6. Ambalajlanmış F11 Formülasyonu İçin İçerik Homojenitesi Testi.....	94
4.6.7. F11 Formülasyonunun Stabilitate Testlerine ait Bulgular	95
4.6.7.1. F11 Formülasyonunun Kolofan kısmının GC-MS analizi	95
4.6.7.2. F11 Formülasyonunun Kolofan Kısmının Kromatogramları	96
4.6.7.3. Formülasyona ait Terebentin Kısmının GC-MS Analizi	98
4.6.7.4. F11 Formülasyonunun Terebentin Kısmının Kromatogramları	103
4.7. F11 Formülasyonunun İn-Vivo Çalışmalarına ait Bulgular	105
5. TARTIŞMA	111
KAYNAKLAR	125
HAM VERİLER	133
FORMLAR.....	134
ETİK KURUL KARARI.....	135
PATENT HAKKI İZNİ.....	136
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	137
ÖZGEÇMİŞ.....	138

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Türkiye’de bulunan <i>P. Brutia</i> taksonları [13]	4
Tablo 2-2: Veteriner alanda kullanılan oral dozaj şekilleri [76]	19
Tablo 2-3: Partikül büyüklüğü tayin yöntemleri [77]	26
Tablo 2-4: Bazı elek boyutlarının Amerikan ve Avrupa Farmakopelerindeki Elek numaraları [87]	28
Tablo 2-5 : Partikül büyüklüğü tanımlanmasında kullanılan $Q_r(X)$ değerinde r nin tanımladığı dağılım tipleri [87]	29
Tablo 2-6 : Tozların partikül büyüklüğüne göre sınıflandırılması	29
Tablo 2-7: Avrupa Farmakopesi % Sıkışabilirlik Sonuçlarına göre Akıcılık Dereceleri [87]	30
Tablo 2-8: Avrupa Farmakopesi Yığın Açılı Karşılığına Gelen Akış Özellikleri [87]	31
Tablo 3-9: Hazırlanan süspansiyon formülasyonları.....	52
Tablo 3-10: Hazırlanan Pelet formülasyonları.....	55
Tablo 3-11: Hazırlanan Boncuk formülasyonları.....	56
Tablo 3-12: Deneye dahil edilen sığırlara ait özellikler tablosu	65
Tablo 4-13: KTK materyalinin 1 mm elekten geçirilmeden önce yabancı madde miktarları	71
Tablo 4-14: KTK materyalinin 1 mm elekten geçirildikten sonraki yabancı madde miktarları	71
Tablo 4-15: Toz KTK’ya ait küme, Sıkışmış Dansite, Housner Oranı ve % Sıkışabilirlik Değerleri.....	72
Tablo 4-16: 25 g Toz KTK numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi	74
Tablo 4-17: 50 g Toz KTK numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi yüzde miktarları.....	75
Tablo 4-18 : Toz edilen KTK’ya Ait Elek Analizi.....	76
Tablo 4-19: başlangıç toz KTK’da bulunan terebentinin tespiti.....	77
Tablo 4-20: Altıncı ay toz KTK’da bulunan terebentinin tespiti	78
Tablo 4-21: Student t testi ile başlangıç ve altıncı ay sonuçlarının karşılaştırılması	78
Tablo 4-22: Hazırlanan süspansiyon ve rekonstitüe süspansiyon formülasyonlara ait süspansiyon kontrollerine ait veriler.....	79
Tablo 4-23: F10 Formülasyonu İçin Viskozite Tayini	80
Tablo 4-24: F11 Formülasyonu İçin Viskozite Tayini	80
Tablo 4-25: F12 Formülasyonu İçin Viskozite Tayini	80
Tablo 4-26: F12 formülasyonunun artan hıza karşı viskozite ve tork değişimi.....	81
Tablo 4-27: Çalışılan formülasyonlar ve küresel formüllerin partikül boyutları...84	
Tablo 4-28 : Hazırlanacak formülasyonlara ait avantaj, dezavantaj tablosu.....	84
Tablo 4-29: 25 g F11 formülasyon numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi.....	89
Tablo 4-30 : 50 g F11 formülasyon numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi.....	89
Tablo 4-31: F11 formülasyonuna ait elek analizi sonuçları.....	90
Tablo 4-32: F11 formülasyonu numunesine ait küme, sıkışmış dansite, housner oranı ve % Sıkışabilirlik değerleri.....	92

Tablo 4-33 : F11 numunesine ait yığın açıları.....	93
Tablo 4-34: F11 formülasyonu için ağırlık sapması testine ait bulgular.....	94
Tablo 4-35: İçerik homojenitesi testine ait bulgular.....	94
Tablo 4-36: F11 formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan'ın başlangıç yüzde miktarları.....	95
Tablo 4-37 : F11 Formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan'ın 1.Ay yüzde miktarları.....	95
Tablo 4-38: F11 Formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan'ın 3.Ay yüzde miktarları.....	96
Tablo 4-39: : F11 Formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan'ın 6.Ay yüzde miktarları.....	96
Tablo 4-40: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in başlangıç yüzde miktarları.....	99
Tablo 4-41: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in 1. Ay yüzde miktarları.....	100
Tablo 4-42: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in 3. Ay yüzde miktarları.....	101
Tablo 4-43: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in 6. Ay yüzde miktarları.....	102
Tablo 4-44: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlardaki somatik hücre sayılarının hafta bazında istatistiksel karşılaştırılması.....	106
Tablo 4-45: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlarda ölçülen süt yağı miktarlarının hafta bazında istatistiksel karşılaştırılması.....	108
Tablo 4-46: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlarda ölçülen süt proteini miktarlarının hafta bazında istatistiksel karşılaştırılması.....	109
Tablo 4-47: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlarda ölçülen süt miktarlarının (litre) istatistiksel karşılaştırılması.....	110

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>Pinus Brutia</i> (Kızılçam) yetiştiği bölgeler [11] kaynağından değiştirilerek	3
Şekil 2-2: Reçinenin eldesi [15]	4
Şekil 2-3: Reçine elde etme yöntemleri [18]	6
Şekil 2-4: Isı Akış Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı Çalışma Şeması [25] kaynağından değiştirilerek	7
Şekil 2-5: Monoterpenler Bhojvaid[26]'ten değiştirilerek	8
Şekil 2-6: Reçine Asitleri Bhojvaid[26]'ten değiştirilerek	8
Şekil 2-7 : Memenin grafik gösterimi Nickerson[57]'dan değiştirilerek	12
Şekil 2-8: Süt verilimi, sağılan gün sayısı ve SHS arasındaki ilişkiyi gösteren grafik [62] kaynağından Türkçeleştirilerek	18
Şekil 2-9 : Kesme metoduna göre boyut küçültme aralığı [78] kaynağından	22
Şekil 2-10 : Kesme Değirmeni (a) [78] , (b) [79] kaynağından	22
Şekil 2-11: Çekiç Değirmeni (a) [78] kaynağından (b) [80] kaynağından	23
Şekil 2-12: Çekiç değirmeni ile partikül küçültme metoduna göre partikül boyut aralığı [81] kaynağından	23
Şekil 2-13 : Kullanılan karıştırıcı tipleri	25
Şekil 2-14 :Defloküle süspansiyon ve floküle süspansiyon [88]	32
Şekil 2-15 : Metil Selüloz molekül şekli [92]	33
Şekil 2-16 : Sodyum Karboksi Metil Selüloz molekül şekli [92]	34
Şekil 3-17: Sıkıştırma cihazında F11 formülasyonuna ait ilk hacim	45
Şekil 3-18: Toz örnekleri için toz vuruş cihazı [87]	46
Şekil 3-19: Toz drog formülasyonundan terebentin eldesi	50
Şekil 3-20: Boncuk hazırlanmasına ait şema	58
Şekil 3-21: ICH Q1A-Q1F Stabilite testleri [121]	62
Şekil 3-22: Rekonstitüe formülasyonların zapturapt altında içirilmesi	66
Şekil 3-23: Süt numunesi almak için kullanılan system [122]	67
Şekil 4-24: KTK materyalini toz edilmesi için yapılan işlemlere ait akış şeması	70
Şekil 4-25: Toz KTK numunelerine ait son nokta tespitinde kümülatif yüzde sıklık partikül büyüklüğü dağılımı	73
Şekil 4-26 : 25 g Toz KTK numunesine ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları	74
Şekil 4-27 : 50 g Toz KTK ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları	75
Şekil 4-28: Toz edilen KTK numunesine ait elek analizi yüzde partikül miktarları	76
Şekil 4-29 : Toz KTK partikül büyüklüğü dağılımı yarı logaritmik	77
Şekil 4-30: Toz KTK'nın DSC analizi	78
Şekil 4-31: Boncuk formüllerine ait farklı formülasyonlara ait fotoğraflar	83
Şekil 4-32: F11 formülasyonunun DSC analizi	85
Şekil 4-33: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (400 μm)	86
Şekil 4-34: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (200 μm)	86
Şekil 4-35: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (100 μm)	87
Şekil 4-36: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (50 μm)	87

Şekil 4-37: F11 numunelerine ait son nokta tespitinde yüzde kümülatif partikül büyüklüğü dağılımı	88
Şekil 4-38: 25 g F11 formülasyonuna ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları	89
Şekil 4-39 : 50 g F11 formülasyonuna ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları	90
Şekil 4-40 : F11 Formülasyon numunelerine ait elek analizi sonucu	91
Şekil 4-41 :F11 Formülasyonuna ait Yüzde Kümülatif Partikül Büyüklüğü Dağılımı (Yarı Logaritmik).....	91
Şekil 4-42: F11 formülasyonunda yığın açısı tayini	93
Şekil 4-43: F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının stabilite başlangıç kromatografisi	97
Şekil 4-44 : F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının 1'nci Ay Kromatografisi ...	97
Şekil 4-45 : F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının 3'ncü Ay Kromatografisi ..	98
Şekil 4-46 : F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının 6'ncı Ay Kromatografisi ...	98
Şekil 4-47: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının stabilite başlangıç kromatografisi	103
Şekil 4-48: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının 1. Ay Kromatografisi ...	103
Şekil 4-49: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının 3. Ay Kromatografisi ...	104
Şekil 4-50: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının 6. Ay Kromatografisi ...	104
Şekil 4-51 : Deney ve kontrol gruplarına ait haftalık somatik hücre sayısı değişimi	106
Şekil 4-52: Haftalık Logaritmik SHS deney ve kontrol grununa ait değerleri	107
Şekil 4-53: Süt yağı yüzde miktarlarının deney ve kontrol grubuna ait haftalık değerleri	108
Şekil 4-54: Süt proteini yüzde miktarlarının deney ve kontrol grubuna ait haftalık değerleri	109
Şekil 4-55: Haftalık süt miktarlarının deney ve kontrol gurubuna ait değerleri ..	110

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

IM: Intra Muskuler

SHS: Somatik Hücre Sayısı

P. Brutia Ten. : *Pinus Brutia* Tenore

Subps. : subspecies

AF: Avrupa Farmakopesi

T_g: Camsı geçiş sıcaklığı

DSC: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

DMA: Diferansiyel Mekanik Analiz

Mo: Mikroorganizma

LDH : Laktat dehidrojenaz

EP: Avrupa Farmakopesi

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E. coli : *Eschericia coli*

C. albicans: *Candida albicans*

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

KTk: Kolofan, Terebentin Karışımı

SD: Standart Sapma

CMC: Karboksi Metil Selüloz Sodyum

TMR: Total Mixed Ration (Toplam Karıştırılmış Rasyon)

ÖZET

Tekdemir, O. (2019). Süt sığırlarında görülen mastitin önlenmesi için kolofan ve terebentin içeren yenilikçi, oral dozaj formlarının hazırlanması ve in vivo-in vitro değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

Bu çalışmanın amacı süt sığırlarında sıklıkla görülen mastit hastalığına karşı önleyici, yenilikçi, etken madde olarak kolofan ve terebentin içeren, hayvanların kabul edebileceği, uygulama sırasında birim doz doğruluğundan emin olanacak dozaj formu tasarlamaktır. Bu amaçla seçilen kolofan'ın antibakteriyal ve terebentinin antibakteriyal, antifungal özellikleri daha önce in vitro ortamda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu doğal kaynaklı maddelerin süt sığırlarında sıklıkla görülen mastitten koruma amacıyla kullanılması düşünülmüştür. Kolofon ve terebentin içeriği toz edilmiş drog içerisinde sırasıyla $96,5 \pm 0,3$ ve $3,5 \pm 0,3$ oranlarında bulunmaktadır.

Süt sığırlarında yapılacak deneme için belirlenecek formülasyon, uygulama kolaylığı, birim doz doğruluğu, stabilite, depolama, birim maliyet kriterleri göz önünde bulundurularak geliştirilmiştir. Ön-formülasyon çalışmaları boncuk, pellet, süspansiyon ve rekonstitüe süspansiyon şekilleri üzerinde yapılmış ve in-vivo denemede kullanılacak formülasyon diğer formülasyonlarda görülebilecek stabilite problemleri nedeniyle rekonstitüe süspansiyon seçilmiştir. Süspansiyon ve rekonstitüe süspansiyon için çökme hacmi, flokülasyon derecesi, redisperisyon süresi ve çevirme sayısı testleri yapılarak en uygun formüle karar verilmiştir. Karar verilen toz formuna elek analizi, yığın açısı ve akma süresi, % sıkışabilirlik ve Hausner oranı, DSC analizi yapılmıştır. Aynı formül süspande hale getirildikten sonra da yukarıda belirtilen süspansiyon kontrolleri uygulanmış ve viskozite tayini yapılmıştır.

Denemelerde kullanılacak formülasyon $40^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ sıcaklık ve 75 ± 5 rölatif nemde stabilite kabine bırakılmış ve hazırlanan formülasyonun stabilitesine 1-3-6 aylarda alınan örnekler gaz kromatografi cihazında stabilitesi incelenmiştir.

İn vivo hayvan deneyleri 15'erli iki grup Holstein ırkı süt sığırı arasında (deney, kontrol) gerçekleştirilmiştir. Haftalık alınan süt numunelerine göre mastit belirtici olan somatik hücre sayılarına, haftalık süt miktarına, süt yağı ve süt proteini miktarlarına bakılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Formülasyonun uygulandığı dönemde deney grubunda kontrol grubuna göre süt miktarında (≈ 1 L/sığır), süt yağında ($\approx 0,3$ %) artış ve somatik hücre sayısında (≈ 40.000 hücre/sığır) düşüş görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Sığırlarda görülen mastit, Kolofan, Terebentin, Mastitin önlenmesi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-26395

ABSTRACT

Tekdemir,O. (2019) Developing innovative oral dosage form which have Colophony and Turpentine as active ingredients and evaluation of in-vitro and in-vivo. İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Technology Department. Doctoral Thesis. İstanbul. 2019.

Aim of this study was to develop an innovative oral dosage form containing colophane and turpentine as an active ingredient that can be accepted by animals and which will ensure the accuracy of unit dosage during administration. For these purposes colophony which has antibacterial and turpentine which has antibacterial, antifungal effects have a potential that is researched in vitro previously. These herbal ingredients was suggested to use for prevention of mastitis in dairy cattle. Powdered herbal material have colophony and turpentine %96,5 $\pm$ 0,3 and %3,5 $\pm$ 0,3 respectively.

The formulation to be determined for the experiment in dairy cattle was developed considering the ease of application, unit dose accuracy, stability, storage and unit cost criteria. Pre-formulation studies were performed on beads, pellet, suspension and reconstituted suspension forms and the formulation to be used in the in vivo assay was selected as a reconstituted suspension due to the stability problems that may be encountered in other formulations. For the suspension and reconstituted suspension, sedimentation volume, flocculation degree, redispersion time and number of turns were determined and the most appropriate formula was determined. Sieve analysis, angle of repose and flowing time, % compressibility and Hausner ratio, DSC analysis were performed to the determined powder form. After suspending the same formula, the above-mentioned suspension controls were applied and the viscosity was determined.

A formulation which was decided for using in animal assay was tested at 40° C $\pm$ 2° C and 75 $\pm$ 5 relative humidity in stability chamber and sampled, analysed in gas chromatography at 1-3-6th months.

In vivo animal experiments were performed between two groups (experiment, control) and each group contains 15 Holstein breed cattle. According to the milk samples taken weekly, the number of somatic cells which are the markers of mastitis, weekly milk amount, milk fat and milk protein amounts were examined. No statistically significant results were obtained. In the experimental period, the amount of milk ($\cong$ 1 L / cattle), milk fat ($\cong$ 0.3%) increased and somatic cell number ($\cong$ 40.000 cells / cattle) decreased in the experimental group.

Key Words: Bovine mastitis, Colophony, Turpentine, Prevention of mastitis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.
Project No: TDK-2018-26395

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mastit hastalığı süt sığırlarında görülen memedeki süt salgı bezlerinin iltihabıdır [1]. Mastitin en büyük sebebi meme içi enfeksiyonlardır [2]. Mastit süt sığırları için her zaman önemli bir hastalık olmuştur ve mastit hayvan refahına ve çiftlik karlılıklarına negatif etki etmektedir [3]. Mastit ayrıca tüm dünyada süt sığırlarında en çok rastlanılan ve en çok maliyet oluşturan hastalıktır. Mastit süt kaybına, süt kalitesinin düşmesine, ölümlere ve meme körleşmesine giden sonuçlara sebep olmaktadır [1]. En sık rastlanılan mastit patojenleri bakterilerdir. Bunlar İngiltere’de yapılan bir çalışmada *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* olarak tespit edilmişlerdir [4].

Mastitten korunmak için sağım öncesi ve sağım sonrası antiseptik uygulama, süt sağım ekipmanlarının düzenli bakım ve temizliği, mastit patojenlerine çevresel maruziyeti kontrol etme, hayvanda stres oluşturabilecek çevresel etmenleri yönetme ve mevcut patojenlere karşı aşılama gibi içerikleri bulunduran koruyucu bir program oluşturmak en iyi yöntemdir. Bu koruyucu etmenlerin etkinliği kanıtlanmasına rağmen bu etmenlerin tamamının uygulanması halinde de meme içi enfeksiyonlar ortaya çıkacaktır ve bu durum mastitin tedavisi için düzgün bir şekilde yönetilmelidir.

Bir kez enfeksiyon yerleştiğinde, ilk işlem enfeksiyonun enfekte inekten giderilmesi ve mümkünse çiftlikteki diğer ineklerin enfeksiyondan korunmasıdır. Enfeksiyonun giderilmesinde seçenekler enfekte olmuş hayvanın sürüden ayrılması, laktasyon döneminde antibiyotikler ile tedavi edilmesi, kuru dönemin başında antibiyotikler ile tedavi edilmesi ve tedavinin başarılı olması için destekleyici bakım yapılması ve enfeksiyonun yönetilmesidir [5].

Mastit tedavisi tedavi olan hayvanı tekrar süt üretimine kazandırabiliyor olsa da tedavi sırasında süte geçen antibiyotiklerin kullanımı ve süt yapısının bozulması sebebiyle mastitli inekten alınan sütler insan kullanımına sunulamamaktadır. Tedavinin ardından da mastit geçiren ineğin eski günlük süt verimine ulaşması zaman almakta veya süt salgı dokularında oluşan kalıcı hasar varsa eski süt verilerine ulaşamamakta ve hatta meme körleşmesi oluştuğunda körleşmiş memeden bir daha süt alınamamaktadır.

Diğer bir yandan antibiyotik kullanımının tedavi protokolünde daha çok tercih edilmesi ve giderek daha güçlü antibiyotiklerin hayvancılık sektöründe kullanılması, insanlık için dirençli bakterilerin oluşması yönünden büyük tehlike arz etmektedir. Çiftliklerden alınan atık su numunelerinde dirençli bakterilere ait gen dizilerinin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [6, 7].

Tüm bu sebeplerden dolayı mastit hastalığının oluştuktan sonra tedavisinden oluşumunun önlenmesi inek sütü üretim endüstrisi ve insan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Mastit hastalığının önlenmesi için koruyucu önlemler ve çeşitli antibiyotik dışı yaklaşımlar denenmiştir. Vitamin E ve selenyum, bakır, çinko gibi iz minerallerin eksikliğinde oluşabilen meme dokusundaki problemleri önlemek için bu maddelerin beslenme rejimine eklenmesi ya da IM uygulamalar ile eksikliğin giderilerek daha iyi

bir bağışıklık sistemi oluşturulması hedeflenmiştir [8]. Bir başka yaklaşım ise *Lactococcus lactis* tarafından üretilen, in vitroda Streptokok ve Stafilokok bakterilerine karşı bakterisidal etki gösteren Lacticin 3147 etken maddesi üretilerek bu etken maddeyi içeren meme içi uygulanan tüpler hazırlanmıştır. Kuru dönemde yapılan çalışmada hayvanlarda mastit görülme sıklığı azaltılmıştır [9].

Mastit hastalığı özellikle büyük çiftliklerde görülmektedir. Mastit görülme sıklığının süt verimliliği ile korelasyonunun bulunması bunun en büyük nedenidir [10]. Ayrıca sağım öncesi ve sonrası temizlik prosedürlerine dikkat edilmemesi, sağım cihazı ve sağımda görevli işçiler vasıtasıyla oluşan kontaminasyon mastit görülme riskini de artırmaktadır. Tüm bu riskler ışığında hayvanlara kolay uygulanabilecek yukarıda örnekleri verilen desteklerin bulunması önemlidir. Bu destekler mastit hastalığının tamamen eradikasyonunu sağlamasa da görülme sıklığını azaltması doğrudan çiftlik karlılığı ve dolaylı olarak insan sağlığı açısından önemlidir.

Mastit hastalığının görülme sıklığının azaltılması için yapılacak uygulamaların maliyeti önemlidir. Öngörülen uygulama maliyetinin mastitin engellenmesinden doğacak faydayı aşmaması gerekmektedir. Aksi takdirde yapılacak uygulamanın faydalı olması tek başına yeterli olmayacaktır.

Mastit subklinik ve klinik mastit olarak ikiye ayrılır. Klinik mastit memenin dörtte bir bölümünden (tek bir meme ucundan) gelen görünüşü normal olmayan süt ile karakterize durumdur. Rutin sağım öncesi yapılan göz ile değerlendirme işlemine ön sağım denir ve bu yöntem ile klinik mastit rahatça tespit edilebilir. Hafif, orta ve şiddetli olarak gruplandırılabilir. Subklinik mastit ise normal görünümlü meme dokusu ve sütle seyreden enflamasyon varlığıdır [3].

Kolofon ve terebentin içeren formülasyonu ile patent başvurusunda bulunulan K-FON yem katkısı 2005 yılından beri yem katkısı olarak satılmaktadır. Ürünün etki mekanizmasının içeriğindeki maddelerin antimikrobiyal özelliklerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Kolofan ve terebentin maddesini içeren bu formülasyonun fayda/maliyet açısından dengeli bir profile sahip olduğu düşünülmektedir.

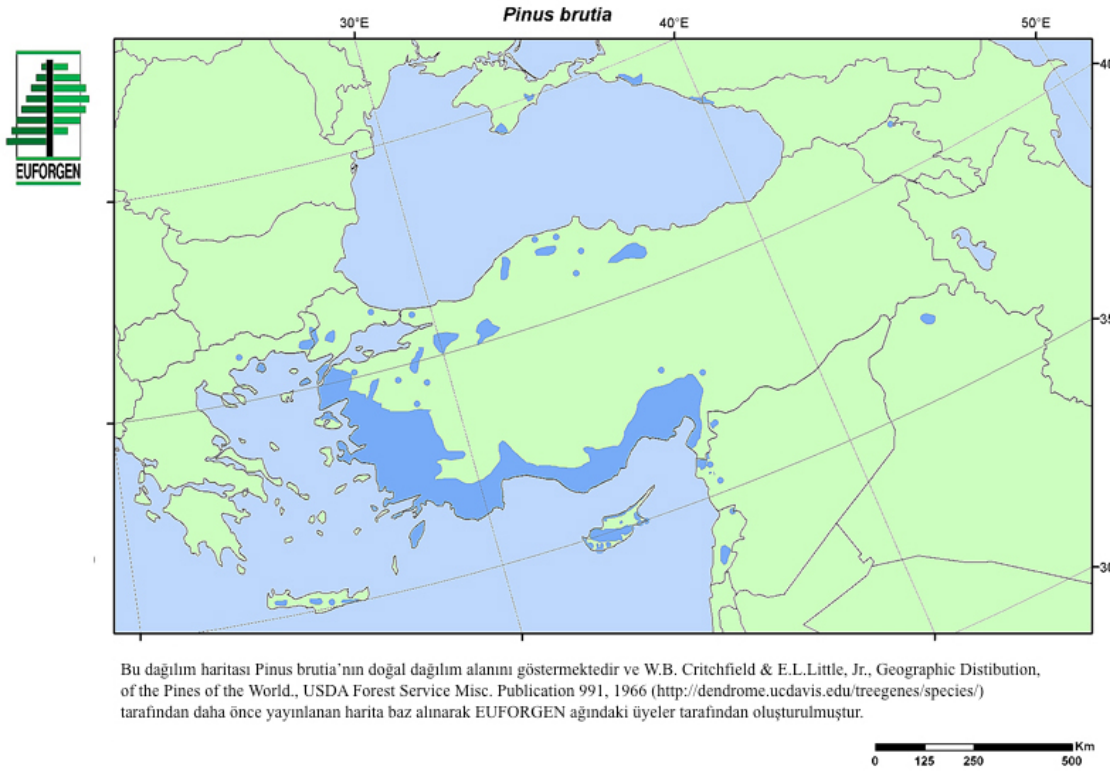
Bu tezin amacı kolofan ve terebentin maddelerini içeren, maliyet/fayda kriterleri gözetilerek oluşturulacak yenilikçi bir oral formülasyonun geliştirilmesidir. Geliştirilen formülasyonun süt sığırlarına oral yoldan uygulanarak mastit hastalığı konusunda gösterge kabul edilen somatik hücre sayısına (SHS), süt miktarına ve diğer süt parametrelerine etkisi araştırılacaktır. Aynı zamanda geliştirilen formülasyon hızlandırılmış stabilite testlerine tabi tutularak 1, 3 ve 6 ay stabilite kabinde beklemiş primer ambalaj içerisindeki formülasyon numuneleri gaz kromatografi cihazı ile incelenerek kullanılan etken maddelerdeki değişim incelenecektir. Etken maddeye ait kromatogramlar ile etken maddenin yardımcı maddeler ve primer ambalaj materyali ile geçimli olup olmadığı tespit edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolofan ve Terebentin Hakkında

2.1.1. Kolofan ve Terebentin Elde Edilen *P. Brutia Ten.*'in Özellikleri

2.1.1.1. *P.Brutia Ten*'in Morfolojik Özellikleri ve Dağılımı



Şekil 2-1: *Pinus Brutia* (Kızılçam) yetiştiği bölgeler [11] kaynağından değiştirilerek

Pinus Brutia Ten. (Kızılçam) *Pinus Halepensis* Mill (Halep çamı) ile birlikte Akdeniz havzasında 7 milyon hektarlık bir alanı kaplamaktadır ve bu ağaçlar alçak, orta yükseklikteki Akdeniz ormanlarının içinde önemli ekolojik ve ekonomik öneme sahiptirler.

Kızılçamın doğal olarak bulunduğu bölge Doğu Akdeniz'in de içinde bulunduğu (44° den 35° ye kadar) Yunanistan'dan başlayıp Doğu Kırım, Gürcistan, Kuzey Irak, Batı Suriye, Lübnan, Kıbrıs'ı kapsayan bölgedir (Şekil 2-1) [12]. Kızılçam özellikle Türkiye'de bulunmaktadır bu nedenle yaygın kullanılan ismi Türk kızılçamı olarak bilinmektedir.

P. Brutia Ten. *P. halepensis* P. Miller'in alt türü olara sayılmaktadır ancak birçok taksonomist bunun bir tür olduğunu kabul etmiştir. Morfolojik kareketerinin olması bu ağacı ayrı bir tür yapmak için yeterlidir. Örneğin tohum içeren kozalağın neredeyse sapsız olması ya da kısa pedinkülü bulunması, dayanıklı olması ve gövdeye dik açıda sürgünler vermesi gibi özellikler gösterilebilir [13].

P. brutia Ten.'i *P. halepensis* Mill. den ayıran başka özellikleri de bulunmaktadır. *P. Halepensis* gövde kalınlığı 80-100 cm aralığında iken *P. Brutia* 150

cm'e kadar ulaşabilir. *P. Halepensis* iğneleri yaprakları açık yeşil, 6-12 cm aralığında uzunlukta ve 1 mm'den az olacak genişliktedir. *P. Brutia* iğne yaprakları ise koyu yeşil 10-18 cm aralığındadır. Her iki türde de stomalar tüm iğne yaprakları kaplamaktadır [14].

2.1.1.2. *P. Brutia* Ten. Türkiye'de Bulunan Taksonları

Son yapılan çalışmalar ışığında Türkiye'de bulunan *P. Brutia* taksonları Tablo 2-1'de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Türkiye'de bulunan *P. Brutia* taksonları [13]

<i>Pinus brutia</i> Ten. var. <i>densifolia</i> Boydak
<i>Pinus brutia</i> Ten. var. <i>agrophiotii</i> Papaj
<i>Pinus brutia</i> Ten. var. <i>pendulifolia</i> Frankis
<i>Pinus brutia</i> Ten. var. <i>pyramidalis</i> Selik
<i>Pinus brutia</i> Ten. var. <i>brutia</i>

2.1.2. *P. Brutia* Ten. Ağacından Reçine Eldesi



Şekil 2-2: Reçinenin eldesi [15]

Reçineler yapışkan, sıvı, organik maddelerdir ve havayla temas ettiklerinde kırılgan, şekilsiz katı forma dönüşürler. Birçok farklı bitkiden özellikle çam türlerinden ve diğer kozalaklı ağaçlardan elde edilir (Şekil 2-2). En önemli kereste dışı orman ürünüdür [16].

Reçine çam ağacı kabuğunun çizilmesi ile ortaya çıkan sarı/kahverengi renkte viskoz bir sıvıdır. Çam reçinesi ağacın patojenler ve herbivorlara karşı oluşturduğu bir savunma mekanizmasıdır.

Reçine iki tip reçine kanalı tarafından üretilmektedir. Bu kanallar ağaç gövdesine dağılmış halde bulunurlar. Boyuna geniş kanallar ağaç gövdesinin dış ve orta kısmına düzensiz bir şekilde dağılmışken, daha küçük yatay kanallar ise sadece gövdenin dış kısmında bulunmaktadır. Bu kanallar ikincil bölme büyüme hücreleri (kambiyumlar) tarafından şekillendirilmiştir ve sekretuar epitelyumundan oluşan ince duvarların çevrelediği, ortası delik olan bölge şeklindedir. Bu kanallar ağaç gövdesinde birbirine bağlı ve devam eden ağ şeklinde reçine kanallarıdır. Sonuç olarak bu kanallardan birisi gövde yüzeyinden kesilirse reçine gövde içindeki bölümlerden yara almış olan, açılan kısımlara doğru akar [17].

Reçine ağaçlardaki normal metabolik işlemler sonucu üretilen ikincil bir üründür. Ancak sadece doğal ya da yapay (ağaç gövdesinde oluşturulan) bir yaralanma sonucunda dışarı akma gösterir. Bu materyal canlı bitki tarafından üretilir ve çeşitli metodlar ile elde edilir. Bu yöntemler ağaçta açılan yaranın tipine göre farklılık göstermektedir.

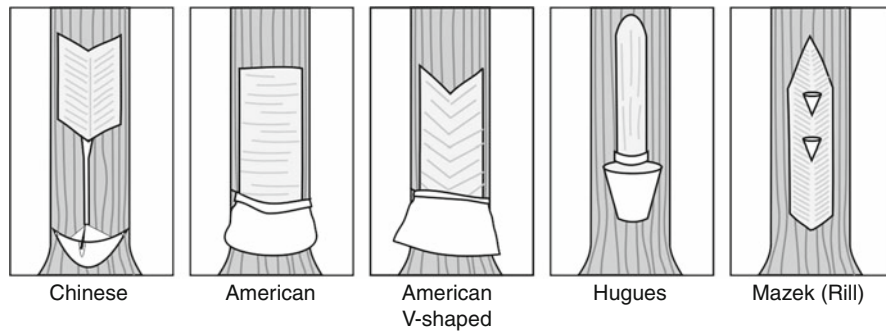
Reçine üretimi için farklı ülkelerde farklı yöntemler kullanılmıştır. Kuzey Amerika’da reçine üretimini arttırmak ilk kullanılan yöntem gövdenin yakılmasıydı. Ardından “boxing” metodu ile üretim yapılmıştır. Bu metotta ağaç alt kısmından kesilerek açılan bir oyuk ile reçine üretilmesine zorlanmaktaydı. Her iki metod da ağaçlar için zararlıydı. Ancak şu anda reçine stimülasyonu için kullanılan teknikler de “boxing” metodunun bir varyasyonudur.

Fransız (Hugues) metodu, reçine stimülasyonu için geliştirilmiş ilk methoddur. Pierre Hugues tarafından 1844 yılında geliştirilmiştir. 10 cm genişliğinde dikey kabukların soyulması ve gövdenin ikincil ksilemlerine ulaşacak kadar derin yüzülmesiyle uygulanır.

Çin metodunda V tipinde oluşturulmuş yaralama çizgileri günlük olarak aşağı doğru temizlenir. Başlangıç yüksekliği ikincil ksilemleri açığa çıkarmak için yerden 1,2 metre yüksekliktedir.

Mazek (Rill) metodunda balık kemiği şeklinde reçine alma işlemidir. Bu sistemde V-tipi şeritler (2-3 mm genişliğinde) değişken aralıklarla yukarıya dönük şekilde kesilerek (her 24 saat, 3 ya da 7 günde bir) uygulanır.

Amerikan metodunda yatay (ya da V şeklinde) 2,5-3 cm genişliğinde kabuk şeritleri ,ağacın çevresinin yaklaşık üçte biri kadar kısım, her 14 günde bir soyulur. Kambiyum (sadece kabuk ve floem soyulur) ya da tercihen kabuk altı yüzeyi açığa çıkarılır [18].



Şekil 2-3: Reçine elde etme yöntemleri [18]

Türkiye’de yapılan çalışmalarda Mazek’in oluklu çizgi methodunun kullanıldığı aktarılmıştır. Ancak asit pasta yönteminin denenerek verimliliğin artırılabilceği çalışma sonucunda belirtilmiştir. Şekil 2-3’te farklı coğrafyalarda ve uygulanan kontrollü yaralama işlemlerinin şekilleri görülmektedir.

Genel uygulama şekline göre ağacın gövdesinde açılan kontrolü yaralardan akan reçinenin birikeceği şekilde yerleştirilmiş toplama kabının içerisine dolar. Bu işlemi hızlandırmak için asit-pasta yöntemi ile %40-60 oranında H_2SO_4 (Sülfürik asit) içeren formüller kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemle elde edilen reçinenin H_2SO_4 (Sülfürik asit) kalıntısı içermemesi için distile su ile yıkanması gerekir [19].

Daha sonraki yıllarda çıkan yayınlarda asit pasta metodunun yaygın olarak kullanıldığına dair bilgiler yer almaktadır [20].

2.1.3. Çam Reçinesinin Fizikokimyasal Özellikleri

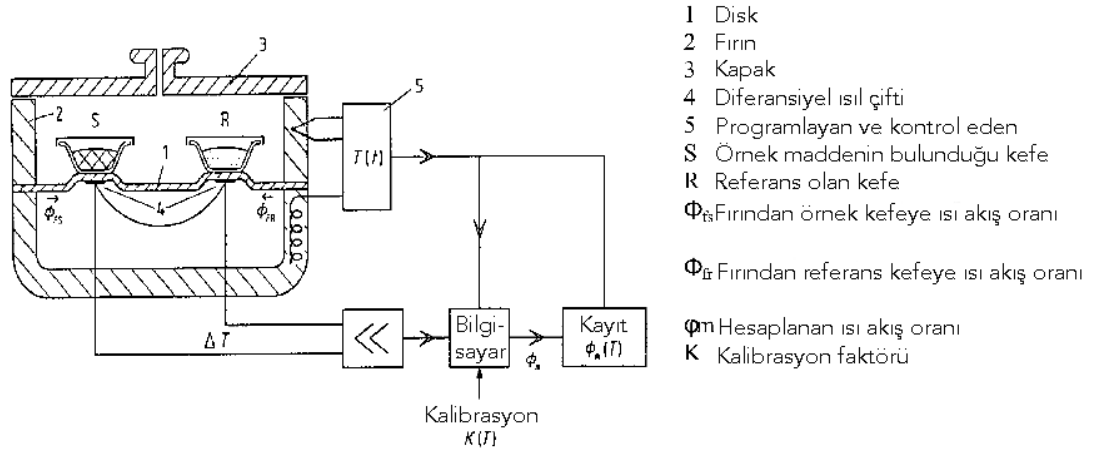
2.1.3.1. Çam Reçinesinin Fiziksel Özellikleri

Reçineler sertliklerine ve kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırılır. Oleoresinler yapışkan, uçucu yağ içeren amorf sıvılardır. Sert reçineler ise oleoresinin distilasyonu ile elde edilir ve sert, kırılğan, kokusuz ve tatsız , cam benzeri karakterdedir.

2.1.3.2. Çam Reçinesinin Fiziksel Özelliklerini Tespit Yöntemleri

Çam reçinesi polimerlerde olduğu gibi T_g olarak isimlendirilen camsı geçiş sıcaklığına sahiptir [21]. Camsı geçiş sıcaklığı katı, camsı polimer substratının yumuşak (erimemiş) hale dönüştüğü sıcaklıktır ve genellikle sertlik açısından hesaplanır [22]. Camsı geçiş sıcaklığı dışında yumuşama noktası tayini de reçinenin fiziksel özelliklerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Yumuşama noktası tayini için VICAT yumuşama derecesi diğer polimerler yapıdaki bileşikler için de kullanılan bir yöntemdir [23].

Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) verilen sıcaklıkta polimerlerin viskoelastik ve elastik cevabı hakkında bilgi vermektedir. T_g değeri ürünlerin viskoelastik özellikleri arasında korelasyon bulunması üretilecek son ürünün optimizasyonu için önemlidir. T_g saptanmasında en çok kullanılan yöntemler diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile dinamik mekanik analizdir (DMA) [24].



Şekil 2-4: Isı Akış Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı Çalışma Şeması [25] kaynağından değiştirilerek

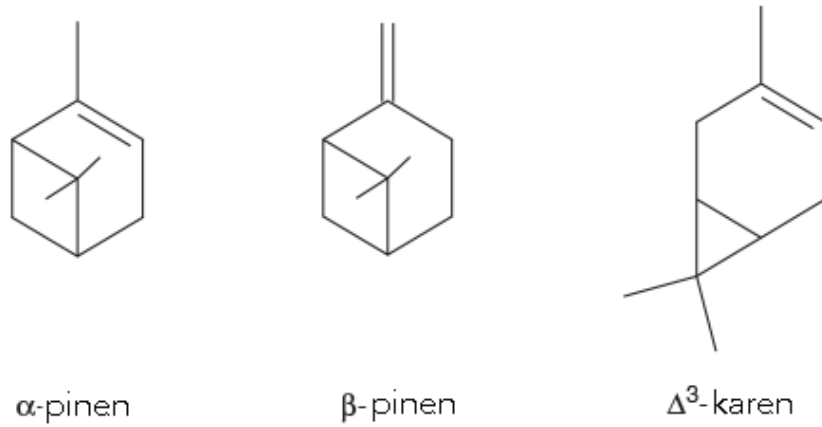
Isı akış DSC cihazında numunenin ve referansın tek kaynak tarafından ısıtılması Şekil 2-4'te gösterilmiştir. Kefeler arasındaki sıcaklık farklılıkları kayıt edilerek güç değişikliğine çevrilmektedir. Buradaki güç değişimi ısı akışındaki değişiklikleri vermektedir [25].

2.1.3.3. Çam Reçinesinin Kimyasal Bileşenleri

Reçine belki de ağaçtan elde edilen en eski ekstraktır. “Naval Stores” (Deniz malzemesi) terimi olarak adlandırılmaları bu bileşenlerin ilk olarak su geçirmez özellikler kazandırmak amacıyla uygulandıkları konusunda bizlere fikir vermektedir. Bu ekstraktlar terpenler, reçine asitleri ve çam reçinesinin farklı elde ediliş şekli olan tal yağından elde edilen yağ asitleri olarak sıralanabilir.

Terpenler

Terpenler izopren yapıtaşından (2-metil-1,3-bütadien) oluşan uçucu hidrokarbonlardır ve terebentinin ana bileşenleridir. Terebentin ağacın kontrollü zarar verilmesi, ardından eksudanın toplanması ile elde edilir ve bu işlemten sonra “wood naval stores” olarak adlandırılan ürünlerden biri haline gelir. Uçucu terbentin ağırlıklı olarak monoterpenlerden oluşur ve ağaç tiplerine göre değişmekle birlikte genel olarak Şekil 2-5'te gösterilen alpha-pinen, beta-pinen delta-3-karenden oluşmaktadır (Şekil 2-5).

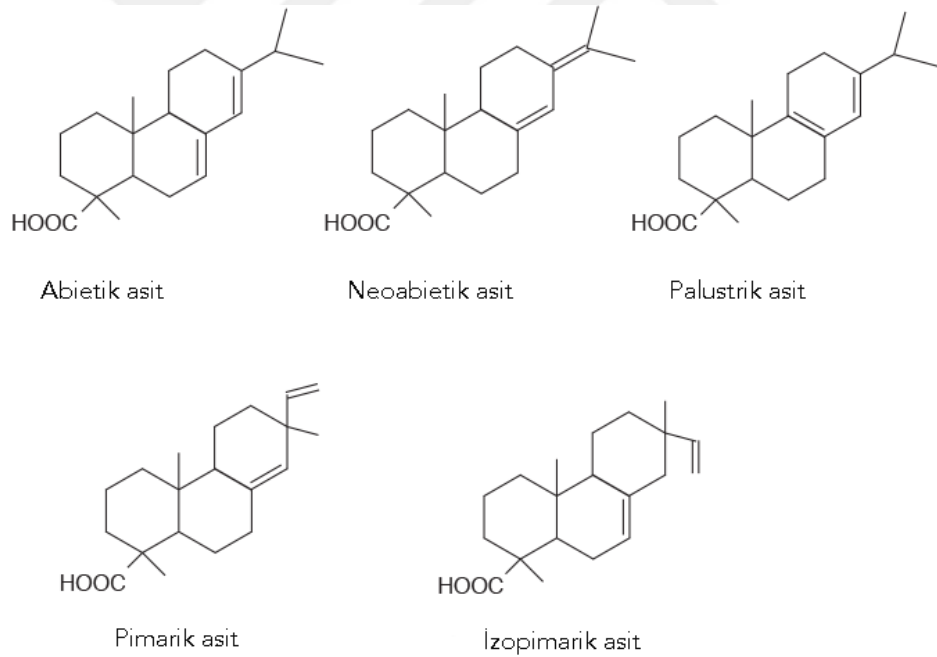


Şekil 2-5: Monoterpenler Bhojvaid[26]'ten değiştirilerek

Terebentin endüstriyel solvent olarak kullanılırken, monoterpenler daha değerli ürünlere (Parfüm, tatlandırıcı, insektisit ve dezenfektan) dönüştürülmüştür.

Reçine asitleri

Abietik asit, Neoabietik asit, palustrik asit, pimarik asit, izopimarik asit gibi diterpenoidler reçinenin ana bileşenleri olan reçine asitleridir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Reçine Asitleri Bhojvaid[26]'ten değiştirilerek

Reçine (terebentin içermeyen kısmı) direk oleoresin kısmından elde edilebildiği gibi, daha sık olarak tal yağından geri dönüştürülerek elde edilmektedir. Tal yağı daha çok kağıt üretimi esnasında elde edilen bir maddedir.

Yağ asitleri

Reçine asitlerinin elde edilmesinde kullanılan bir başka yöntem kağıt üretiminden çıkan artıkların işlemiden geçirilmesidir. Bu işlemler esnasında reçine asitleri dışında yağ asitleri de elde edilmektedir.

Yağ asitleri ve reçine asitlerinin asidik karakteri sebebiyle ve kağıt üretiminde çıkan siyah çözeltinin alkali olması ile geri kazanım işlemi esnasında çözünmeyen tuzlar oluşmasına ve konsantre siyah çözeltiden ayrılmalarını sağlamaktadır. Ayrıştırılanlar tekrar asitle muamele edilerek ham tall yağı elde edilir (“crude tall oil”). Ham tall yağından reçine asitleri, yağ asitleri ve sabunlaştırılmayan nötral bileşenler vakum distilasyonu ile elde edilir. Yağ asitleri arasında oleik ve linoleik asit bulunur [26].

2.1.4. Çam Reçinesinin Terapötik Özellikleri

Çam reçinesi bir çok uygarlık tarafından çeşitli kısımları medikal ve aromatik özellikleri nedeniyle kullanılmıştır [27]. Kozalaklı ağaçlar bir çok herbivor ve patojenlere karşı uzun yaşam ömrüne sahip ağaçlardır. Bu ağaçların başarılı olmasındaki en önemli etkenlerden biri caydırıcı kompleks savunma mekanizmalarıdır. Temel mekanik ve kimyasal savunma mekanizması oleoresin üretimidir. Viskoz oleoresin sekresyonu terpenoidlerin kompleks karışımı ve kabaca eşit miktarda terebentinden oluşmaktadır [28].

Çam reçinesi geleneksel olarak yara iyileşmesi, ülser tedavisi, öksürük problemlerinde yerel halk tarafından kullanılan bir bitkisel üründür [29]. Çam reçinesinin farklı organik solvanlar ile hazırlanan ekstraktlarının farklı bakteriler üzerine değişken etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir [30].

Çam reçinesi sığır rumeninde bulunan ve enerji kaybına yol açan methanojenik bakterilere [31] karşı etkili olduğu gösterilmiştir [32].

2.1.4.1. Terebentin Kısımının Terapötik Özellikleri

Geleneksel tıpta sıkça karşılaşılan terebentin Galen, Hipokrat ve Dioskorides tarafından akciğer ve safra kesesi taşı problemlerinde kullanılmıştır. Topikal olarak anti-paraziter, analjezik, genitoürinal enfeksiyonlar birçok antimikrobiyal özelliklerinden faydalanılan kullanım alanları mevcuttur [33].

2014 yılında yayınlanan bir makalede *Pinus Bruita*’ya ait terebentin numunlerinin *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* gibi bakteriler ve mantar suşuna karşı disk difüzyon yöntemi ile bakılarak etkili olduğu bulunmuş ve MİK değerleri tespit edilmiştir. Antibakteriyal ve antifungal etki yanında insektisit, antioksidan etkisi de incelenmiş ve tespit edilmiştir [34].

2.1.4.2. Kolofan Kısımının Terapötik Özellikleri

Çin “materia medica”sında oleoresinden terebentin uçurularak elde edilen kolofan hakkında apselerde, ülserlerde, tüberkülozda, fistüllerde, uyuzda, kurt tedavisinde, saç mantarında, bulaşıcı leproz hastalığında, eklem romatizmasında, kesik yaralanmalarında, normal olmayan vajinal akıntı, buerger hastalığı tedavisinde kullandığı belirtilmiştir. Kullanım için toz haline getirilerek 3-5 g aralığında oral yoldan kullanılması gerektiği belirtilmiştir [35].

Çin tıbbında çok farklı hastalıklara karşı kullanılan kolofanın ayrıca içerisindeki reçine asitlerinin antibakteriyal ve antifungal etkileri ile ilgili bir çok makale bulunmaktadır [36, 37]. Bu organik asitlerin tek başlarına kullanılması dışında bu asitlerden sentezlenen yeni bileşenlerde çeşitli antibakteriyal, antifungal etki açısından değerlendirilmişlerdir [38, 39].

Diterpenlerin tanımlanması ilk olarak 15. yüzyılın başlarına kadar dayanmaktadır ve Pinaceae familyasından elde edilen reçine ekstratındaki reçine asitleri ile bağlantılıdır. Şekil 2-6’da gösterilen abietik asit ilk izole edilen diterpendir [40].

Abietik asit reçine asitlerinin temel yapısını oluşturan bir asittir. Farklı türlerden elde edilen reçinelere göre yüzde oranları farklılık gösterebilir. Tek başına abietik asit ile yapılmış deneyde abietik asidin yara iyileşmesinde kontrol grubuna göre daha hızlı yara kapanması sağladığı gösterilmiştir [41].

Abietik asit, dehidroabietik asit ve neoabietik asit reçine asitlerinin karışımında antibakteriyal etki oluşturan ana bileşenlerdir [42].

2.1.5. Kolofan ve Terebentinin Oral Terapötik Dozları

Kolofan ve terebentin içeren formülasyonlar için oral yoldan uygulama konusunda kısıtlı veri bulunmaktadır. Özellikle terebentin içeren formülasyonlar haricen kullanılan formülasyonlarda tercih edilmiştir [43]. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda terebentin deriden geçişi arttırmak amacıyla da kullanılmıştır [44].

Kolofan ve terebentinin sığırlarda oral yoldan kullanımı ile ilgili çalışma mevcut değildir. Kolofan ve terebentin tek başlarına ve birlikte kullanımlarında antibakteriyal [30, 37, 45, 46], antifungal [28], antiviral [47], antikanser [48], antiparaziter [49] özellikleri in vitro ortamda gösterilmiştir. Terebentin ve kolofanın antimikrobiyal özelliklerinin yanında 43-330 mg/L konsantrasyonunda rumende (işkembe) bulunan metanojen bakterilerini baskıladığı gösterilmiştir. Metanojenler sığırlarda metan gazı üreterek enerji kaybına neden olan bakterilerdir [32].

Tezin konusu olan somatik hücre sayısının düşürülmesinde yukarıda sayılan antimikrobiyal özelliklerden kaynaklı bir etki görüldüğü düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada rumen hacmi esas alınarak oluşturulan doz patojen mikroorganizmaları baskılamak için gerekli olan kolofan terebentin karışımına göre belirlenmiştir.

Finlandiya da alınan patent ile (Patent numarası: FI124918) yapılan bir buluşa ait çalışmalarda reçine asitlerinin %0,1 (g/L) konsantrasyonunda broth dilüsyon metodu ile yapılan çalışmada mastit etkeni *S. aureus*’a karşı etkili bulunmuştur. *E. coli*’nin bazı suşlarına karşı %0,5 (g/L) konsantrasyonunda etkili bulunmuştur. Sindirim sistemi hastalığı olan nekrotik enteritis etkeni *C. perferingens*’e karşı da 0,01 (g/L) konsantrasyonunda bile inhibisyonu saptanmıştır. Patente ve çalışmalara konu madde %8 oranında reçine asidi içermektedir. *S. aureus* ve *E. coli*’ye karşı etkili olunan konsantrasyon 5 g/L’dir [37, 50].

Terebentin çalışmada kullanılan drog materyalinin %3,5 ± 0,3 (a/a) kadarını oluşturmaktadır. Terebentin tek başına kullanıldığında *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* etkenlerine karşı MİK değeri 68 mg/ml olarak bulunmuştur [34].

Sığırlarda rumen hacmi 50-120 litreye kadar hayvanın büyüklüğüne göre değişkenlik göstermektedir [51]. Rumende bulunan patojen mikroorganizmalar ve methanojenlerin baskılanması istenildiğinde istenen MİK konsantrasyonları 30 g kolofan terebentin karışımında bulunan $3,5 \pm 0,3$ (a/a) oranında terebentin tarafından karşılanamazken $96,5 \pm 0,3$ (a/a) oranında reçine asitleri ile fazlası ile karşılanmaktadır.

Belirtilen doz terebentin kolofan karışımı 500-700 kg arasında canlı ağırlığa sahip rumen hacmi 200 L üst limitine kadar olan tüm hayvanlar için rumen hacmine göre MİK değerlerini karşılanmaktadır ve farmakodinamik göstergeleri elde etmek için doza bağımlı artışı gerektirmeyecek kadar yüksek düzeydedir.

2.1.6. Çam Reçinesinin Toksisitesi

Oleoresin ağaçtan elde edildikten sonra işlem görmeden kullanıldığı alanlar kısıtlıdır. Az da olsa yapılan toksikoloji çalışmalarında oleoresin halinde yapılan çalışmalarda köpeklerde 2 yıl boyunca %0, %0,05 ve %1 (günlük 0, 14, 260 mg/kg a eşit). Vücut ağırlığı yüksek doz erkeklerin yem tüketiminde düşüşe bağlı olarak düşmüştür. Ancak tedaviye bağlı vücut ağırlığı kazanımı ile fark edilebilir değildir. Bu çalışmada NOEL değeri %1 (260 mg/kg) bulunmuştur [52].

Kozmetik, gıda, kimyasal ürünlerde kullanıldığı gibi bu alanlarda işlemden geçirilerek ayrılmış terebentin ve kolofan olarak kullanılması ile karşılaşılmaktadır. Çam reçinesini oluşturan bileşenlere ait toksisite ile ilgili bilgiler bu nedenle iki bileşen için ayrı ayrı verilecektir.

2.1.6.1. Terebentinin Toksisitesi

Terebentin uçucu yağ olması sebebiyle tedavide kullanımı hem insan hem hayvanlara uygulanan ürünlerde bulunmaktadır.

Maruziyet yolları inhalasyon, yutma ve deriden geçiş ile oluşmaktadır. Göz, deri ve üst solunum yolunda irritasyona yol açabilir [53].

%5 lik topikal uygulaması ineklerde mastit, flegmon, tendinit, römotaik hastalıklarda kullanılmaktadır [54].

İnsanlarda bronşiyal hastalıkların tedavisinde ve romatoid nörolojik ağrıların lokal tedavisinde topikal olarak kullanılmaktadır. inhalasyonda dozu 300 mg/gündür.

Farelerde yapılan toksisite çalışmalarında intravenöz LD₅₀ dozu 1,18 mg/kg (1,11-1,25) mg/kg inhalasyon için 29.0 (25,6-32,8) mg/L bulunmuştur. Sıçanlarda yapılan oral toksisite çalışmalarında 6 saat için 5760 mg/kg LD₅₀ 12 g/m³ bulunmuştur [53, 55].

2.1.6.2. Kolofanın Toksisitesi

Terebentin'inden distilasyon sonucu elde kalan ürün kolofan kısmıdır. Kolofan'ın içerdiği asitleri terapötik etkileri 2.1.4.2 başlık altında anlatılmıştır.

Kolofan'ın toksisite çalışmalarında terebentine göre çok daha düşük toksisiteye sahip olduğu görülmektedir. Akut toksisite çalışmalarında fare, sıçan ve gine

domuzunda yapılan çalışmalarda LD₅₀ değeri sırasıyla 4600, 7600 ve 4100 mg/kg olarak bulunmuştur [52].

Kolofana ait toksisite testlerinde tekrarlanan doza bağlı toksisitede NOEL değeri 105-200 mg/kg bulunmuştur [56].

2 yıl süren toksisite/karsinojenite çalışmalarında kolofan Sprague-Dawley sıçanlarına %0 , %0,05 ya da %1 (0, 25, 500 mg/kg günde dozuna eşit). Her gruptan 5 hayvan 12 ayın sonunda sakrifiye edilmiş büyüklük ve mikroskopik patolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Tüm hayatta kalanlar 24 ayın sonunda öldürülmüştür.

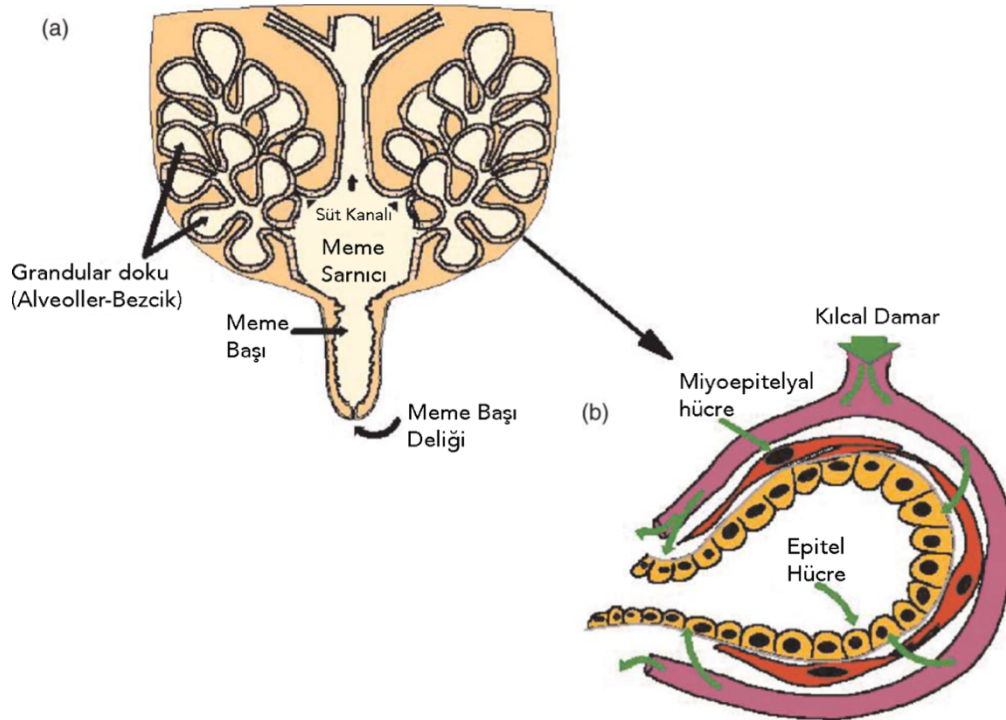
Diyetinde %1 içerenlerin vücut ağırlığı anlamlı derecede düşüktür ve bu durum düşük yem tüketimine bağlanmıştır. Bazı organların vücut ağırlığına oranlarında tek tük farklılıklar görülmüştür. Eşlik eden patolojik durum bulunmamıştır. Bu durum toksikolojik açıdan anlamlı bir farklılık değildir. Diyet konsantrasyonu ve karsinojenite arasında da bir ilişki bulunmamıştır [52].

2.2. Süt Sığırlarında Mastit ve Somatik Hücre Sayısı

2.2.1. Sığır Meme Anatomisi ve Fizyolojisi

Meme dokusu aksesuar üreme organlarıdır ve bu organ yavruların gelişimine destek vermektedir. Meme dokusunun gelişmesi ve laktasyon memeli hayatında birçok kez olabilir. Meme dokusu “yapısal gelişim, fonksiyonel farklılaşma, ve gerileme” şeklinde tekrar eden döngüler geçiren kısıtlı organlardan biridir.

Süt bezinin meme alveoller ve süt kanalları gibi epitel yapılardan oluşmaktadır ve bu yapıların yanındaki stromal bağ dokuları ile çevrelenmiştir.



Şekil 2-7 : Memenin grafik gösterimi Nickerson[57]'dan değiştirilerek

(a) Grandular doku(alveoller boyutlandırılmadan çizilmiştir), süt kanalı, meme sarnıcı, meme başı deliği, (b) Meme epitel hücreleri, mioepitelyal hücreler ve kılcak damar bağlantısını gösteren alveollerin grafiksel kesiti

Süt dokusunun stroması öncelikle, epitelyal yapıları çevreleyen bağ dokunun hücresel ve hücresel olmayan yapılarından oluşmaktadır. Stromanın hücresel yapıları fibroblastlar, endotelyal hücreler ve yanındaki kan damarları, doku içindeki lökositler, hücresel olmayan yapılar ise kollajen ve diğer bağ doku proteinlerinden oluşmaktadır.

Alveoller Şekil 2-7 (b) görüldüğü gibi laktasyon süresince süt üretimini yapan en temel yapıdır. Süt kanalları ağı sütün alveollerden dışarı çıkışı için bir yol oluşturur. Alveol grupları küme olarak gruplanır ve her bir küme lobülü oluşturmaktadır. Lobül içindeki her bir alveol intralobüler kanala akar ve intralobüler kanallar interlobüler kanallara bağlanır [58].

2.2.2. Sığır Memesinde Enfeksiyonlara Karşı Savunma Mekanizmaları

Enfeksiyon başlangıcında doğal bağışıklık ortaya çıkar. Bu bağışıklık hücresel ve nonspesifik maddeler, anatomik ya da fiziksel savunma mekanizmaları vasıtasıyla oluşur. Patojen süt dokusuna girdiğinde doğal bağışıklık ile yok edilebilir ancak edilemezse edinilmiş bağışıklık devreye girer. Birçok meme dokusu enfeksiyonu meme başında bulunan halka kaslar ve keratin sayesinde kapalı bulunan meme başı deliğinden patojenlerin girerek dokulara doğru ilerlemesi ile oluşur [59].

2.2.3. Süt Sığırcılığında karşılaşılan enfeksiyöz hastalıklar

Sağılan süt sığırlarında en çok karşılaşılan enfeksiyöz hastalıkların başında mastit hastalığı gelmektedir. Bunun dışında karşılaşılan diğer bazı hastalıklar aşağıda sıralanmıştır.

Salmonella enfeksiyonu, [59] leptospiroz süt sığırlarında üretimde büyük kayıplara yol açmaktadır.

Tüberküloz Mycobacterium bakterisi tarafından oluşan ruminantlar, domuzlar, kuşlar, vahşi hayvanlar ve insanları enfekte eden bir hastalıktır. Ciddi ekonomik kayıplardan sorumlu ve en önemli toplum sağlığını ilgilendiren zoonoz hastalıklardan biridir.

Bruselloz yine global olarak önem taşıyan zoonotik hastalıklardan biridir geçici ya da kalıcı kısırlığa sebep olarak ciddi ekonomik kayba yol açmaktadır.

Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) bovine herpesvirus 1(BoHV-1) virüsünün sebep olduğu viral bir hastalıktır. Süt sığırlarında önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Süt üretimini düşüren, solunum hastalıklarını artıran buzağı ölümlerini yükselten ve üreme problemleri oluşturan bir hastalıktır.

Bovine Viral Diarrhea (BVD) aynı isimdeki virüs tarafından oluşan düşük, güçsüz ve enfekte buzağı doğumuna sebep olan önemli bir sığır patojenidir [59].

Yukarıda kısaca bahsedilen ve süt sığırlarında görülen enfeksiyöz hastalıklardan en sık karşılaşılan ve ekonomik olarak en büyük kayba sebep olan hastalık olan mastit ayrı bir başlık altında incelenecektir.

2.2.4. Mastit

Mastit süt sığırlarında dünya çapında en sık karşılaşılan hastalıktır ve hayvan refahı, süt üretimi üzerine büyük etkileri bulunmaktadır. Mastit süt endüstrisi için en

önemli hastalıktır ve doğrudan, dolaylı olarak kayıplara neden olmaktadır. Doğrudan kayıplar tedavi masrafları, atılan süt, zaman, ölümler ve yinelenen mastit ile ilgili maliyetlerdir. Dolaylı maliyetler süt üretiminin düşmesi, düşen süt kalitesi, ıskartaya ayrılan hayvan sayısının artması, beklentiden önce sağım döneminin bitirilmesi, hayvan refahı ve doğal olarak sürüdeki diğer sağlıklı hayvanlarda mastit hastalığının görülmesi olarak sayılabilir.

Mastitin etiyolojisi yeni kanıtlanan mikroorganizma (Mo) türleri ile değişmektedir. Yaklaşık 150 bakteri türü mastit olan ineklerinden izole edilmiştir. Etiyolojisine göre dört sınıfa ayrılabilir. Bunlar; bakteriler, mantarlar, virüsler ve alglerdir. Virüslerin etiyolojik ajan olarak mastitteki klinik önemi kısıtlıdır.

Mastitle ilgili birçok etiyolojik Mo'lar bulunmaktadır ancak bunlardan çoğunluğunu *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Enterobacteriaceae* türleri oluşturur [59].

İki tip mastit bulunmaktadır. Bunlar Subklinik ve klinik mastittir. Mo bulaşması çevresel ya da temas ile oluşabilir. Ana temas ile geçen Mo'lar *S. aureus* ve *Streptococcus agalactiae*'dir ve bu Mo'ların ana kaynağı enfekte ineklerin meme dokusudur. *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* çevresel bulaşan Mo'lardır [59].

2.2.4.1. Klinik Mastit

Klinik mastit görünebilecek şekilde memenin dörtte birlik kısmından gelen anormal süt olarak tanımlanabilir. Ön sağım yani rutin sağım öncesinde sağılan sütün görsel olarak incelenmesi ile klinik mastit kolayca tespit edilebilir. Klinik mastit şiddetine göre hafif, orta, şiddetli olarak tanımlanabilir. Birçok skorlama yöntemi uygun tedavinin saptanması ve istenmeyen sonuçların oluşum riskini saptamak için kullanılabilir.

- Hafif klinik mastit: Anormal süt (genelde pıhtı, tanelerle gözükür ya da süt renginde ve kıvamında değişim)
- Orta klinik mastit: Anormal süt ve anormal meme dokusu (Dokudaki inflamatuvar değişimler kırmızılık, ateş, ağrı ve şişlik ile gözükür.)
- Şiddetli Klinik mastit: Anormal süt, anormal meme dokusu ve hasta inek (Vücut sıcaklığında değişim, sindirim oranı, yeme durumu, su içme durumu ve tavır değişimi ile gözükür.) [60]

2.2.4.2. Subklinik Mastit

Subklinik mastit normal görünümlü meme dokusunda enflamasyon varlığı ve görünüş olarak normal süt ile tanımlanabilir [60]. Görünüşte değişiklik olmasa da mikroorganizmalar uygun kültür teknikleri ile izole edilebilir. Kompozisyonel değişiklikler ve somatik hücre sayısının artması (öncelikle polimorfonükleer lökositler) subklinik mastite eşlik eder ve uygun testler ile tespit edilir. Kronik mastit ise tüm laktasyon boyunca sürebilir ve sırasıyla klinik ve subklinik mastit arasında geçiş yapabilir [61]. Subklinik mastitin tespit edilmesinde en sık kullanılan yöntemler aşağıda listelenmiştir.

- Somatik Hücre Sayısı (SHS) : Sütün bir mililitresindeki lökosit konsantrasyonudur. Lökositler enfekte olmayan bölümlerde somatik hücrelerin %80'inin oluştururken enfekte olmuş bölümlerde %99'unu oluştururlar.
- Laktoz: Mastitli sütteki laktoz yüzdesi daha düşüktür. Doku hasarına bağlı olarak sekretuar hücrelerdeki enzim sistemlerinin sentez yapabilme yetisinin düşmesi ile laktoz biyosentezinin azalması sebebiyle laktoz üretimi azalmaktadır.
- Laktat dehidrojenaz (LDH): Lökosit sitoplazması da dahil olmak üzere birçok dokuda bulunan bir enzimdir. Hücre hasarı oluştuğunda ister meme epitel dokusu olsun ister lökositler LDH süte salınır. Bazı piyasada bulunan mastit tespit cihazları LDH aktivitesi ile sonuç vermektedir.
- *N*-acetyl-b-D-glucosaminidase (NAGase) : Hasar görmüş meme epitel hücrelerinden süte salınan lizozomal bir enzimdir. Somatik hücrelerinden daha az ölçüdedir.
- Akut faz proteinleri: Haptoglobin ve süt amlloid A artan kapiler permeabilite, sıkı bağların kaybolması ile kandan süte kan-süt bariyerini geçerek göç sebebiyle ya da lokal olarak süt lökositlerinin ve meme epitel hücreleri tarafından üretilmesinden dolayı sütte bulunur.
- İletkenlik: Mastit ile sütün elektriksel iletkenliği (İE) artar. Sodyum ve klorür konsantrasyonunun artması ve potasyum konsantrasyonunun azalmasıyla oluşur. Birçok süt ekipmanları üreten firma İE'yi mastit tespiti için sistem içinde kullanmaktadır [60].

2.2.5. Somatik Hücre Sayısı

Maliyetine rağmen kolay veri toplanması sebebiyle SHS ya da logaritmik SHS subklinik mastitin tespitinde en çok kullanılan teşhis yöntemidir. Laboratuvar ortamında SHS mikroskop yardımıyla ya da otomatik elektronik hücre sayıcılar ile bulunabilir. Direkt mikroskopik SHS metodu kalibrasyonu yapılmış mikroskopik lam üzerine belirli miktar süt yayılmasıyla bakılır. Süt kuruduktan sonra lam üzerinde lekeler oluşur. Belirlenen alandaki hücreler sayılır.

Bu metot laboratuvarda yapılması gereken, yüksek özellikte bir mikroskop ve deneyim kazanmış bir personele gereksinim duyar. Otomatik elektronik hücre sayıcılar, genel olarak akış sitometri metoduna dayanır ve SHS'nın seri ve kolay tespitini sağlar. Bir çok kuruluşta bu cihazları bulmak mümkündür. Hücre sayıcıların taşınabilir olanları da mevcuttur bunlar laboratuvar ya da çiftlik ortamında da kullanılabilir.

Sürü bazında bakıldığında SHS verisi tüm süt tanklarına yapılan bir testtir ve bu tanka süt veren ineklerin genel meme sağlığı ile ilgili veri vermektedir. İnek bazında bakıldığında SHS sayıları aylık olarak alınan numunelerle hangi hayvanın süt bezlerinde akut, temizlenmiş ya da kronik subklinik mastit olduğu görülebilir [60].

Eğer bakteriler meme başındaki lokal korumaların üstesinden gelirlerse meme dokusunun mikroortamı hastalığın yerleşmesine engel olabilir. Patogenezin erken döneminde yerleşik ve toplanan meme dokusu lökositlerinin önemli bir rolü bulunmaktadır. Lenfosit ve makrofajlar enfekte olmamış meme dokusunda üstün lökosit tipleridir. Nötrofiller ise çok az gözükürler. Sağlıklı bir meme dokusuna ait sütte toplam SHS $<10^5$ 'in altındadır ve lökositlerin süt içerisindeki dağılımı laktasyon döneminin fonksiyonlarına göre farklılık göstermektedir. Ancak toplam SHS $>10^6$ sayısının üzerine

bakteriyal bulaşmadan sonra saatler içinde çıkabilir ve en çok bulunan lökosit tipi bu kez nötrofillerdir. Somatik hücre sayısının enfekte olmamış ineklerde 50.000 hücre/ml olarak kabul edilmiştir [62]. Başka çalışmalarda 50.000-100.000 hücre/ml olması sağlıklı olarak kabul edilmiştir [63]. Nötrofillerin meme bezi dokusuna ve süte göç hızı ve büyüklüğü yeni bir meme içi enfeksiyonun başlangıcında önemli bir belirleyici faktördür.

Önemli bir doğal bağışıklık savunma mekanizması meme bezi lökositlerinin bakterileri öldürmesi ve sindirmesidir. Fagositoz olarak isimlendirilir. Meme bezinde fagositoz öncelikle nötrofiller ve makrofajlar tarafından yapılır [64].

2.2.6. Somatik Hücre Sayısını Etkileyen Faktörler

Somatik hücre sayısı (SHS) etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar başlıklar halinde aşağıda incelenmiştir.

2.2.6.1. Enfeksiyon Durumu

Memenin dörtte birlik bölümünden alınan sütteki SHS'a etki edene en önemli faktörlerden birisi bu bölümün enfeksiyonudur. Diğer faktörlerin çok daha düşük etkileri bulunmaktadır. Meme dokusunda kolonize olan Mo'lardan birinci grup minör patojenler ya da çevresel Mo'lar (örneğin *Corynebacterium bovis* ya da koagülaz negatif stafilokok) ve diğer ikinci grup ise major patojenlerden oluşur (*Streptokok spp.*, *Staphylococcus aureus* ve koliformlar en çok rastlanılanlardır.) [65].

2.2.6.2. Enfekte Olan Meme Bölümü Sayısı

İneğe ait karışım sütteki somatik hücrelerin konsantrasyonu her bir meme bölümündeki sütlerdeki SHS'na ve sırasıyla süt üretimlerine bağlıdır. Bu durum mastit tespit programlarında majör önem taşımaktadır. Enfekte olan bölüm sayısı arttıkça yaklaşık olarak SHS'sı da ikiye katlanmaktadır. Enfekte meme sayısı 1 den 4'e doğru arttığında enfekte hayvanların enfekte olmayanlardan doğru şekilde ayırma işleminin başarısı %77,9'dan %92,7'lere çıkmaktadır [65].

2.2.6.3. Hayvanın Yaşı

Artan yaş ile ineklerde SHS'nda yükselme olduğu gösterilmiştir. Mastit oluşmamış aynı yaştaki ineklerin SHS'larında artış görülmezken mastite yakalanmış hayvanlarda artış daha çok olmuştur. Bunun hayvanların meme dokusunda görülen tahribatın mastit olmamışlara göre daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür [66].

2.2.6.4. Laktasyon Dönemi

Kuru Dönemin ardından yavrulama ile laktasyon dönemi başlar. Laktasyon dönemi farklı fizyolojik değişimlerin olması sebebiyle kendi içinde bölümlere ayrılarak ifade edilir. İlk olarak erken laktasyon dönemi ile başlar. Doğumdan hemen sonra hayvanın memesi enfekte olsa da olmasa da SHS hızlıca artar.

Yine enfekte olmasa da kuru döneme girecek hayvanda (sağım döneminin bitirileceği zaman) SHS yine artış gösterir.

2.2.6.5. Mevsim

Genel olarak SHS kışın en düşük, yazın en yüksek seviyede bulunur. Sıcaklık ve nem indeksi düşmeye başlasa da yüksek SHS sayılarının devam ettiği bildirilmiştir. Bu durum ya da fenomene “devam eden etki” (carry over effect) denilmektedir. Yazın oluşan bu etki sadece yükselmiş sıcaklıkla bağıntılı değildir. Yapılan denemelerde hayvanların daha sıcak bir ortama aktarılması ile aynı etki sağlanamamıştır [65].

2.2.6.6. Doğum sayısı

SHS doğum sayısı ile değiştiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Enfekte olmamış meme bölümlerinde SHS’nda laktasyon sayısının artmasıyla düşük miktarda değişimler görülmüştür [67].

2.2.6.7. Gün içi ve Günler Arası Varyasyonlar

SHS genelde sağımın başında en düşük haldedir ve sağımda hızla yükselir. Sağımdan sonra 4 saat boyunca yüksek seyredebilir ve sonrasında yavaş yavaş düşer.

Bu değişiklik yüksek ve düşük SHS için 4’ten 70 kata tek bir meme bölümü için değişebilir. Çalışmalarda art arda iki süt sağımında da %30 luk SHS değişim görülmüştür.

Günden güne SHS varyasyonlarında da enfeksiyon gibi durumların oluşması gibi durumlar dışında %40’tan fazla değişmediği gösterilmiştir [65, 68].

2.2.7. Mastit tedavisi için yeni yaklaşımlar

Mastit tedavisinde meme içi tüp ve im, iv yoldan antibiyotik uygulanması en çok başvurulan tedavi şeklidir. Günümüzde antibiyotikle tedavi dışında bir dizi tedavi alternatifleri denenmiştir. Bazı yeni tedavi yöntemleri, bazıları aşağıdaki gibidir :

Özellikle bitkisel ürünlerin mastit etkenleri üzerine etkisi büyük ilgi gören alanlardan biridir. Trans-sinnamaldehit (TC), Öjenol, karvakrol, timol’un minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) ve minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) önemli suşlar üzerine medyum olarak süt kullanılarak denenmiştir. Aralarında en etkili olarak TC bulunmuştur. TC’nin *S. aureus*, *E. coli*, *Strep. uberis*’e karşı MİK ve MBK değerleri sırasıyla %0,45 ve %0,1 çıkmıştır [69].

Lactococcus lactis mikroorganizmasının ürettiği geniş spektrumlu bakterisit Lactisin 3147 nötral ph da streptokok ve stafilokoklara karşı in vitro da etki göstermiştir. Meme ucu kapatıcı olarak kullanılan formülasyon içerisine konulan Lactisin 3147 meme ucuna uygulanmıştır. Kontrol grubunda %61 deneme grubunda %6 klinik mastit oluşmuştur [70].

Flavonoitlerden kuersetin mastit olan (SHS> 300.000 hücre/ml) ineklerde farklı dozlarda meme içine uygulanarak somatik hücre üzerine etkileri incelenmiştir. Farklı dozlarda uygulanan 8 dozlama ile günlük SHS sayıları takip edilmiş ve düşüş gözlenmiştir [71].

Özellikle mastit ve diğer bağışıklık düşmesine bağlı hastalıkların tedavisinde kullanılan Omnigen AG ABD menşeli bir yem katkısı olarak piyasa da bulunmaktadır. Sindirim sistemine ve dolaylı olarak bağışıklık sistemine etki ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan bu ürünün geç laktasyon döneminin 60 günü, kuru dönem

ve erken laktasyon döneminde gerçekleşen 150 günlük deneme ile somatik hücre sayıları arasında anlamlı ($p<0,05$) farklılık bulunmuştur [72].

2.2.8. Mastitin önlenmesi için yaklaşımlar

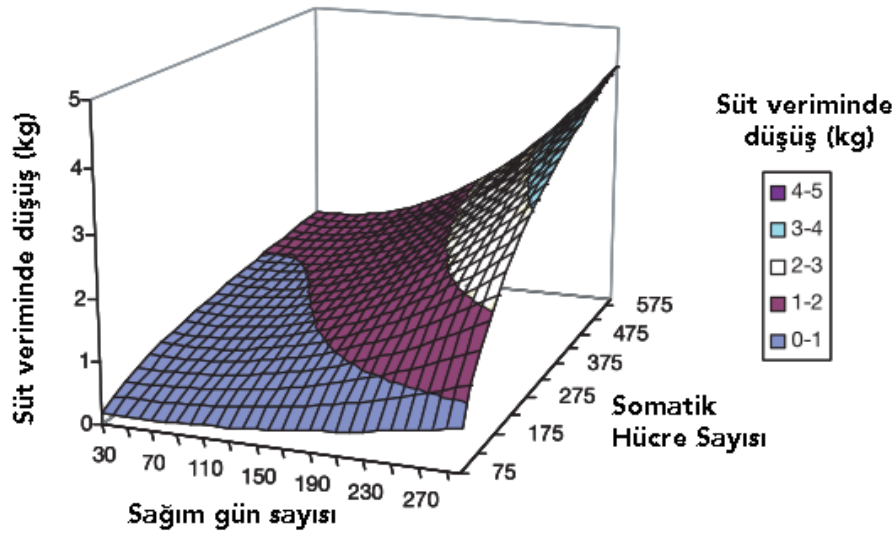
Düşük meme hijyeni sığırlarda yükselmiş SHS ve yüksek meme enfeksiyonu ile ilişkilendirilir. Gözlemsel çalışmalarda yüksek olmayan bölme demirlerinin ve elektrikli trainer'lar ile (defekasyon ve ürinyasyonda hayvanın düzgün yapmasını sağlayan uyarıcı) kirli memelerin bağlantılı olduğu görülmüştür [73].

Aşılama ile immünolojik cevap mastitten korunma için önemli bir yaklaşımdır. Özellikle meme körleşmesine neden olan bakteri suşlarına karşı aşılama önemli bir koruma yöntemidir [74].

Mastitten korunmada en etkili yollar süt veren ya da vermeyen ineklerin temiz, kuru bir ortamda barınmaları, meme başının sağım öncesi ve sonrası dezenfekte edilmesi, ineklerin sağımdan sonra ayakta kalmalarını sağlamak, sağım yapanların eldiven takması olarak sıralanabilir [75].

2.2.9. Mastit, Somatik Hücre Sayısı ve Süt miktarı arasındaki ilişki

Mastit meme dokusunun yangısıdır. Süt üretimi yapan bir dokuda gelişen enfeksiyon ve enflamasyon durumunda elde edilen süt miktarının düşmesi ve enfeksiyon atlatıldıktan sonra dahi süt miktarının azalması beklenen bir süreçtir.



Şekil 2-8: Süt verilimi, sağılan gün sayısı ve SHS arasındaki ilişkiyi gösteren grafik [62] kaynağından Türkçeleştirilerek

Hem subklinik hem de klinik mastit sonucu süt kaybı oluşmaktadır ve subklinik mastitte somatik hücrenin sağlıklı aralığa gerilemesi durumunda da süt miktarının artmadığı gösterilmiştir [75].

Laktasyonun dörtte birlik döneminde verimin 100.000 hücre/ml konsantrasyonunda düşmeye başladığı bildirilmiştir. Bazı yayınlarda bu sayı 200.000 ve 500.000 hücre/ml olarak bildirilmiştir [65].

Süt veriminin artması da mastite yakalanma riskini artırmaktadır [10].

SHS'nın süt verimi ile direk ilişkisi bulunmaktadır. Artan SHS ile 1-3,5 litre aralığında süt kaybı olduğu görülmüştür [65]. Somatik hücre sayısının sağılan gün sayısı ve süt verimi arasındaki ilişki Şekil 2-8'de gösterilmiştir.

2.3. Veteriner alanda kullanılan oral dozaj şekilleri

Veteriner tedavide kullanılan ilaç şekilleri insanlarda kullanılan konvansiyonel ilaç şekilleri ile benzerdir. Veteriner tedavide etken maddenin uygulanacağı yerin özelliklerine göre formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu formülasyonlar insanlara uygulanan preparatlarda olduğu gibi oral, parenteral, topikal uygulamaları mevcuttur.

Formülasyon açısından veteriner tedavide kullanılan ilaçlar insan kullanımına sunulan ilaçlar ile benzerdir. Sadece uygulanacak hayvanın kilosuna, farklı fizyolojik özelliklerine göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Veteriner alanda oral yoldan kullanılan dozaj şekilleri Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: Veteriner alanda kullanılan oral dozaj şekilleri [76]

Dozaj Şekli	Kullanım şekli
Sıvı Dozaj Şekilleri	Çözelti, Süspansiyon, Emülsiyon yutturma, içme suyuna ilave
Pat ve jeller	Yutturma
Toz ve Granüller	Yeme katılarak
Premiksler	Kesif yemin ilk yapımında ya da TMR'a katılan formülasyonlar
Kapsüller	Yutturma
Tablet ve Boluslar	Yutturma
Peletler	Yeme katılarak
Briket ve bloklar	Yalama
Kontrollü salım yapan oral sistemler	Yutturma

Bu tezde kolofan ve terebentin içeren veteriner tedavide mastit hastalığının engellenmesi amacıyla oral yoldan uygulanan formülasyonlar çalışılmıştır. Formülasyon olarak çalışılmış dozaj şekillerine ait genel bilgiler maddeler halinde anlatılmıştır.

2.3.1. Tozlar

Tozlar eczacılığın her alanından karşımıza çıkmaktadır. Katı haldeki etken ve yardımcı maddeler dozaj formuna dönüştürülme esnasında büyük ya da daha küçük partikül büyüklüğüne sahiptirler. Üretilen tozun dozaj formlarının oluşturulmasında kullanılması sırasında toz karışımının her bir birime bölündüğünde aynı toz özelliklerini taşıması önemlidir. Tozların tablet, kapsül ve süspansiyonlarda kullanılması dışında tozlar tek başına da farmasötik dozaj formu olarak da kullanılır [77].

2.3.1.1. Toz etme yöntemleri

En geniş anlamıyla toz etme işlemi partikül veya agregatlarının boyunun küçültmesini sağlayan mekanik bir işlemdir. Çalışılan ekipmana göre kesme, doğrama, kırma, öğütme, ezme, mikronizasyon gibi çeşitli işlemleri kapsar. Ekipman seçimi boyutları küçültülecek olan maddenin özelliklerine, ilk madde büyüklüğüne ve istenen küçültme boyutuna bağlıdır. İstenilen partikül boyutlarına ulaşmak bazen farklı ekipmanların kullanılmasını gerektirmektedir. Üretilmek istenen son partikül boyutuna ulaşmak için kullanılacak ekipmana hammaddenin partikül boyutları uygun olmayabilir. Bu durumda ön işlemden geçirildikten sonra uygun parçalar son partikül küçültme işlemi için cihaza yerleştirilir.

Eczacılık alanında kullanılan hammaddelerin çoğu bitkisel drogların partikül boyutlarının küçültülmesinde kullanılan kırma ve kesme gibi yöntemlere ihtiyaç duymaz. Ancak maddelerin bazı özellikleri örneğin; erime noktası, polimerler gibi camsı geçiş sıcaklığı, sertlik ve nem içeriği partikül boyutu küçültecek cihaz seçimine etki eder.

Mekanik kırma değirmenlerinde işlem esnasında oluşan ısı sebebiyle erime noktası ya da yumuşama noktası düşük, yapışma eğilimde olan maddeler ve sıcakta bozulan maddeler için problem oluşturabilir. Üretilen ısının ortamdan uzaklaştırılması için akan su ya da hava akımı ile soğutma yapılabilir.

İstenilen partikül boyutu, şekli, partikül büyüklüğü dağılımı seçilecek cihaza göre değişiklik göstermektedir. Parçacık büyüklüğünün kırılma yoluyla azaltılması için maddeye mekanik gerilim uygulanması gerekmektedir. Uygulanan gerilimin karşılığında uygulama zamanına bağlı olarak maddeler kırılma yapısından plastik yapıya kadar değişken davranış gösterebilirler.

Tamamen kırılma maddeler kırılmanın meydana geldiği esneme noktasına kadar stres uygulandığında kırılma gerçekleşir. Tam tersi tamamen plastik bir materyalde ne esneme ne de kırılma olmaz.

Genel olarak eczacılıkta kullanılan katılar bu iki özelliklerin arasında bir yerde konumlanmaktadır. Doğrusal ve daha az kapsamda doğrusal olmayan viskoelastik teorisi katılarda uygulanan strese karşı kantitatif olarak eşzamanlı elastik ve viskoz deformasyonu açıklamak için geliştirilmiştir.

Ufalanma esnasında harcanan enerji sonuç olarak yeni oluşturulan parçacıkların yüzeyinde yüzey enerjisi şeklinde, kristal yapısı değişimi ile alakalı iç serbest enerji ve ısı üretimi ile ortaya çıkar. Tahmini olarak toplam mekanik enerjinin %1 ya da daha azı yeni oluşturulan yüzey alanı ya da kristal örgüde değişiklik için kullanılır.

Öğütme işlemi matematiksel olarak açıklanmaktadır. Öğütme ile ilgili teori kantitatif olarak öğütme ekipmanının gerçek performansını öngörecektir kadar

geliştirilememiştir. Ancak 3 adet yasa geliştirilmiştir. Bunlar Kick, Rittinger ve Bond yasasıdır.

Toz etmede kullanılan ekipmanların keskin sınırları yoktur ancak besleme yapılacak maddenin boyutları ve çıkacak maddenin boyutlarına göre genel bir sınıflandırma yapılmaktadır.

1. Kaba öğütme yapan öğütücüler
2. Orta seviye öğütme yapan öğütücüler
3. İnce seviye öğütme yapan değirmenler

İlk kategorideki ekipmanlar besleme yapılan maddenin 2-150 cm arasından büyük materyal boyutlarında kullanılır. İkinci kategorideki 20-200 mesh aralığında (sırasıyla 850 μ m ile 75 μ m) partikül boyutu sağlamaktadırlar. Üçüncü kategori değirmenlerin ürettikleri tüm partiküller 75 μ m elekten geçmektedirler.

Orta ve ince seviyede öğütme yapan değirmenler üç temel hareket ve bu hareketlerin kombinasyonu ile etki ederler.

1. Aşındırma

Maddenin iki yüzey arasındaki sürtünmesi ile boyut küçültme işlemidir. Bu işlem özellikle lifli yapıda maddeler için liflerin toz haline getirilmesinde kullanılmaktadır.

2. Silindirle ezmeye

Bu yöntem silindirler arasında ezmek ve ufalamak için ağır yuvarlama elemanları kullanır.

3. Vurma

Bu yöntem çekiçlerin hızlı dönmesi ile etki eder. Maddenin topaklarının birbirlerine ve değirmen duvarlarına çarpmasını sağlar. Bu darbe büyük partiküllerin ayrılmasına ve istenen partikül boyutuna gelinceye kadar devam etmesi ile sonuçlanır. Bazı örneklerde yüksek hızlı hava ya da santrifuj kuvvetleri yüksek darbe hızı oluşturmak için kullanılır.

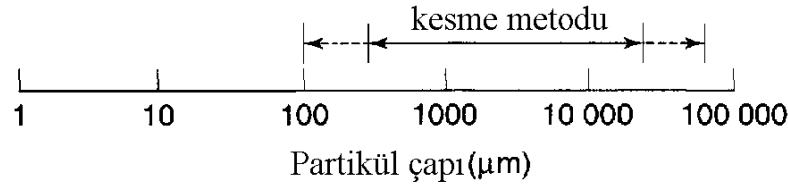
Birçok farklı toz etme yöntemi bulunmaktadır ancak kullanılan toz etme ekipmanı uygulanan metoda göre sınıflandırılmaktadır [77]. Ortalama boyutlar kesme toz etme yöntemine göre değişebildiği gibi boyutlandırmada değirmenin tipine göre değirmenin çalışma süresi de önemlidir.

Kesme metodu

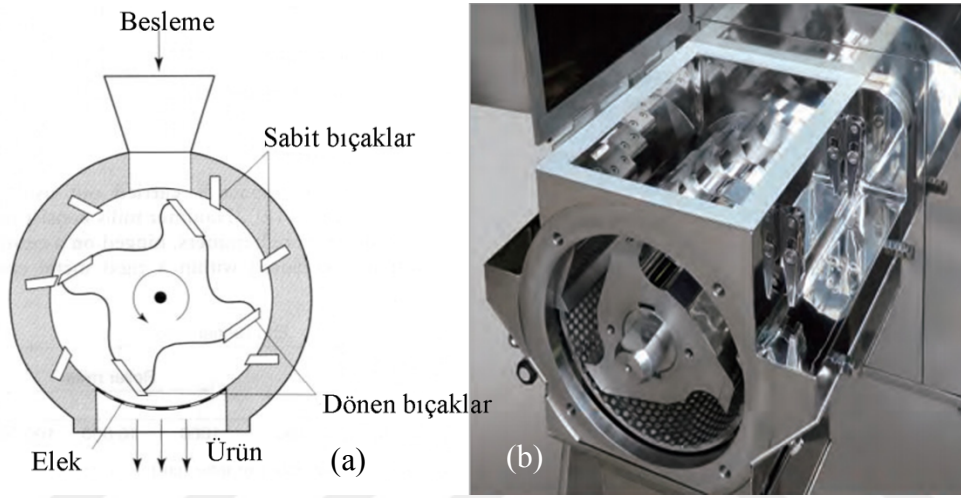
Kesme değirmeni bir seri bıçağın yatay döner aksama sabitlenmesi ve değirmenin sabit kasasına sabitlenmiş bıçakların arasında dönmesiyle oluşur. Ufalanma esnasında boyut küçültme işlemi iki bıçak seti arasındaki aralık ile oluşur. Bu aralık çok az milimetrelere denk gelir. Değirmen kasasının altında sabitlenmiş bir elek bulunur ve maddenin yeterli partikül boyutuna gelinceye dek değirmenin içerisinde tutulmasını sağlar(Şekil 2-10 (a), (b)).

Kesme değirmenlerindeki yüksek parçalama sayesinde tablet haline gelmeden önce kuru granülasyon aşaması ve kabuk, kök gibi fibröz kaba drogların

ekstraksiyonundan önce kullanılır [78]. Kesme metodu ile ulaşılabilen partikül boyutlandırma aralıkları Şekil 2-9'da gösterilmiştir.



Şekil 2-9 : Kesme metoduna göre boyut küçültme aralığı [78] kaynağından

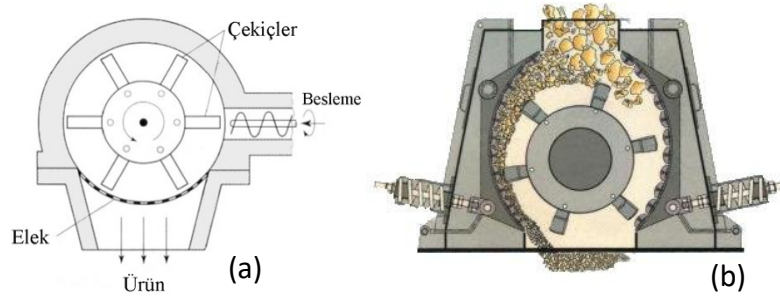


Şekil 2-10 : Kesme Değirmeni (a) [78] , (b) [79] kaynağından

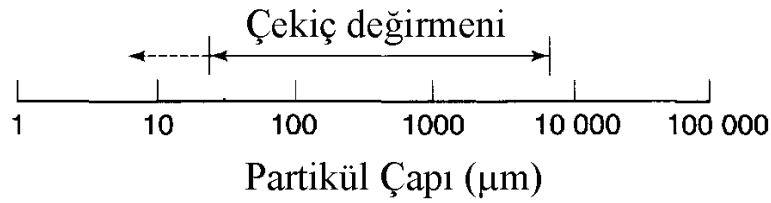
Basınç metodu

Vurma ile boyutlandırma işlemi çekiç değirmeni ile yapılır. Çekiç değirmenleri dört ya da daha fazla çekicin ortada dönen bir şafta bağlanarak dönmesi ve çevresinin metal bir yuva ile kapatılması ile boyutlandırma yapar. Çekiçler sabit ya da salım yapacak şekilde şafta tutturulmuştur. Çekiç değirmenleri 10-10.000 µm aralığında partiküller oluşturmak için kullanılabilir.

Boyutlandırma esnasında değirmen çalışırken çekiçler merkez şaft çevresinde dönerek sallanırlar. Çekiçlerin dönüş hızı 80 sn^{-1} 'e kadar ulaştığı için birçok partikülün parçalanmasına yetecek kadar yüksektir. Durağan haldeki partiküllere çarpan çekiç ile partikül boyutundaki önemli küçülme devam ederken oluşan partiküllerin daha fazla parçalanması giderek azalmaktadır. Böylece çekiç değirmenler dar partikül boyut aralığına sahip toz üretimine uygun olabilir. Partiküller yeteri kadar parçalanana dek toplama kabına ulaşmadan önce bulunan elek ile alıkonulurlar. Eleği aşan toz partikülleri elek boyutundan çok daha düşük boyutta olabilirler. Partiküller değirmenin içinde dönerken çekiçler tarafından taşınır ve eleğe teğetsel olarak ulaşırlar (Şekil 2-11(a), (b)). Bu nedenle balık sırtı, kare ve dikdörtgen şeklinde delikleri bulunan elekler kullanılır. Değirmende boyutlandırma yapılacak maddeye göre çekiçler kare yüzölçümlü, uç kısma doğru incelen ya da kademeli şekilde olabilir [78]. Boyutlandırma aralıkları Şekil 2-12'de gösterilmiştir.



Şekil 2-11: Çekiç Değirmeni (a) [78] kaynağından (b) [80] kaynağından



Şekil 2-12: Çekiç değirmeni ile partikül küçültme metoduna göre partikül boyut aralığı [81] kaynağından

2.3.1.2. Tozların Karıştırılması

Tozların karıştırılması homojen bir karışım elde etmek için önemli aşamalardan biridir. Karıştırma büyük ve küçük parçacık gruplarının hatta birbirinden farklı partiküllerin karıştırılmasıdır [77, 82]. Partiküllerin karıştırılması ile bulk içerisinde bulunan partiküller rastgele dağılır.

Karışımlar da üç alt başlıkta incelenebilir.

- Pozitif Karışımlar: Spontane olarak geri dönüşümsüz difüzyon ile karışırlar ve mükemmel karışıma yaklaşırlar. Eğer karıştırma süresi sınırsız ise enerji vermeye gereksinim yoktur buna rağmen pozitif karışımlar istenilen derecede karışım için gerekli zamanı kısaltmaktadır.
- Negatif Karışımlar: Bileşenler birbirinden ayrılmaya meyillidir. Eğer bu hızlı şekilde oluyorsa bileşenleri yeterli diperse halde tutmak için devamlı enerji verilmesi gereklidir. Örneğin Süspansiyon formülasyonları, düşük viskozitede dağılmış olan katı dispersiyonlar.
- Nötral karışımlar: Bileşenler sabit yapıdadır ve karıştırma işlemine mazur kalmadan kendiliğinden karışma ya da ayrılmaya eğilimleri yoktur. Bu karışımlara örnek karışmış tozlar, pastalar ve pomatlardır.

Toz karışımları nötral karışımlardır. İşlem esnasında karışımın tipi değişebilir. Örneğin süspansiyonlar için viskozitenin artması durumunda karışım negatiften nötrale değişebilir. Benzer olarak partikül büyüklüğü, ıslanma derecesi ve sıvı yüzey geriliminin değişimi karışımın tipini değiştirebilir [83].

Tozların karıştırılmasında üç önemli mekanizma bulunmaktadır:

- Göreceli olarak büyük bölümde tozun bir bölümden başka bir bölüme konvektif hareketi
- Kayarak karıştırılma (segregasyon oranını düşürür)
- Diffüzyon karıştırılma [77]

En verimli karıştırıcılar yukarıda sayılan üç mekanizmayı da kullanarak yürütürler. Karıştırma işlemi büyük ve küçük partikül gruplarının ve hatta farklı partiküllerin rastgele karıştırılması işlemidir. Ancak karıştırma işleminde istenildiği gibi randomize hareket ile karıştırma sonucunda randomize karışmış bir toz karışımı elde edebilmek için diğer faktörlerin karıştırmayı etkilememesi gerekir. Bu durum pratikte oluşturulması zor bir olasılıktır. Tozlara ait özellikler bu şekilde tamamen randomize karışımı etkileyecektir. Partiküllerin yapışma ve kayganlık gibi özellikleri diğer faktörlerle birlikte karışımın sonucu için değerlendirilmelidir. Etkileyen faktörlerden örnek olarak elektrostatik özellikler ile partiküllerin arasında oluşan çekme kuvvetleri ile randomize karışım imkansız hale gelebilir [77].

Verimli bir karıştırmayı etkileyen etkenler şunlardır:

- Partikülle ilgili özellikler: Partikül büyüklüğü, şekilleri
- Kullanılan karıştırıcı tipi: Hız, Zaman, Toz yığını, Hareket
- Kullanılan toz karışımlarının dansite farkına göre segregasyona yatkınlığı [82]

Tozlar karıştırıldıktan sonra paket, saşe gibi paketleme işlemine tabi tutulur ya da veteriner dozaj şekillerinde bulunan premiksler gibi daha büyük paket boyutlarında olabilirler.

Toz karışımı birimlere bölündükten sonra (saşe, paket) her birimin taşıdığı etken maddenin istenen sınırlar içerisinde olduğunu tespit etmek amacıyla içerik düzgünlüğü testi yapılır.

Toz karışımlarının karıştırılmasında kullanılan cihazlar aşağıda gösterilmiştir.

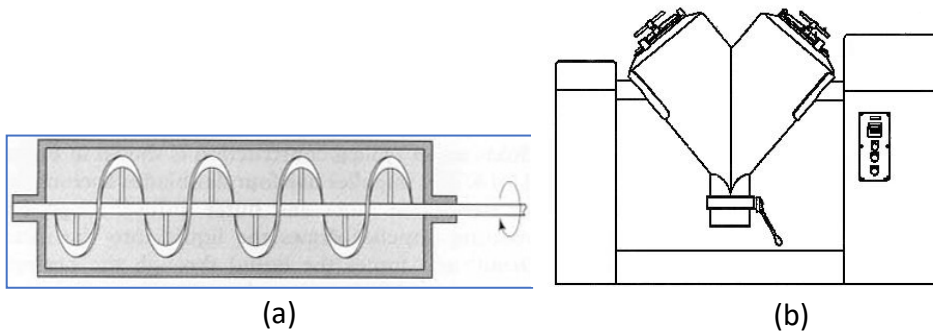
2.3.1.3. Tozların Karıştırılmasında kullanılan cihazlar

Toz karışımlarının tek düzeliğinde karıştırma süresi kadar tercih edilen karıştırma şekli de önemlidir. Daha önce belirtilen karıştırmanın konvektif, difüzyon ve kayarak karıştırma prensiplerini kullanarak karışım sağlanmaktadır.

İdeal bir karıştırıcı tamamiyle iyi bir harmanlama sağlamalı ve temizlenmesi, boşaltılması kolay olmalı, tozları sızdırmayan, bakımı, onarımı kolay ve düşük güç tüketimine sahip olmalıdır.

Seri karıştırma yapan karıştırıcılara örnek olarak dönen tambur tipi karıştırıcılar, kübik karıştırıcılar, V tipi karıştırıcılar (Şekil 2-13 (b)) , çift konili karıştırıcı olarak örnek verilebilir.

Ayrıca toz ve granül karıştırmada kullanılan kurdeleli (dikey ve yatay ribbon) (Şekil 2-13 (a)) karıştırıcılar ve planetary karıştırıcılarda toz karıştırmada kullanılmaktadır [84].



Şekil 2-13 : Kullanılan karıştırıcı tipleri
(a) Ribbon karıştırıcı [85], (b) V karıştırıcı [86]

2.3.1.4. Toz karışımlarının hazırlanmasında karşılaşılan problemler

Segregasyon karıştırmanın tam tersine tozların ayrışmasıdır. Bu toz formülasyonlarının hazırlanmasında önemlidir. Hazırlanan karışım randomizeden randomize olmayana dönüşebilir ve randomizasyona bir daha ulaşamayabilir. Segregasyondan kaçınmak için hazırlanan formülasyonun doldurma işlemine kadar taşınmasına dikkat edilmelidir. Segregasyon içerik düzgünlüğünün sağlanamamasına sebep olmaktadır. Segregasyonun çeşitli sebepleri bulunmaktadır. Segregasyonun sebepleri aşağıda başlıklar halinde belirtilmiştir.

Partikül büyüklüğünün etkisi

Partikül büyüklüğündeki farklılıklar segregasyonun ana sebeplerindendir. Küçük partiküller büyük partiküllerin arasındaki boşluklardan düşme eğilimindedirler ve böylece kütlenin alt kısımlarına doğru hareket ederler. Buna perkolasyon segregasyonu denir.

Çok küçük partiküllerin havanın türbülansı ile havalandığında karıştırmanın durması, ya da tozun aktarılması sonrası havadaki küçük partiküllerin büyük partiküllerin üzerine yağması ile üst kısmında ince toz tabakası oluşmasına yıkayarak ayırma (elutriation) segregasyonu denilir.

Karıştırma esnasında büyük partiküller daha büyük kütleye sahip olduklarında daha yüksek kinetik enerjiye sahip olurlar ve karıştırma bitinceye kadar daha çok mesafe kat ederler. Bu farklı partikül büyüklüğündeki materyallerinde ayrışmasına sebep olur. Buna gezinge (trajectory) segregasyonu denilir.

Partikül yoğunluğunun etkisi

Partikül büyüklüğü aynı olsalarda dansitesi büyük olan partiküller aşağı doğru hareket ederler. Gezinge segregasyonu aynı partikül büyüklüğüne sahip partiküllerin dansiteye bağlı farklı kütlelerde olması sebebiyle görülebilir. Perkolasyon segregasyonu daha yüksek dansitedeki partiküllerin daha küçük partikül büyüklüğüne sahip olması sebebiyle görülebilir.

Alternatif olarak partikül büyüklüğü ve dansite etkisi eğer büyük partiküller daha büyük dansiteye sahipse birbirini sönmüleyebilir.

Partikül şekillerinin etkisi

Küresel partiküller iyi akışkanlık özelliği gösterirler ve daha kolay karıştırılırlar ancak küresel olmayan partiküllere göre daha kolay ayrışırlar. Şekilsiz ve iğne yapıdaki partiküller kilitleme yaparak karışmadan sonra segregasyonu engelleyebilirler. Küresel olmayan partiküller yüzey alanı/ kütle oranı küresel partiküllere göre daha yüksektir. Bu da kohezif etkiyi artırarak segregasyonu engeller ancak bu durum düşük partikül boyutlarında tozlaşmayı artıracaktır [84].

2.3.1.5. Tozlarda yapılan kontroller

Toz formülasyonların formülasyon karakterizasyonunda yararlanılan testler aşağıda belirtilmiştir. Bu testlerin bazıları Avrupa Farmakopesi'nde (AF 7.0) kayıtlı iken bazıları üretilen formülasyon için geliştirilmiştir.

2.3.1.5.1. İçerik homojenite testi

Bu test hazırlanan formülasyona özel olarak geliştirilmiş olup farmakopedeki içerik tekdüzeliğinden farklıdır. Hazırlanan formülasyon bileşenlerinin homojen karışıp karışmadığını anlamak amacıyla bakılan bir yöntemdir.

2.3.1.5.2. Tek dozluk preparatlarda ağırlık sapması tayini

Randomize seçilmiş, ayrı taşıyıcılarda bulunan tek dozluk preparatlar ayrı ayrı tartılır ve 20 içeriğin ortalaması hesaplanır. 2 preparatın 300 mg ve üstü tozlar için belirtilen %7,5 sınırının üstünde sapma göstermemesi ve hiç bir preparatın bu ortalama %15 oranında sapmamış olması gerekir [87].

2.3.1.5.3. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini

Partikül büyüklüğünün tespit edilmesi için kullanılan yöntemler Tablo 2-3'te belirtilmiştir.

Tablo 2-3: Partikül büyüklüğü tayin yöntemleri [77]

Partikül büyüklüğü ve Dağılımı Tayin Yöntemleri	Ölçüm Aralıkları (µm)
Mikroskop Yöntemi (Sırasıyla Elektron-Ultramikroskop-Optik)	0,001-0,2 0,01-0,1 0,2-100
Elek Analizi	10-10 000
Sedimentasyon Yöntemi Santrifuj Ultrasantrifuj	1-1000 0,01-1 0,001-0,01
İletkenlik Yöntemi- Coulter Sayacı	0,1-1000
Lazer Işık Saçılımı Yöntemi	0,1-3000
Foton Korelasyon Spektroskopisi	2-2500

Optik mikroskop

Optik Mikroskop yöntemi (AF 7.0) genellikle 1 µm'nin üzerindeki partiküllerin karakterizasyonunda kullanılır. Daha düşük boyutlarda ölçüm mikroskobun özelliklerine bağlıdır. Üst limit alt limite göre daha belirsiz sınırları vardır ve bu sınırlar büyük partiküllerin karakterizasyonundaki zorluklar sebebiyle sınırlanmıştır. Optik mikroskop küresel olmayan partiküllerin karakterizasyonunda kullanışlıdır. Bu metot aynı zamanda daha hızlı ve daha rutin uygulanabilecek, geliştirilecek metotlar için bir veri oluşturabilir [87].

Partikül büyüklüğü dışında karakterizasyonda partikül şekilleri de AF 7.0'da belirtilmiştir. İğne (ince, genişlik ve incelik benzer iğne benzeri), sütun (iğneye göre daha kalın genişlik ve incelik), pul (ince, düz, benzer uzunluk ve genişlik), levha (uzun, ince, bıçak benzeri), eşboyutlu (benzer genişlik, uzunluk, incelik) şekilleri tanımlamalarda en sık kullanılan şekillerdir [87].

Elek Analizi

Elek analizi yöntemi (AF 7.0) toz ve granüllerin partikül büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan en eski metotlardan biridir. Dokunmuş elekler kullanılarak yapılan bu işlemle partiküller ortalama boyut ölçeğine göre ayrılacaktır. Elek analizi yönteminin kullanılması toz örneğinde çoğunluğun 75 µm üzerinde olduğu durumlarda en uygundur. Daha küçük partiküllerde eleme esnasında uygulanan kuvvetler partikülün adhezyon ve kohezyonunu aşmaya yetemez ve partiküller elek üzerinde kalırlar. Bu tarz materyaller için jet elek ve ultrasonik eleme daha uygun olabilir.

Elek analizi yönteminde diğer bir kısıtlayıcı durumlarda bulunmaktadır. Örnek olarak kayda değer miktar toz numunesi gerekmektedir. Normalde en az 25 g gereklidir. Bu miktar toz ya da granülün yoğunluğuna ve test eleklerinin açıklığına bağlıdır. Başka bir kısıtlayıcı durum ise test numunesinin yağlı ya da kohezif olması ve elekleri tıkamasıdır. Bu metod ile 2 boyutlu bir boyut tahmini yapılmaktadır çünkü elek açıklıklarından geçiş partikülün uzunluğu yerine genişlik ve inceliğine daha çok bağlıdır.

Bu metot tek bir maddenin toplam partikül büyüklüğü dağılımı belirlemek için tasarlanmıştır. Monograflarda ayrıca belirtilmediği müddetçe partikül büyüklüğü dağılımının bulunması kuru eleme yönteminde anlatılmaktadır. Eleklerde titreşim ile son noktaya ulaşma işlemi zorsa (örneğin test örneğin deliklerden geçmesi zorsa) ya da 75 µm altında partikül boyutları ile çalışılması gerekiyorsa daha farklı ölçüm yöntemlerinin düşünülmesi gerekebilir.

Eleme işlemi test örneğinin nem çekme ya da kaybetme gibi bir durumla karşılaşmayacağı ortamda gerçekleştirilmelidir. Testin uygulandığı ortamın rölatif nemi test örneğinin nem çekme ya da kaybetmesini engelleyecek şekilde kontrol edilmelidir. Aksi bir durumla karşılaşmadığı müddetçe elek analizi testi ortam nemi ile gerçekleştirilir. Özel şartların istenildiği durumlar maddenin kendi monografında detaylandırılmalıdır [87].

Analiz test elekleri (Tablo 2-4) örülmüş kablo ağından oluşmaktadır. Açık silindir şeklinde tabanında neredeyse kare şeklinde açıklıkları bulunan elekler ile test gerçekleştirilir.

Eleme yönteminde tek bir farmasötik toz için partikül büyüklüğü dağılımı en az yüzde 80 partikülün 75 µm ve üstü olmasına göre tasarlanmıştır.

Tablo 2-4: Bazı elek boyutlarının Amerikan ve Avrupa Farmakopelerindeki Elek numaraları [87]

ISO Nominal Açıklık	US elek numarası	Avrupa Elek Numarası
500 µm	35	500
355 µm	45	355
250 µm	60	250
180 µm	80	180
150 µm	100	180
90 µm	170	90
75 µm	200	75
53 µm	270	53

Test materyalinin elektrostatik yük oluşturduğu biliniyorsa yüklenmenin analizi etkilemediğinden emin olunmalıdır. Bir antistatik ajan kolloidal silikon dioksit veya alüminyum oksit %0,5 oranında (a/a) katılarak bu etki en aza indirilebilir. Eğer bu şekilde etki azaltılamıyorsa alternatif bir partikül boyut analiz yöntemi seçilmelidir.

Sallama metodunun elek analizi yönteminde önemli etkisi bulunmaktadır. Bir çok farklı elek ve toz sallama cihazı elek analizi için piyasada bulunmaktadır. Ancak farklı sallama metotları farklı eleme analizi sonuçlarına ve farklı son nokta tespitlerine neden olmaktadır. Çünkü test esnasında her bir partiküle etki eden kuvvetin büyüklüğü ve tipi farklıdır. Uygulanan mekanik sallama metodu ya da elektromanyetik sallama dikey salınım, yatay dairesel salınım, vurma ya da vurma ve yatay dairesel salınım birlikte olacak çeşitli şekillerdedir. Sonuçlarda hangi sallama metodunun kullanıldığı ve sallama parametreleri bulunmalıdır. Sallama durumundaki değişiklikler elek analizi sonuçlarının ve son noktanın tespitinde değişikliklere neden olabilir.

Elek analizinde iki yöntem AF 7.0'da belirtilmiştir. Mekanik sallama (Kuru eleme metodu) ve jet eleme ve ultrasonic eleme kullanılmaktadır.

Eğer mekanik kuru eleme yönteminde herhangi bir elekte agregre olmuş partiküller bulunursa başka bir analiz metodu bu toz numunesi için daha uygun olabilir.

Toz partikülleri eleme sonucunda kümülatif partikül büyüklüğü elde edilir. Partikül büyüklükleri aşağıdaki gibi karakterize edilebilir:

X_{90} = Kümülatif %90 partikül büyüklüğünün altında kalan partikül büyüklüğü

X_{50} = Ortalama Partikül Büyüklüğü (Bu boyutun %50'si bu partikül boyutundan büyük %50 kadar kısmı bu partikül boyutundan küçüktür)

X_{10} = Kümülatif %10 partikül büyüklüğünün altında kalan partikül büyüklüğü
 d sembolü de sıkça kullanılmaktadır. Örnek olarak d_{90} , d_{50} , d_{10} şeklinde gösterilebilmektedir.

$Q_r(X)$ = X değeri partikül büyüklüğünün bu değere eşit ya da daha küçük olmasını göstermektedir. Ve r değeri dağılımın tipini tanımlamaktadır (Tablo 2-5) [87].

Tablo 2-5 : Partikül büyüklüğü tanımlanmasında kullanılan $Q_r(X)$ değerinde r nin tanımladığı dağılım tipleri [87]

r	Dağılımın tipi
0	Sayı
1	Uzunluk
2	Alan
3	Hacim

Tanım olarak:

$X = X_{90}$ olduğunda $Q_r(X) = 0,90$

$X = X_{50}$ olduğunda $Q_r(X) = 0,50$

$X = X_{10}$ olduğunda $Q_r(X) = 0,10$

Alternatif ve daha az bilgi verecek şekilde toz partikül büyüklüğünü tanımlayan metod Tablo 2-6'daki aralıkların kullanılmasıdır.

Tablo 2-6 : Tozların partikül büyüklüğüne göre sınıflandırılması

Tanımlayıcı terim	X_{50} (μm)	Hacim bazlı kümülatif dağılım, $Q_3(X)$
Kaba	>355	$Q_3(355) < 0,50$
Orta ince	180-355	$Q_3(180) < 0,50$ ve $Q_3(355) \geq 0,50$
İnce	125-180	$Q_3(125) < 0,50$ ve $Q_3(180) \geq 0,50$
Çok ince	≤ 125	$Q_3(125) \geq 0,50$

2.3.1.5.4. Küme ve Sıkıştırılmış Dansitelerin Tayini

Küme dansitesi sıkıştırılmamış tozun kütlelerinin hacmine oranıdır. Bu hacim içerisinde partiküller arasındaki boşluklar da dahildir. Bundan dolayı küme dansitesi hem tozun dansitesine hem de boyutsal olarak partiküllerin toz yatağındaki düzenine bağlıdır. Küme dansitesi mililitrede bulunan gram olarak söylenir çünkü ölçüm mezürde yapılır ancak uluslararası birim metre küpte bulunan kilogramdır. Santimetre küpteki gram olarak da ifade edilir.

Tozun küme özellikleri hazırlanması, işlenmesi ve saklanma koşullarına bağlıdır. Partiküller küme dansitesi ile paketlenirler toz yatağına olan az miktardaki müdahalede bile küme dansitesi değişebilir. Ek olarak tozun küme dansitesi iyi tekrarlamalarda zor ölçümlenebilir. Bu nedene ölçümün nasıl yapıldığı detaylandırılmalıdır [87].

Sıkıştırılmış dansite: kap içerisinde bulunan toz örneğinin mekanik vurma hareketi sonrası yükselmiş küme dansitesidir. Sıkıştırılmış dansite toz örneğini içeren dereceli mezür ya da kabın mekanik olarak vuruşu ile elde edilir. Başlangıç toz hacmi ya da kütlelerini elde ettikten sonra ölçüm yapılan mezür ya da kap ile mekanik olarak vuruş yapılır. Kütle ve hacimdeki değişimler gözlenir. Mekanik vuruş yöntemi yükselen

silindir ve kabın kendi kütlesi ile düşmesi ile uygulanır [77]. Avrupa Farmakopesi 7.0'a göre % sıkışabilirlik değerine denk gelen akıcılık dereceleri Tablo 2-7'de gösterilmiştir.

Tablo 2-7: Avrupa Farmakopesi % Sıkışabilirlik Sonuçlarına göre Akıcılık Dereceleri [87]

% Sıkışabilirlik (yüzde)	Akıcılık	Hausner oranı
1-10	Mükemmel	1.00-1.11
11-15	İyi	1.12-1.18
16-20	Fena Değil	1.19-1.25
21-25	Zayıf	1.26-1.34
26-31	Kötü	1.35-1.45
32-37	Çok Kötü	1.46-1.59
> 38	Çok Çok Kötü	> 1.60

2.3.1.5.5. Yığın Açısı ve Akma Süresi Tayini

Avrupa Farmakopesi (AF) 7.0 da belirtildiği şekliyle toz kütlesinin sabitlenmiş bir koniden geçerek yığın oluşturmaya sağlanır. Sabitlenen koninin materyali cam, metal, plastik olabilir. Avrupa Farmakopesi 7.0'a göre tavsiye edilen yığının en üst noktası ile huni arasında 2-4 cm boşluk olmasıdır bu şekilde tozun en üst noktasına akma esnasında düşen tozların etki etmesi en aza indirilmektedir. Tozun aktığı zemin ve huni sabit ve titreşimsiz olmalıdır. Akan tozun oluşturduğu yığın simetrik bir şekilde oluşturulamazsa ve tekrarlanamıyorsa bu metod uygun değildir. Yığın açısını belirlemek için aşağıdaki formülasyon uygulanır. Toz akış özelliklerinin belirlenmesi için 3 seri örnek ile bakılır.

$$\tan(\alpha) = \frac{\text{Yükseklik}}{\text{Taban} \times 0,5}$$

Bulunan açı (α) aşağıdaki tabloya göre tozun akış özelliklerini belirler.

Akıcılık belirli katı maddelerin (tozlar ya da granüller) belirlenmiş şartlarda dik şekilde akma yetisinin hesaplanmasıdır [87]. Saniyede akan toz miktarı gram cinsinden hesaplanır. Avrupa Farmakopesi 7.0'a göre oluşan yığın açılarına denk gelen akış özellikleri Tablo 2-8'de gösterilmiştir.

Tablo 2-8: Avrupa Farmakopesi Yığın Açılımları Karşılığında Gelen Akış Özellikleri [87]

Akış Özelliği	Yığın Açısı (derece)
Mükemmel	25-30
İyi	31-35
Fena değil (yardım gerekmez)	36-40
Orta (Asılı kalabilir)	41-45
Kötü (Sallama, vibrasyon gerekir)	46-55
Çok Kötü	56-65
Çok Çok Kötü	> 66

2.3.2. Süspansiyonlar

Süspansiyon tanım olarak çözünmeyen ve iyi boyutlandırılmış partiküllerin sıvı ortam içerisindeki kaba dispersiyonlarıdır [88]. Oral yoldan uygulanan katı dozaj şekilleri dışında tercih edilen formülasyon çeşidi olarak süspansiyon formülasyonları gösterilebilir. Süspansiyon formülasyonları verilecek olan etken maddenin özelliklerine göre tercih edilmektedir. Özellikle suda çözünürlüğü düşük ve çözelti formunda stabilite problemi olan etken maddelerde tercih edilen bir dozaj şeklidir.

İyi hazırlanmış bir süspansiyon formülasyonunun bazı özellikleri karşılaması gereklidir. Öncelikle partiküllerinin ortam içerisinde dağıldıktan sonra hemen çökmeyecek partikül büyüklüğünde olmaları gereklidir. Ancak çökme gerçekleştiğinde de kekleşme olmamalıdır. Az bir uğraşı ile tekrar eski haline gelmelidir. Bu özelliklerin irdelenmesi için bazı kavramların açıklanması gereklidir.

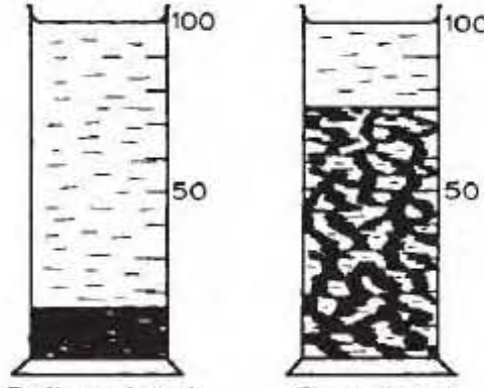
Floküle ve defloküle sistemler

Uygun bir ıslatıcı ajan katılmadan önce süspansiyonun floküle mi defloküle mi olduğunun belirlenmesi gerekir. Süspansiyonun hangi fiziksel özelliklerde olduğu partiküllere etki eden itme ve çekme kuvvetlerinin bir sonucudur [89].

Defloküle sistemlerde dağılan partiküller farklı birimlerden oluşmaktadır ve her bir partikülün çökme oranı her bir partikülün büyüklüğüne bağlıdır. Defloküle süspansiyonun süpernatant kısmı bulanık kalmaktadır. Bunun sebebi büyük partiküller çökmüşken daha küçüklerinin çökmesi daha uzun sürmektedir. Her bir partikülün arasındaki itme kuvvetleri çökerken birbirleri üstünden kaymalarını sağlar. Yavaş çökme sıvısının çökelti içinde hapsedilmesine neden olur ve redispersiyonu zorlaştırır. Bu durum kekleşme olarak adlandırılır ve süspansiyonlarda karşılaşılan en önemli fiziksel stabilite problemidir [89].

Floküle sistemlerde ise partiküllerin agregasyonu çok daha hızlı bir sedimentasyonu tetikler. Çöken agregat olmuş partiküller gevşek şekilde bağlanmıştır ve aralarında ortam sıvısının geçmesi mümkündür. Bu nedenle çökme sırasında ortam sıvısı partiküllerin arasından ve çevresinden geçebilir. Çöken kısım yapısı da floküle

sistemlerde defloküle olanlara göre farklıdır. Son çöken hacim defloküle sisteme göre daha yüksektir ve redispersiyonu mümkün ve daha kolaydır.



Şekil 2-14 :Defloküle süspansiyon ve floküle süspansiyon [88]

Sedimentasyondan korunmak için yüksek viskozitede oluşturulan defloküle sistem ideal bir formülasyon olabilir ancak bu çökmenin olmayacağı anlamına gelmez. Bu nedenle kontrollü flokülasyon ile bu durumunun üstesinden gelinebilir.

Kontrollü flokülasyon partikül büyüklüğü kontrolü, zeta potansiyelini kontrol etmek için elektrolit eklenmesi ve partiküllerin çapraz bağlanması için polimer eklenmesi gibi kombine şekilde elde edilebilir. Bazı polimerler ise iyonize olmasının avantajı ile hem elektrostatik hemde sterik engel oluşturarak etki edebilir. Bu polimerler polielektrolitler olarak isimlendirilir.

Rekonstitüye Süspansiyon Formülasyonları

Hazırlanacak süspansiyon formülasyonunda etken madde içeriğinin raf ömrü boyunca stabil kalması önemlidir. Eğer etken maddenin süspande halde yıkılımı toz haline göre çok daha hızlı gerçekleşiyorsa bu tip etken maddeleri içeren formülasyonlar kullanılacağı zaman dispersiyon ortamı ile karıştırılacak şekilde hazırlanır. Rekonstitüye süspansiyon formülasyonlarında istenen önemli özelliklerden biri basit çalkalama ile dispersiyonun sağlanabiliyor olmasıdır [90].

2.3.2.1. Süspansiyon Formülasyonlarında kullanılan maddeler

Süspansiyon formülasyonlarında kullanılan maddeler aşağıda açıklanmaktadır.

Flokülasyon ajanları

Bir süspansiyonu defloküle halden floküle hale getirilmek isteniyorsa bu durumda flokülasyon ajanlarının eklenmesi gerekebilir. Bunlar elektrolitler, surfaktanlar ve hidrofilik polimerlerdir.

En çok kullanılan elektrolitler sodyum asetat, fosfat ve sitrattır. Seçilecek konsantrasyon flokülasyon derecesini belirlemektedir. Fazla miktarda elektrolit ilavesi ile tekrar defloküle bir sistem elde edilebilir.

Surfaktanlar iyonik yüzey etkin maddelerin defloküle bir sistemde kullanımı yüklü partikülleri nötralize ederek flokülasyon oluşturabilir.

Polimerik Flokülasyon ajanlarına örnek olarak nişasta, aljinat, selüloz türevleri, tragacanth, karbomerler ve silikatlar verilebilir. Dallanmış zincir yapıları sistemde jel

benzeri ağ oluşturmaya ve diperse olan partiküllerin yüzeyine adsorbe olarak floküle halde tutulmalarını sağlamaktadır. Hazırlanıp karıştırılmaları esnasında karıştırma fazlaya kaçmadan yapılmalıdır. Her bir partiküle adsorbe olan polimerler partiküller arası çapraz bağlanmayı yapamazlarsa her bir partikülde oluşan hidrofilik tabaka agregasyonu engelleyecektir bu da defloküle bir sistem oluşmasına sebep olacaktır. Yüksek konsantrasyonda polimer kullanılması da benzer bir etki oluşturabilmektedir [88, 91].

Viskozite artırıcılar

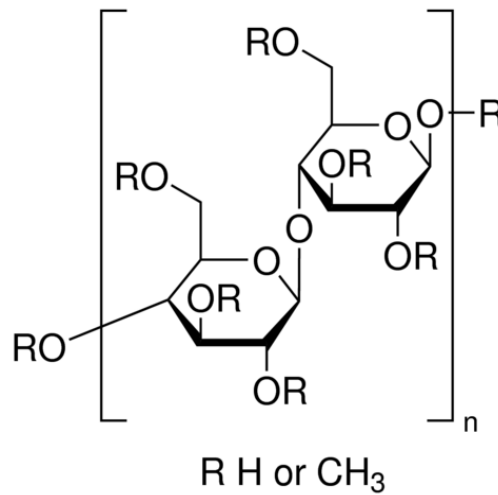
Yapılı taşıyıcılar olarak da adlandırılan viskozite artırıcılar süspansiyona kıvam verilmesini sağlar. Viskozitenin artışı ile dispers fazın ortamda daha yavaş çökmesi sağlanır. Doğal, sentetik ve yarı sentetik birçok madde viskozite artırıcı olarak kullanılmaktadır.

Polisakkaritlere arap zımkı, kitre zımkı, aljinatlar, nişasta, ksantan sakızı örnek verilebilir.

Aljinik asit, D-mannuronik asidin polimeridir. Süspansiyon özellikleri kitre zımkına benzer. Tikotropik ve psödoplastik akış özellikleri gösterir. 60 °C üzerine ısıtılmamalıdır.

Suda çözünen selüloz türevleri suda diperse olarak viskoz kolloidal dispersiyonlar hazırlanmasında kullanılır. Metil selüloz (methocel) ve karmelloz (sodyum karboksi metil selüoz) bunlara örnek gösterilebilir.

Metil selüloz (Methocel) yarısentetik polisakkarittir. Genel formülü aşağıdaki gibidir.

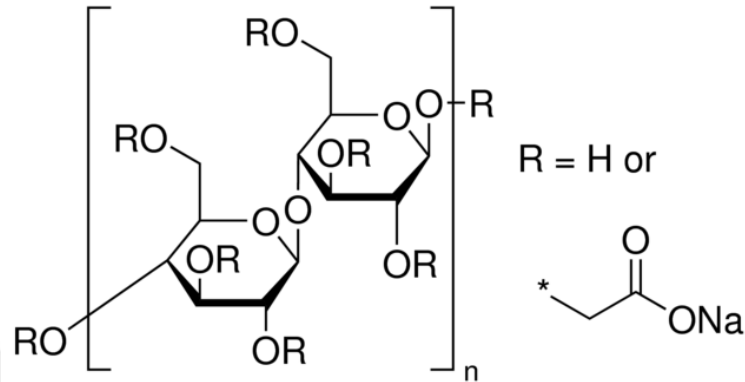


Şekil 2-15 : Metil Selüloz molekül şekli [92]

Selülozun metilasyonu ile elde edilir (Şekil 2-16). Metilasyonuna ve zincir uzunluğuna göre farklı seviyelerde bulunur. Zincirin uzaması viskoziteyi artırır. Örneğin %2 konsantrasyonda metilselüloz 20 ‘den hazırlanan karışımın viskozitesi 20 milipascal saniye(mPa s) ve metilselüloz 4500 %2 konsantrasyonu 4500 mPa olacaktır.

Bu moleküller soğuk suda sıcak sudan daha çok çözünürler o nedenle ılık suda diperse edilip soğuyana kadar karıştırılırlar. Metil selüloz non-iyoniktir ve pH 3-11 arasında stabildir ve çoğu iyonik ajan ile geçimlidir [93].

Karmelloz (Sodyum karboksimetilselüloz) genel formülü aşağıdaki gibidir.



Şekil 2-16 : Sodyum Karboksi Metil Selüloz molekül şekli [92]

Hazırlanan karmelloz dispersiyonunun viskozitesi “n” sayısına bağlıdır ve bu sayı polimerizasyon oranını gösterir (Şekil 2-17). İsmi sonuna eklenen sayı %2’lik hazırlanan solüsyonun viskozitesini gösterir. Bu selüloz türevi hem sıcak hem de soğuk suda disperse olur. pH 5-10 arasında stabildir. Toz halde ya da musilaj halde ısıtılması viskozitesini düşürür. Oral, parenteral, topikal uygulamalarda %1 oranına kadar kullanılır [93].

Islatma ajanları

Süspansiyonlarda kullanılan katı dispers fazın dispersiyon ortamında çözünmemesi süspansiyon formülasyonunun iskeletidir. Ancak dispersiyon ortamında çözünmeyen maddeler dispersiyon ortamına karşı eğer dispersiyon ortamı su ise hidrofobik özellikte olabilirler.

Su disperse edeceği madde ile karşılaştığında madde ıslanmayabilir ya da ıslanma sonrası tüm yüzey ıslanmadığı için küçük hava kesecikleri maddenin çevresinde kalarak bazı partiküllerin tam olarak ıslanmamasına sebep olabilir. Tozun çevresinde hapsolan hava kesecikleri tozun dansitesini düşüreceği için bu maddelerin yüzmesine sebep olabilir [94].

Yukarıda belirtilen problemlerin yaşanmaması için hidrofobik tozlar ile çalışılırken ıslatıcı ajanlar kullanılması formülasyonun hazırlanması için daha az enerji, zaman harcanması ve son formülasyonun tekdüze olmasını sağlamaktadır.

En çok kullanılan ıslatıcı ajanlar gliserin, alkol ve glikollerdir. Bunlar su ile karışabilirler ve hava ile sıvı ara yüzeyindeki tansiyonu düşürerek etki gösterirler. Islatıcı ajan toz içerisine penetre olur ve hava ile yer değiştirir ve dispersiyon ortamı tarafından ıslanmanın gerçekleşmesini sağlar [93].

Hidrofilik kolloitler arap zımkı, bentonit, kitle zımkı, aljinatlar, ksantan gum ve selüloz türevleridir katı hidrofobik partikülleri kaplayarak multimoleküler tabaka oluşmasını sağlarlar. Bu dispers faza hidrofilik karakter vererek ıslanmayı artırır. Bu da

ajanlar aynı zamanda viskozite artırıcı, sürfaktan olarak da kullanılabilir. Özellikle düşük konsantrasyonlarında defloküle sistem oluştururlar.

Yüzey aktif maddeler HLB değeri 7-9 arasındaki sürfaktanlar ıslatma ajanı olarak kullanıma uygundur. Yüzey aktif maddenin hidrokarbon zinciri hidrofobik partikül tarafından adsorbe olacak ve hidrofilik grubu dispersiyon ortamı tarafından ıslatılmasını sağlayacaktır. Çoğu sürfaktan %0,1 düzeyinde kullanılmaktadır. Oral süspansiyonlarda polisorbata (Tweenler) ve sorbitan esterleri (Spanlar) kullanılırken topikal uygulamalar için sodyum lauril sülfat tercih edilir [93].

2.3.2.2. Süspansiyon formülasyonlarında yapılan kontroller

Süspansiyon formülasyonlarında yapılan kontroller aşağıda sıralanmıştır.

Çökme hacmi

Süspansiyonda çöken hacminin (V_u) süspansiyonun ilk hacmine (V_0) oranına çökme hacmi (F) denir [95].

$$F = V_u / V_0$$

F değeri 0-1 arasında bir değer olarak hesaplanır ancak bazı durumlarda 1'in üzerinde sonuca ulaşılabilir. Bu tip durumlarda oluşan kümelerin gevşek bağlanmaları sonucu ilk hacimden daha geniş bir hacim oluşur [95].

Flokülasyon derecesi

Floküle sistemlerin karşılaştırılmasında flokülasyon derecesi (β) değerlendirme için daha iyi bir parametredir. Bu değer flokülü süspansiyonun çökme hacmi ile defloküle süspansiyonun çökme hacimlerinin karşılaştırılmasıdır [91, 96].

$$\beta = F_{\text{Floküle}} / F_{\text{Defloküle}}$$

Redispersiyon hızı

Hazırlanan süspansiyon formülasyonlarında partiküllerin hareketlerini etkileyen faktörler çökme, serbest yüzey enerjisi, elektrokinetik özellikler, yüzey potansiyeli, partiküller arasındaki uzaklık ve reolojik özellikler olarak sıralanabilir [94].

Çöken katı partiküllerin redispersiyonu formülasyonun kullanılabilmesi ve homojenitesi için önemli bir parametredir. Hazırlanan formülasyonlar öncelikle mezür içerisine aktarılır ve defloküle halde çökmenin oluşması beklenir. Mezürün ağız kısmı kapatılarak ters düz edilir (180° döndürme) ve tamamen redispersiyonun oluşması sağlanır. Redispersiyon için geçen süre ve ters düz etme sayısı kayıt edilir [91].

Reolojik Özelliklerin Tayini

Süspansiyonlar newtonian akış göstermezler [94]. Süspansiyonların uygulama alanına göre hazırlanacak formülasyonun istenen akış özellikleri değişiklik gösterir. Örneğin topikal uygulanacak bir formülasyonun şişeden akış esnasında kolay akması yani kuvvet uygulandığında viskozitesinin düşmesi ve kuvvet ortadan kalktığında ise daha viskoz hale geçerek uygulandığı bölgeden akmasının zorlaşması istenebilir.

Yukarıda örneği verilen sistem psödoplastik akış gösteren ve tiksotropik özelliği ile kuvvet etkisi ortadan kalktığında eski haline dönen sistem olarak gösterilebilir. Kuvvet etkisi ile viskozitesi azalan akışa psödoplastik akış, kuvvet etkisi ile

viskozitenin arttığı akışa dilatan akış denir. Ve ilk kaymanın sağlanması için kuvvet eşiği bulunan akışa da plastik akış denir [88].

Akış tiplerinin tayini için viskozimetreler kullanılır. Süspansiyonlar gibi newtonian akış göstermeyen maddeler için konsentrik (ortak merkezli) silindir viskozimetresi, koni-plak viskozimetresi ve dönen mil viskozimetresi kullanılır [94].

2.3.3. Boncuklar (Beads)

Boncuklar kontrollü ilaç salımı sağlayan, biyoyararlanımı ya da stabiliteyi artıran çoklu parçacıklı ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Boncuklar aynı zamanda terapötik aralıkta dalgalanmaları azaltan, yan etki görülmesini düşüren, dozlama aralıklarını artıran ve hasta uyuncunu artıran ilaç taşıyıcı sistemlerdir [97].

2.3.3.1. Aljinik asitin özellikleri ve kullanım alanları

Aljinik asit kahverengi alglerin hücre duvarında bulunan doğal anyonik heteropolisakkarit yapısında bir bileşiktir [98]. ilk kez Standford tarafından 1880 yılında elde edilmişlerdir [99]. Aljinik asit nontoksik, biyoparçalanabilir, biyouyumlu ve hidrofil özellikleri ve kolay işlenebilirliği sayesinde ilaç taşıyıcı sistem olarak iyi bir potansiyeli bulunmaktadır [100].

2.3.3.2. Aljinat Boncuklarının hazırlanmaları

Sodyum aljinat β -D-Mannuronik asit ve α -L-guluronik asitten oluşan doğrusal bir polimerdir. Na^+ nın Ca^{2+} ile yer değiştirmesi ile ardışık α -L-guluronik bölümlerinin çapraz bağlanması ile jelleşme sağlanır [98].

Kalsiyum aljinat enzimler, lipozomlar, çeşitli etken maddelerin enkapsülasyonu ve kontrollü salımı için kullanılmıştır [100-103]. Yapısında bulunan mannuronik asit ve guluronik asit oranlarına göre hazırlanan aljinat boncuklarının porozitesi ve çözünme hızı değişmektedir [99].

Sodyum aljinatın sudaki dispersiyonuna etken madde eklendikten sonra karıştırılır. Etken maddenin sodyum aljinatın disperse edildiği dispersiyon ortamındaki çözünürlüğüne göre hazırlanan karışım katı dispersiyon ya da çözelti haline gelir. Sodyum aljinat boncuklarının istenen partikül boyutuna ulaşması için uygun delikten kalsiyum klorür çözeltisine damlatılarak çapraz bağlanma ile sertleşme sağlanır. Ardından süzülerek boncuklar kurumaya bırakılır. Kalsiyum dışından baryum, çinko, magnezyum gibi farklı katyonlar da çapraz bağlama için kullanılabilir [99].

2.3.3.3. Boncuklarda yapılan kontroller

Boncuklarda yapılan kontroller aşağıdaki gibidir.

Çap ölçümü

Yapılan çalışmalarda hazırlanan boncuklara ait çap ölçümleri optik mikroskop ve SEM ile yapılmaktadır. SEM ile yapılan görüntülemelerde boncukların yüzey morfolojisi incelenmektedir [104].

Yüklenmiş ilaç miktarı

Hazırlanmış olan boncukların ne kadar ilaç yüklendiğini tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. Boncukların ezilerek dekompoze edilmesi ile açığa çıkan yüklenmiş ilaç

belirlenen tayin yöntemine göre seçilen çözücü ile muamele edilir. Ardından çözücüye geçen miktar belirlenen miktar tayini yöntemi ile belirlenir. Başlangıçtaki tartılan boncuk ağırlıkları ile oranlanarak yüklenmiş ilaç miktarı ve boncukların içerdiği yüzde ilaç miktarı bulunabilir [105].

Aşınma testi

Dissolüsyon ortamında USP sepet içerisine yerleştirilen boncuklar farklı zaman aralıklarında dissolüsyon ortamından çıkarılarak 40 °C de etüvde ağırlıkları değişmeyinceye kadar kurutulur ve ardından başlangıç ağırlıklarına göre değişim miktarı ve yüzdesi hesaplanır [104].

İn vitro ilaç salımı

Boncuklar Amerikan Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesine kayıtlı dissolüsyon yöntemleri ile incelenirler. Boncukların hazırlanma amaçlarına kontrollü salım ve direk salım özelliklerine göre farklı dissolüsyon ortamlarında zamana karşı yüzde salım miktarları belirlenebilir [104, 106].

2.3.4. Peletler

Peletler eczacılık alanında genellikle ekstrüder cihazı ile üretilmektedir. Pelet formülasyonu eczacılık alanında üretildikten sonra yuvarlaklaştırma işlemine de tabi tutulur. Veteriner uygulamalarında ise pelet oluşturulduktan sonra yuvarlaklaştırma işlemi yapılmadan da değerlendirilir.

Hayvancılık uygulamalarında oral yoldan uygulanan yem katkı maddelerinin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen yöntemlerden birisi pelet oluşturulmasıdır. Uygulanacak yem katkısındaki tüm bileşenlerin tek bir komponent altında toplamak ve bu sayede paketleme sırasında ve sonrasında hazırlanan ürünün tekdüzeliğini devam ettirmek amacıyla sıkça tercih edilir. Özellikle düşük miktarda bulunan iz minerallerin hazırlanan tüm formüle eşit dağılımından emin olmak ve hazırlandıktan sonra da segregasyona uğramaması için tercih edilen bir yöntemdir.

Ekstrüderde yem katkısı hazırlama için yapılan işlemler eczacılıktaki üretilen peletlere göre daha geniş aralıkta işlem parametrelerine sahiptir. Üretilen peletlerin boyutları uygulama yapılacak hayvan grubuna göre belirlenir.

Eczacılık alanında pelet uygulaması yuvarlaklaştırma işlemi ile beraber yürütülür. Ekstrüder cihazına alınmadan önce karıştırılacak toz ya da granül içeriğinin bağlayıcı ilavesi ile granülasyon işlemine tabi tutulması gerekir.

Ekstrüder vida benzeri dönen bir shaftın belirli hacimde boş bir silindir şeklin içinde dönmesi esnasında belirli miktar bağlayıcı ilavesi ile granüle hale gelmiş karışımı yine istenen büyüklüğe göre açıklığı ayarlanmış deliklere doğru ittirir. Sıkışan granül, toz bağlayıcı ile beraber itirilen bölgedeki deliklerden çıkar ve birbirine bağlı, kalınlığı uygulanan delik büyüklüğüne göre değişen ip şeklinde pelet formülü meydana gelir. Bu formülde bulunan maddenin yapısına göre ekstrüderden çıkış sırasında pelet uzunlukları değişebilir.

Ekstüder cihazı yukarıda anlatılan dışında farklı yöntemler kullanarak da boyutlandırma yapabilir. Farklı ihtiyaçlara göre belirlenen ekstrüder cihazlarında amaç hazırlanan karışımın güç uygulanarak belirli büyüklükteki delikler/elekten geçirerek aynı kalınlığa sahip yapılar oluşturmaktır.

Ekstrüdere ilave edilecek granül formülasyonunun oluşturulması ve işlem sonrası yuvarlaklaştırılması sırasında oluşan peletin özellikleri birçok farklı parametreye bağlıdır.

Granülasyon aşamasındaki etkili parametreler etken madde ve yardımcı madde bağlı oranları, kullanılan bağlayıcı özellikleri, etken maddenin fizikokimyasal özellikleri, ilave edilen bağlayıcı miktarı granüsyonda etkilidir. Granülasyon oluşumu için karıştırma cihazları genelde planetary mikser, high shear mikser ve sigma bıçaklı mikserlerdir [107].

Hazırlanan granüller ekstrüdere aktararak uygulanan basınçla delikten geçmesi sağlanır. Delikten geçen peletin boyu ekstrüdere aktarılan madde karışımının fiziksel özelliklerine göre değişkenlik gösterir.

Yuvarlaklaştırma işlemi plastik deformasyon nedeniyle oluşur. Yuvarlaklaştırma işleminde kullanılan sferanizatör cihazı ortası boş bir silindir ve içinde dönen bir diskten oluşur. Ekstrüderden çıkan şekil almış granüller dönen disk üzerine yerleştirilir. Cihaz çalıştırıldığında dönen plakanın (sürtünme disk) hareketi ile partiküllerin sürtünme diskine teması, cihaz duvarlarına çarpması ve birbirleri arasındaki çarpışmalar ile daha kısa parçalara ayrılır. Parçaların küçülmesinde en önemli parça sürtünme plakasıdır. Bu plakanın yüzey şekline göre istenen partiküllerin yüzey alanı tasarlanır. Çapraz taramalı yüzey en çok kullanılan yüzey tipidir [107].

2.3.4.1. Peletlerde yapılan kontroller

Peletlerde yapılan kontroller aşağıda belirtilmiştir.

Partikül büyüklüğü dağılımı ve partikül şekli

Peletlerin boyut aralığına göre uygun seçim yapılarak partikül boyut dağılımına bakılabilir. Partikül boyut ölçümünde genelde kullanılan yöntem ucuz ve basit olduğu için elek analizi yöntemidir. Optik mikroskop ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) partikül boyut ölçümü ve partikül şeklinin incelenmesi için kullanılabilir [107].

Sertlik ve Friabilite

Hazırlanan peletlerin kaplanması ya da taşınması durumunda oluşan kuvvetlere dayanıklı olacak kadar sert olması istenir ve peletlerin sertliği ile friabilitesi arasında korelasyon bulunmaktadır[107]. Friabilite'nin düşük olması istenmektedir. Pelet formülasyonunda bağlayıcı olarak kullanılan madde, yine kullanılan polimer oranı friabiliteye etki eden faktörlerdir [108].

Dissolüsyon ve Disintegrasyon

Dissolüsyon peletlerden etken madde salımının zamana göre hangi hızda ve ne kadar sürede olduğunu göstermek için yapılmaktadır. Hazırlanan pelet ve içindeki etken maddeye göre çeşitli dissolüsyon ortamları seçilerek belirli aralıkla çekilen numunelerin içindeki etken madde miktarlarının analitik bir yöntem ile hesaplanması sonucu formülasyonun zamana karşı yüzde serbestleşme oranı hesaplanır. Peletler farklı polimerler ile kaplanarak serbestleşme oranı zamana göre yavaşlatılarak ya da ertelenerek kontrollü salım sistemi olarak da kullanılabilir [109].

Hazırlanan peletlerin serbestleşmeleri farklı kaplama yöntemleri ile değiştirilebildiği gibi disintegrasyon süreleri de serbestleşme açısından önemlidir.

Disintegrasyon hızını arttırarak hızlı salım yapan peletler oluşturulabilir. Disintegrasyonda ıslanmayı arttırmak amacıyla farklı bağlayıcı , farklı dolgu maddesi kombinasyonları ile porozite artırılarak disintegrasyon süresi kısaltılabilir [110].

Küresellik

Hazırlanan peletlerin küreselleştirme işleminden sonra en önemli özelliklerinden birisi partikül şekilleridir. Partikül şekillerinin akıcılık için küresel olması istenir. Küresellikte hazırlanan formülasyon bileşenlerinin etkisi olduğu gibi küreselleştirme için kullanılan sferonizasyon cihazının tabanında bulunan şekillendirici plakanın girinti-çıkıntı boyutları ve çıkıntılar arasındaki mesafeler de önemlidir [108, 111].

2.4. Ambalajlama

Ambalajlamada amaç formüle edilen ilacın raf ömrü boyunca taşınması, depolanması sırasında çevresel koşullardan koruması ve etken, yardımcı maddelerle stabilite açısından geçimli olmasıdır [112].

Ambalaj materyalinin ve şeklinin seçilmesi hazırlanan formülasyon açısından önemlidir. Katı, sıvı, yarı-katı dozaj şekilleri için farklı ambalajlar olduğu gibi formülasyon içeriğine bağlı olarak kullanım şekline göre de ambalaj materyali değişebilmektedir.

Örneğin merhem, krem, pomat formülasyonlarında tercih edilen pomat kutusu göze uygulanacak preparatlarda kontaminasyon riskinden dolayı tercih edilmez. Göz pomatları ambalaj içinde kalan ilacın en düşük yüzey alanı ile dışarıya temasını sağlamak amacıyla tüplerde muhafaza edilir.

Dispers sistemler olarak incelenen inhalasyon için aerosol karışımı ve oral yoldan kullanılan bir katı süspansiyon farklı dispersiyon ortamları bulunan süspansiyonlardır ve bu formülasyonların hasta kullanımına sunulurken kullanıldıkları ambalajlar tamamen farklıdır.

Ambalajlamada yukarıda verilen örneklerdeki gibi formülasyonun ihtiyaçları doğrultusunda birçok farklı madde kullanılabilir [112].

Konvansiyonel oral süspansiyon formülasyonlarında genelde tercih edilen ambalajlar cam şişeler [113] , PVC, Polietilen (PE), Polipropilen (PP) maddelerle üretilmiş plastik şişelerdir [114].

Pelet, boncuk ve toz formülasyonları farklı dozaj şekillerinin öncül şekilleri olarak kullanılabilecekleri gibi tek başlarına da dozaj formu olarak kullanılmaktadır. Farklı dozaj formlarına dönüştürülmediklerinde bu üç dozaj şeklinin ambalajlanmasında benzer ambalajlar kullanılabilir. Saşe, paket, şişe gibi farklı ambalaj materyalleri bu formülasyonların ambalajlanmasında kullanılabilir.

Hazırlanan formülasyonun gerekliliklerine göre primer ambalaj seçimi çok önemlidir. İstenen raf ömrü boyunca formülasyonun stabilitesini koruması gerekir. Hazırlanan formülasyonun temas ettiğinde etkileşime girmeyeceği ve istenen muhafaza (ışık, nem, hava geçirmezlik) şartlarını sağlayan primer ambalaj materyali tercih edilmelidir.

Plastik yüksek molekül ağırlığı olan, ısıya duyarlı sentetik bir polimerdir. Farmasötik preparatların paketlenmesinde ısıya dayanıklı ve otoklavlanabilen kısıtlı plastik materyal bulunmaktadır. Polivinil Klorür (PVC), Poliviniliden Klorür

(PVDC), Polistren polipropilen, polipropilen (PE) olarak örnek verilebilir. Bu termoplastikler hafif ve neredeyse metal kadar dayanıklıdır [115].

Aluminyum, çelik, bakır gibi metaller özel avantajlarından dolayı spesifik durumlarda farmasötikler için kullanılmaktadır. Özellikle aluminyum ağırlığı düşük ve geri dönüşümü kolay bir materyaldir [115]. Aluminyum folyo en ince ölçülerde dahi (genelde plastik bir kat ile lamine ya da kaplı) en iyi bariyer özelliğini gösterir ve bu özelliklere en sızdırmaz plastiklerle bile ulaşamaz [116].

Aluminyum nem, hava, koku, ışık ve mikroorganizmalara karşı iyi bir bariyer oluşturması dışında, şekillendirilme ve elastikiyet konusunda da başarılıdır. Aluminyum ayrıca plastik materyaller ile lamine edilerek kullanılabilir. Bu şekilde paketleme tek başına aluminyum kullanımına göre daha uygun fiyatlı bir alternatif olarak değerlendirilir. Plastik eklenmesi sıcakta mühürleyerek kapatma işlemini mümkün kılar. Ancak mühürleyerek kapatmak hava ve nemden tamamiyle izole olmasını sağlamaz [117]. Bu bariyerler özellikle gıda firmaları tarafından sık kullanılan doypack paketleme çeşidi olarak PET+ ALU+ PE şeklinde üretilmektedir. Burada içerik ile temas eden kısım PE'dir [118].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

- *Pinus Brutia* Ten. Reçinesi (Uğur Yem Katkı Maddeleri Ltd, Türkiye)
- Aljinik asit (Sigma Aldrich,Almanya)
- Kalsiyum Klorür dihidrat (Sigma Aldrich, Almanya)
- Sodyum sitrat dihidrat(Galenik Ecza Ltd., Türkiye)
- Bentonit (Uğur Yem Katkı Maddeleri Ltd, Türkiye)
- Gliserin (Galenik Ecza Ltd, Türkiye)
- Kalsiyum Karbonat (Ortaş Ltd, Türkiye)
- Etil Alkol 99° (Merck, Almanya)
- Dimethylformamide R (Merck, Almanya)
- n-Hexane R (Merck, Almanya)
- n o-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + %1 trimethylchlorosilane (Sigma Aldrich, Almanya)
- Hidroksipropil Metil Selüloz 10.000 Da (Sigma Aldrich, Almanya)
- Karboksi Metil Selüloz 10.000 Da (Zibo Hailan Chemical Co., Ltd, Çin.)
- Abietic acid (Sigma Aldrich, Almanya)
- Gum Rosin (Sigma Aldrich, Almanya)

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

3.1.2.1. Kullanılan Aletler

- Gaz kromatografi cihazı (Agilent 7890B)
- Çekiçli Değirmen markasız
- Çekiçli değirmene uygun elekler (1, 3 mm elek açıklığı)
- Kütle dedektörü (Agilent 5977E)
- DSC Cihazı (Shimadzu DSC-60A)
- Optik Mikroskop (Malvern Morphologi G-3)
- Gaz Kromatografi kolonu (HP-5MS 30m x 0,25mm x 0,25µm)
- Clevenger apereyi (Avrupa Farmakopesi 7.0'a uygun)
- Sirkülasyon soğutucusu (Buchi F-305)
- Stabilite kabini (Nüve TK252)

- Ceketli ısıtıcı (Thermo Scientific EM0250)
- Somatik hücre sayıcı (Bentley Instrument Somacount 150)
- Süt Analiz Cihazı (Bentley Instruments Infrared Milk Analyzer 150)
- Isıtıcı Manyetik karıştırıcı (IKA WERKW RET Basic)
- Vorteks (IKA MS 2)
- Buzdolabı (Beko 2-8 °C)
- Ribbon karıştırıcı (Markasız)
- Distile su cihazı (GFL,Almanya)
- Optik mikroskop (Olympus SZX7)
- Hassas Terazi (Shimadzu ATX 224)
- Mettler Toledo Terazi (AX 205 microbalance)
- Ultrasonik Banyo (VWR)
- Viskozimetre (Brookfield DV-E)
- Karıştırıcı (Aymes, Türkiye)
- DSC Kröze kapatıcı
- Sonkaya poşet kapatma cihazı (smpy 402 40 CM)
- Toz sıkıştırma test cihazı (Markasız)
- Elek Sallama cihazı (Retsch AS200)
- Farklı boyutta elekler (Retsch)
- Paslanmaz Çelik Akma hunisi (Markasız)
- Tefal Smart 4 bıçaklı doğrayıcı 400 W

3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler

- Beher 100, 150, 250 ml
- Balon joje 100 ml
- Şilifli balon 1000 ml
- Mezür 100, 250 ml
- Manyetik balık (farklı boyutlar)
- Cam şişe 200 ml (şişecam)
- Parafilm (Bemis company, inc.)
- Steril enjektör 5,10 ml (Hayat)
- Alüminyum DSC krözesi
- İdrar numune kabı 100 ml non-steril (Fıratmed)
- 200 ml cam şişe (Paşabahçe)

- Süzgeç kağıdı

3.1.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları

- SPSS (IBM Statistics Ver 23)
- Microsoft Office Word
- Microsoft Office Excel
- Microsoft Office Powerpoint
- Adobe Photoshop CS6
- TA-60WS thermal analyzer v2.2
- Morphologi v7.11
- Endnote X8
- Graphpad Prism 7

3.2. Yöntem

3.2.1. Formülasyon çalışmaları

3.2.1.1. KTK'nın Toz Edilmesi ve KTK'da Yapılan Kontroller

Terebentin ve kolofan içeren drog materyalleri doğadan toplandıktan sonra toplanılan bitkiye ait bir parça elde edilerek Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumuna kayıt edildi(MARE 20756). Elde edilen KTK'nın toz edilmesi ve toz edilen materyalde yapılan kontroller aşağıdaki gibidir.

3.2.1.1.1. KTK'nın Toz Edilmesi

Pinus Brutia Ten.'den elde edilen reçine (Kolofan ve Terebentin içeren) toz edilmek istendi. Toz edilecek drog görünür yabancı maddelerinden arındırıldı. Elde edilen drog büyüklükleri 3-5 cm ile 10-15 cm aralığında geniş bir skalada dağılmıştı. Toz edilmek istenen materyalin istenen toz partikül boyutunun 1 mm'nin altında olması hedeflenmişti.

Şekil 2-10 ve Şekil 2-11'de gösterildiği gibi drog materyali için istenen partikül boyut aralığına ulaşmak amacıyla kesme metodu ve basınç metodu uygun olabileceği düşünüldü. Ancak iki yöntem arasında drog materyalinin fiziksel özelliklerine göre basınç metodu daha uygun bulundu. Kesme metodunun daha çok lifli drog materyallerinin toz edilmesinde kullanılması ve kesme metodunu taklit etmesi amacıyla elektrikli doğrayıcı ile yapılan ön denemelerde drog materyalinin işlem esnasında ısınmaya bağlı yapışma probleminin yüksek olduğu ve daha büyük boyutta yapılacak işlem esnasında yapışma problemine bağlı problemlerin oluşacağı öngörüldü ve basınç metodunun kullanılmasına karar verildi.

Basınç metodu için çekiçli değirmen kullanıldı. Drog materyali değirmenin besleme bölümünden dökülmeden önce uygun boyutlara getirilmek için ön kırma işlemi yapıldı. Daha sonra 1 mm'den daha küçük boyutta toz elde etmek için değirmende bulunan 1 ve 3 mm açıklıkta elek boyutları denenerek toz etme işlemi yapıldı.

Toz edilen drog materyalinin daha dar partikül boyut dağılımına sahip olması için 1 mm elek açıklığı bulunan elekten geçirildi. 1 mm elek açıklığına sahip elek ile

boyutlandırma hem yabancı maddelerin daha çok bulunduğu aralıktaki yabancı maddelerin drog içerisindeki oranını düşürmek amacıyla hem de toz numunesinin daha dar boyut aralığına sahip olması için gerçekleştirildi.

3.2.1.1.2. Toz Edilmiş KTK Karışımında Yapılan Kontroller

Toz edilmiş terebentin, kolofan karışımında yapılan kontroller aşağıda gösterilmiştir.

Toz Edilmiş KTK Yabancı Madde Açısından İncelenmesi

Hazırlanan toz drog numunesindeki yabancı madde miktarının tespit edilmesi için terebentin ve kolofan numunesinin tamamıyla çözünebildiği etanol solvent olarak kullanıldı.

Toz edilmiş kolofan ve terebentin karışımının farklı bölgelerinde alınan 3 numune hassas terazide 1 g'a yakın tartıldı. Alınan numuneler hem 1 mm elekten eleme öncesi hem de eleme gerçekleştirildikten sonra olacak şekilde alındı. Toz numuneleri 100 ml erleninde üzerine 25 ml 96° etanol eklenerek karıştırıldı. 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Ardından önceden daraları kayıt edilmiş süzgeç kağıdından süzülerek çözünmeyen maddelerin alıkonması sağlandı.

Süzgeç kağıdında terebentin ve kolofan karışımının kalmaması için süzme gerçekleştirildikten sonra kısım kısım eklenen 96° (h/h) etanol ile süzgeç kağıdında çözünmüş madde kalmaması için yıkandı. Süzgeç kağıdında kolofan ve terebentin numunesine ait renkler kayboluncaya dek yıkama devam edildi.

50° C etüv içerisinde 2 saat bekletilen pelür kağıtları 1 gün boyunca silika bulunan desikatörlerde bekletildi ve tartıldı.

Tartım sonucu elde edilen ağırlık ile 1 g toz kolofan terebentin karışımında bulunan yabancı madde miktarı miligram ve tartılan numuneye oranı yüzde (%) olarak hesaplandı.

% Sıkışabilirlik (Carr İndeksi) ve Hausner oranı

Toz kütlelerinin % Sıkışabilirlik ve Hausner oranı bulunmadan önce küme dansitesi ve sıkıştırılmış dansite gibi özelliklerini hesaplanması gerekir. Bunlar için farmakopede belirtilen çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

Tozun küme dansitesi bilinen kütledeki bir elekten geçirilmiş tozun mezür ile hacmi bulunarak hesaplanır. (Metot 1) Ya da bilinen hacimdeki tozun volumetreden bir kaba aktarılması ile ağırlığının tartılması ile bulunur (Metot 2) ya da ölçüm kabı içerisine tozun dökülmesi ile ölçülür (Metot 3). Genelde metot 1 ve 3 kullanılır.

Çalışılan tozun kohezif ve adefiz özellikleri sebebiyle Metot 1 tercih edildi.

Sıkıştırılmış dansitenin hesaplanmasında kullanılan cihaz ve mezüre ait özellikler farmakopede belirtilmiştir. Sıkıştırılmış dansite bulunurken kullanılacak metodlardan biri aşağıda anlatılmıştır. Bu metod kullanılırken kullanılacak 250 ml dereceli mezür (2 ml hassasiyette) ağırlığı 220 ± 44 g, sıkıştırma test cihazının dakikada 250 ± 15 vuruş yükseğe çıkarma 3 ± 0.2 mm olması ya da 300 ± 15 vuruş ve 14 ± 2 mm yükseğe çıkarma özellikleri olması gerekmektedir. Dereceli silindiri tutan bir sabitleyicisi ve bu sabitleyicinin 450 ± 10 g ağırlığında olmalıdır [87].

Kullanılan cihaz ve mezüre ait özellikler

Cihaz Özellikleri

Dakikada vuruş sayısı : 260 vuruş Avrupa Farmakopesi 7.0 kriterlerini karşılamaktadır.

Yükselme : 3 mm Avrupa Farmakopesi 7.0 kriterlerini karşılamaktadır.

Mezür sabitleme aparatı : 484,22 g Avrupa Farmakopesi 7.0 önerilen ağırlığın üstündedir.

Mezür

Mezür ağırlığı: 175, 074 g Avrupa Farmakopesi 7.0 önerilen ağırlığın altındadır.

Dereceli kısım yükseklik : 23,2 cm Avrupa Farmakopesi 7.0 kriterlerini karşılamaktadır

Toplam yükseklik : 28,2 cm Avrupa Farmakopesi 7.0 kriterlerini karşılamaktadır [87].

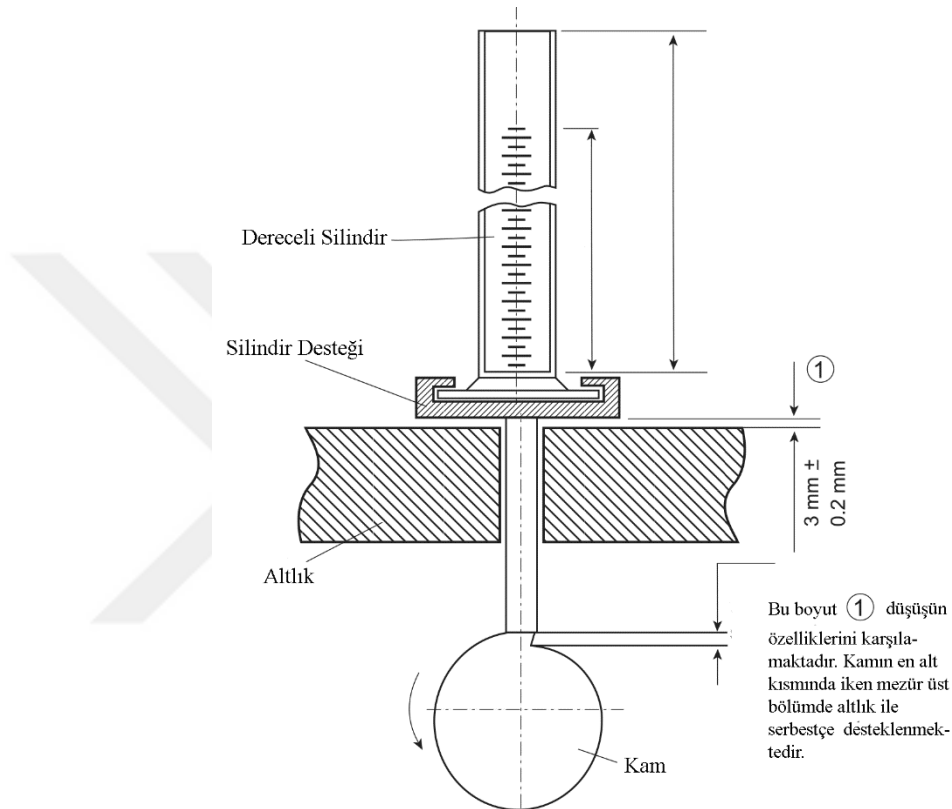


Şekil 3-17: Sıkıştırma cihazında F11 formülasyonuna ait ilk hacim

250 ml dereceli silindire aktarmadan önce tozda aglomerasyon olup olmadığına bakıldı. Bölgesel olarak oluşan aglomerasyonu önlemek için 1.0 mm elek açıklığına sahip elekten geçirilerek toz kütleindeki topaklar giderildi. Ardından 0,01 g hassasiyeti bulunan elektronik terazide tartılan 100 g numune 2 ml derecesi bulunan 250 ml'lik mezüre Şekil 3-18'de gösterildiği gibi sıkıştırmadan dikkatlice aktarıldı. Sıkıştırma cihazı çalıştırılmaya başlamadan önce mezürde bulunan tozda çökme oluşturabileceği için titreşim oluşturmada cihazı yerleştirildi. Tozun sıkıştırılmadan mezürde okunan seviye (V_0) 2 ml lik çizgilerde en yakın olarak okunarak kayıt edildi. Bu başlangıç hacmi ile başlangıç dansitesine (küme dansitesi) ulaşıldı. aşağıda belirtilen denklem (Eşitlik 1) ile küme dansitesi hesaplandı.

Küme dansitesi ($\rho_{\text{küme}}$) için uygulanan denklem (Eşitlik 1);

$$\rho_{\text{küme}} = \frac{\text{Tartılan ağırlık (100 g)}}{\text{ilk hacim (küme hacmi, } V_0 \text{)}} \quad \text{Eşitlik 1}$$



Şekil 3-18: Toz örnekleri için toz vuruş cihazı [87]

Sıkıştırılmış toz dansitesini hesaplamak amacıyla Şekil 3-17’de gösterilen düzenek kullanıldı. Toz sıkıştırma cihazı farmakopede belirlenen standartlara göre altında bulunan kam vasıtasıyla dakikada belirli sayıda dönerek üzerindeki silindir desteğinin serbest düşüş yapmasını sağlar. Bu sayede insan eliyle yapıldığında standardize olmayan vuruş şiddeti tek düze ve aynı şiddette yapılabilir.

Şekil 3-18’de gösterildiği gibi silindir desteği üzerine toz konulmuş mezür dikkatlice titreşim yapmadan yerleştirildi. Ardından mezürün üzerinden geçirilerek takılan sabitleyici ile Şekil 3-17’de gösterildiği gibi toz bulunan mezür silindir desteğine sabitlendi.

Ardından cihaz çalıştırıldı ve belirlenen vuruş sayıları sonrasında cihaz durdurularak o vuruştan sonra ulaşılan hacim okunarak kayıt edildi. En son 500 vuruş ve 1250 vuruş arasında 2 ml den fazla fark olmaması istendi. Fark oluştuğunda 1750nci vuruşa kadar vuruşa devam edilerek son hacme ulaşıldı. aşağıda belirtilen denklem (Eşitlik 2) ile sıkıştırılmış dansitesi hesaplandı.

Sıkıştırılmış dansite ($\rho_{\text{sıkışmış}}$) için uygulanan denklem (Eşitlik 2);

$$\rho_{\text{sıkışmış}} = \frac{\text{Tartılan ağırlık (100 g)}}{\text{sıkıştırılmış hacim } (V_{1250} \text{ ya da } V_{1750}, V_f)} \quad \text{Eşitlik 2}$$

% Sıkışabilirlik (Carr İndeksi) ve Hausner oranı son yıllarda toz akış karakterinin belirlenmesi için popülerleşen hızlı, basit bir yöntemdir. % Sıkışabilirlik maddenin küme dansitesi, boyut ve şekil, yüzey alanı, nem düzeyi ve koheziflik özelliklerinin bulunması için endirekt bir yöntemdir çünkü tüm bu özellikler elde edilen % sıkışabilirliğini etkilemektedir. % Sıkışabilirlik ve Hausner oranı küme hacmi ve sıkışmış hacmin bulunması ile hesaplanır.

İşlem görmemiş ilk hacim V_0 'dır. Final sıkışmış hacmi V_f ise sıkıştırılan tozun sıkıştırılırken daha fazla değişime uğramadığı son hacimdir. Bulunan V_0 , V_f değerleri ile % sıkışabilirlik (Eşitlik 4) ve Hausner oranı (Eşitlik 3) aşağıdaki gibi hesaplanır :

$$\text{Hausner Oranı} = \frac{V_0}{V_f} \quad \text{Eşitlik 3}$$

$$\% \text{ Sıkışabilirlik} = 100 \times \frac{V_0 - V_f}{V_0} \quad \text{Eşitlik 4}$$

Yukarıda bahsedilen sıkıştırılmış ve küme hacimleri dışında, küme ($\rho_{\text{küme}}$) ve sıkıştırılmış dansitelerin ($\rho_{\text{sıkışmış}}$) oranlanması ile de Hausner oranı (Eşitlik 6) ve % sıkıştırılabilirlik (Eşitlik 5) hesaplanabilmektedir.

$$\text{Sıkıştırılabilirlik indeksi} = 100 \times \frac{\rho_{\text{sıkışmış}} - \rho_{\text{küme}}}{\rho_{\text{sıkışmış}}} \quad \text{Eşitlik 5}$$

$$\text{Housner Oranı} = \frac{\rho_{\text{sıkışmış}}}{\rho_{\text{küme}}} \quad \text{Eşitlik 6}$$

Yüzde Sıkışabilirlik ve Hausner oranı tozun intrinsik özellikleri değildir. Kullanılan metodolojiye göre değişmektedir. Mevcut literatür küme hacmi V_0 , sıkıştırılmış hacim V_f , küme dansitesi $\rho_{\text{küme}}$, sıkıştırılmış dansite $\rho_{\text{sıkıştırılmış}}$ hesaplanmasında bazı değişkenlerin önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bunlar kullanılan mezür çapı, sıkıştırılmış hacme ulaşılması için gereken vuruş sayısı, testte kullanılan materyal miktarı ve sıkıştırmada kullanılan toz örneğinin dönmesidir.

Yukarıda bahsedilen işlemlerin ardından elde edilen veriler Tablo 2-7'de belirtilen değerlere toz kütlesinin akış özellikleri belirlendi. Elde edilen veriler 3 seri çalışma ile hesaplanarak standart sapmaları hesaplandı.

Yığın Açısı ve Akma Süresi

Avrupa Farmakopesi (AF) 7.0'da belirtildiği şekliyle toz kütlesinin sabitlenmiş bir koniden geçerek yığın oluşturmaya sağlandı. Uygulama esnasında paslanmaz çelik sapsız huni kullanıldı. Yığının en üst noktası ile metal huni arasında 2-4 cm boşluk olmasına dikkat edildi. Bunu sağlamak amacıyla 1,5-2 cm yükseklikteki toz kütlesi ölçümü için huni 5 cm yüksekliğe sabitlendi. Bu şekilde tozun en üst noktasına akma esnasında düşen tozların etki etmesi en aza indirildi. Tozun aktığı zemin ve huni sabit ve titreşimsiz olacak şekilde yerleştirildi.

Akan tozun oluşturduğu yığın simetrik bir şekilde oluşturulmasına çalışıldı.

Yığın açısını belirlemek için aşağıdaki formülasyon uygulandı. Toz akış özelliklerinin belirlenmesi için 3 seri örnek ile bakıldı.

$$\tan(\alpha) = \frac{\text{Yükseklik}}{\text{Taban} \times 0,5}$$

Eşitlik 7

Bulunan açı (α) Tablo 2-8'e göre bakılarak tozun akış özelliklerini belirlendi.

Yığın açısında tartılan 10 g toz materyal huninin ağzı kapatıldıktan sonra paslanmaz çelik sapsız huniye aktarıldı. Maddenin serbestçe akması için süre tutuldu. Yığın açısı farmakopede belirtilen düzgün koni şekli oluşturma kriterlerine göre değerlendirildi.

Elek Analizi

Tablo 2-3'te görülen partikül boyutu ve dağılımının belirlenmesinde kullanılan yöntemlere göre tespit edilebilen belirli boyut aralıkları görülmektedir. Partikül boyutu ölçüm yönteminin ölçülecek materyalin tahmini boyut dağılımına göre seçilmesi gerekmektedir. Veteriner alanda elde edilen tozların büyüklükleri için en uygun yöntem genellikle elek analizi yöntemidir. Elde edilen toz drog materyali ve diğer yardımcı maddeler de dikkate alınarak hazırlanan toz formülasyonları elek analizi yöntemi ile incelendi. Bu nedenle hazırlanan toz formülasyonun ölçümleri elek analizi yöntemi ile yapıldı. Partikül şekillerinin belirlenmesi için optik mikroskop yönteminden yararlanıldı.

Elek analizinin bitirilmesi, elekler arasındaki toz miktarının değişimi AF 7.0'da belirtilmiştir. Elek analizi testi herhangi bir elekteki toz kütlesinin %5'ten fazlası ya da 0,1 g (76 mm elek kullanılıyorsa %10 oranında) değişim olmuyorsa tamamlanmıştır. Eğer tüm toz kütlesi ağırlığının yüzde 5 ten azı bir test eleğinde bulunuyorsa bu elekteki toz kütlesinin değişimi de %20'den fazla olmamalıdır. Eğer toz örneğinin %50'den fazlası tek bir elekte bulunuyorsa, monografa belirtilmiyorsa test tekrarlanır. Ancak mevcut elek ile bu elekten daha büyük elek boyutuna sahip elek arasına ara kademe oluşturacak bir elek eklenir [87].

Elek analizini gerçekleştirmek için aşağıdaki başlıklar incelenmek istenen toz kütlesine sırasıyla uygulandı. Test eleklerinin ve numunelerin tartımı için 0,01 g duyarlılıkta elektronik terazi kullanıldı. Kullanılan elek sallama cihazının (Retsch AS200) sallama ve vibrasyon metodu aşılal ivme ile fırlatma hareketiydi [119].

Test Örnek Miktarının Belirlenmesi

Test örneği miktarı monografta belirtilmediyse toz materyalinin dansitesine göre belirlenen 25-100 g aralığında test örneği kullanılmaktadır. Bu miktarlar 200 mm çapındaki test elekleri için verilmiştir. 76 mm çapındaki test elekleri için test miktarları 200 mm için verilen miktarların yaklaşık olarak 1/7'si kadar kullanılabilir. Farmakopedeki belirtilen kriterleri uygulamak için öncelikle 25 g ile elek analizine başlandı. Aşağıda ayrı başlık altında anlatılan son nokta tespiti kriterleri uygulanarak öncelik tozun ne kadar gram numune ile partikül büyüklüğü dağılımının hesaplanacağı belirlendi. 25 g ardından 50 g ile aynı işlemler tekrarlandı. Her iki ağırlık için de partikül büyüklüğü dağılımı oluşturulan grafikler ve tablolarla incelendi. Elekler üzerinde biriken toz miktarları her iki farklı gramajdaki toz kütlesi için karşılaştırıldı. Elek üzerindeki miktarlar değerlendirilerek kullanılacak test örnek miktarı belirlendi [87].

Son Nokta Tespiti

Dikkatlice tartılmış olan test numunesi en üstteki en büyük aralığa sahip elek üzerine konuldu ve en üstteki kapak kapatıldı. Elek sallama cihazında 5'er dakikalık aralıklar boyunca titreşime mazur bırakıldı. Elekler arasındaki toz miktarının değişim kriterleri (bölüm 3.2.1.1.2, elek analizi başlığı altında) yukarıda belirtildiği şekilde uygulandı ve 5'er dakikalık aralıklarla elek sarma cihazı çalıştırılarak toz kaybı olmadan her bir elek tartıldı ve son ağırlık kayıt edildi. Böylece elek daraları çıkarılarak eleklerdeki toz miktarı hesaplandı. En altta bulunan toplama kabındaki toz miktarı da aynı şekilde hesaplandı.

Ardından yeni bir örnek ile analiz tekrarlandı. Ancak bu sefer yukarıda belirtildiği şekilde tespit edilen süre boyunca örnek sallama cihazında teste tabi tutuldu. Böylece son nokta tespiti için gerekli şartların karşılandığı teyit edildi [87].

Yukarıda bahsedilen monograftaki kriterlere göre 25 g ve 50 g toz drog numunesi için son nokta tespiti yapıldı. Genlik %50 olarak uygulandı. Test için Tablo 2-4'te gösterilen elekler kullanıldı

Partikül büyüklüğü dağılımları incelenerek toz drogun incelenmesi için elek sallama süresi hesaplandı.

Son nokta tespitinde 25 g ve 50 g numune için elek üstlerinde kalan madde miktarlarına bakıldı. Numune miktarındaki artışa göre eleklerde biriken yüzde madde miktarına bakıldı. Özellikle düşük elek açıklığına sahip eleklerdeki elek üstü kalan madde yüzdesi düşük olana göre numune miktarı seçildi.

Elek analizi

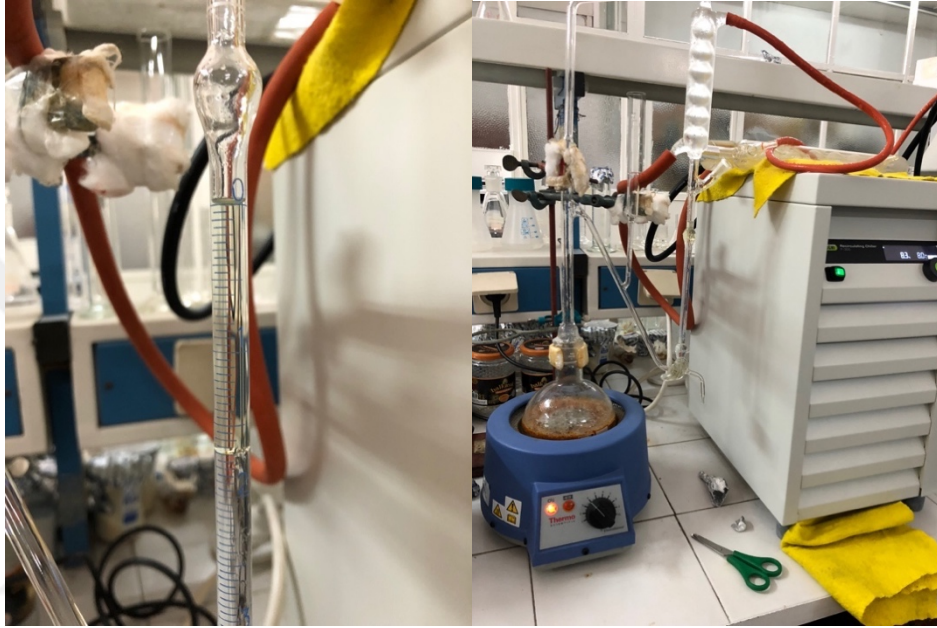
Yukarıda belirtilen işlemlerden sonra toz numuneleri için bulunan toz numune ağırlığı ile 3 seri toz numunesinin incelenmesi yapıldı. İnceleme için son nokta tespitinde bulunan süre ve aynı genlik uygulanarak toz partikül büyüklüğü dağılımı hesaplandı. Genlik %50 olarak uygulandı.

Toz Edilen Kolofan, Terebentin Karışımında Terebentin Miktarının Tespiti

Clevenger apereyi ile 50 g kolofan + terebentin karışımındaki $\%(\text{h/a}) / \%(a/a)$ terebentin oranı bulundu.

KTk toz edildikten sonra yüzey alanının artması dolayısıyla terebentin oranında düşüş beklenmekteydi. F11 formülasyonunda kullanılan toz KTK formülasyon ile aynı doypack torbalara konularak oda sıcaklığında muhafaza edildi ve 6 aylık oda sıcaklığı şartlarında ne kadar terebentinin kayıp olduğu tespit edildi.

Toz karışımı 50 g'lık numuneler halinde formülasyonun saklandığı doypack torbalarda ağzı ısıyla kapatılarak bekletildi. Ardından bu torbaların üç tanesi ile Clevenger apereyinde yüzde terebentin miktarları bulunarak standart sapma hesaplandı.



Şekil 3-19: Toz drog formülasyonundan terebentin eldesi

50 g tartılan kolofan terebentin karışımı numunesindeki terebentin miktarını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada 1000 ml balon içerisine yeteri miktar ultra saf su ilave edildi. Ceketli ısıtıcıya yerleştirilen numune 6 saat boyunca ısıtılarak uçucu yağın clevenger apereyinde birikmesi sağlandı. Uçucu yağın mililitre cinsinden ölçülebilmesi için apereydeki terebentinin altında kalan su yavaşça boşaltılarak uçucu yağın mililitre çizgilerinin ölçüm yapılabilen bölgeye gelmesi sağlandı. Daha sonra dikkatlice kalan su boşaltılarak toplam terebentin elde edildi ve tartıldı.

Terebentin miktarlarına 0'ıncı ve 6'ncı ayda bakılarak formülasyonun hazırlandığı toz numune içindeki terebentin miktarlarındaki değişim tespit edildi.

3.2.1.1.3. DSC analizi

Çam reçinesinin oda sıcaklığında olmasa da Türkiye'nin iklim kuşağı sebebiyle yaz aylarında 30-40 derecelere ulaşabilmesi sebebiyle bu sıcaklıklarda fiziksel karakterini tayin etmek amacıyla Tg sıcaklığı tespit edilmek istenmiştir. Bu etken madde ile hazırlanacak formülasyonların yaz aylarında oluşturabileceği stabilite problemleri konusunda öngörüle bulunabilmek için DSC cihazı ile analizleri yapıldı.

DSC analizi bölüm 2.1.3.2'de belirtildiği gibi Tg sıcaklığının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir.

Kolofan terebentin karışımından oluşan toz haline getirilmiş drog Shimadzu DSC-60A cihazı ile incelendi.

Yaklaşık 2-3 g toz numunesi alüminyum DSC krözelerinin içerisinde tartıldı. Kröze kapatıcı ile DSC krözesi alüminyum kapağı ile sıkıştırılarak kapatıldı. Numuneye ait kaydedilen tartım miktarı örnek ağırlığı olarak cihaz yazılıma kayıt edildi.

Azot akışı altında yapılan çalışmada dakikada 5° C artacak şekilde 5 ml/dakika Azot (N₂) akışı altında deney gerçekleştirildi. Sıcaklığa bağlı değişen mV değerlerine ait tablo sonuç olarak elde edildi.

Tablo sonuçlarından Tg sıcaklığı tablo üzerinde başlangıç sıcaklığından itibaren ilk eğimin başladığı nokta ile eğimin tekrar düzlemsel olmaya başladığı noktaya kadar olan kısımda orta nokta seçilerek Tg sıcaklığı bulundu [120].

3.2.1.2. Süspansiyon Formülasyonlarının Hazırlanması

Toz drog materyalinin süspansiyon formülasyonu haline getirilmesinde karıştırıcı ve 200 ml cam şişe kullanıldı. Tablo 3-9'de gösterilen formülasyonlar hazırlandı. İçerisinde ıslatıcı ajan bulunmayan formüller için öncelikle toz karışımları tartılarak geometrik seyreltme yöntemine göre karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından karıştırılan toz kütlesi cam şişe içerisine aktararak dispersiyon ortamı kısım kısım eklenerek süspansiyon hali getirildi.

Islatıcı ajan içeren formüllerde ise ıslatıcı ajan tozlar karıştırıldıktan sonra karıştırıcıya ilave edildi. Homojen görüntü elde edilinceye kadar karıştırıldı. Ardından şişeye aktararak kısım kısım ilave edilen dispersiyon ortamıyla şişede çalkalanarak karıştırıldı.

Elde edilen toz drog materyalinin özellikleri de göz önünde bulundurularak tablo 3-9'da gösterilen süspansiyon formülasyonları hazırlandı. Tartılan toz maddeler hassas terazide (0,01 g) tartıldıktan sonra geometrik seyreltme ile karıştırılarak karıştırıcıya (aymes) eklendi.

F7-F17 formülasyonuna kadar olan formüllerde toz formüller formülde belirtilen su miktarı ile 200 ml hacimdeki cam şişe içerisinde çalkalanarak rekonstitüe süspansiyon formülasyonuna uygun şekilde karıştırılarak son haline getirildi.

F1-F6 formülasyonlarının hazırlanmasında uygulanan işlemler sırasıyla aşağıdaki gibidir.

- 1) Kolofan terebentin karışımı (KTK), viskozite artırıcı ve gliserin tartıldı.
- 2) Viskozite artırıcı paletli karıştırıcıya ilave edildi.
- 3) Geometrik seyreltme prensiplerine göre KTK ve viskozite artırıcı 5 dakika karıştırıldı.
- 4) Toz karışımına tartılan gliserin azar azar ilave edilerek homojen karışım elde edilinceye kadar paletli karıştırıcıda karıştırıldı (2-3 dakika)
- 5) Homojen kütle ayrı bir çelik kaba alındı ve üzerine distile suyun sırasıyla 1/5, 2/5, 2/5 kısmının ilave edildi ve süspansiyon olması sağlandı.

F7-F17 formülasyonlarının hazırlanmasında uygulanan işlemler sırasıyla aşağıdaki gibidir.

- 1) KTK, kalsiyum karbonat ve viskozite artırıcı, varsa sodyum sitrat tartıldı
- 2) Viskozite artırıcının, KTK ve kalsiyum karbonatın geometrik seyreltme yöntemine göre V karıştırıcıda karıştırıldı (5 dakika)

- 4) Karıştırılan tozun dikkatli şekilde 200 ml'lik şişelere aktarıldı
- 5) Dispersiyon ortamının yarısının ilavesi ile ön çalkalama ardından kalan dispersiyon ortamının ilavesi ile son çalkalamanın yapılarak homojen görüntü elde edildi (<1 dakika)

Tablo 3-9: Hazırlanan süspansiyon formülasyonları

Formülasyon F1		Formülasyon F2		Formülasyon F3	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
Metil Selüloz 4000 cp	0,2 g	Metil Selüloz 4000 cp	0,2 g	Metil Selüloz 4000 cp	0,2 g
Gliserin	1,25 g	Gliserin	2,5 g	Gliserin	5 g
Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml
Formülasyon F4		Formülasyon F5		Formülasyon F6	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
Metil Selüloz 4000 cp	0,2 g	Metil Selüloz 4000 cp	0,35 g	Metil Selüloz 4000 cp	0,5 g
Gliserin	10 g	Gliserin	10 g	Gliserin	10 g
Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml
Formülasyon F7		Formülasyon F8		Formülasyon F9	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
Metil Selüloz 4000 cp	0,35 g	Metil Selüloz 4000 cp	0,35 g	Metil Selüloz 4000 cp	0,35 g
CaCO ₃	4,5 g	CaCO ₃	6 g	CaCO ₃	7,5 g
Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml
Formülasyon F10		Formülasyon F11		Formülasyon F12	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
CMC 10.000 cp	0,2 g	CMC 10.000 cp	0,35 g	CMC 10.000 cp	0,5 g
CaCO ₃	6 g	CaCO ₃	6 g	CaCO ₃	6 g
Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml
Formülasyon F11		Formülasyon F13		Formülasyon F14	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
CMC 10.000 cp	0,35 g	CMC 10.000 cp	0,35 g	CMC 10.000 cp	0,35 g
CaCO ₃	6 g	Starch 1500	6 g	Avicel Ph 102	6 g
Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml
Formülasyon F15		Formülasyon F16		Formülasyon F17	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
CMC 10.000 cp	0,35 g	CMC 10.000 cp	0,35 g	CMC 10.000 cp	0,35 g
CaCO ₃	6 g	CaCO ₃	6 g	CaCO ₃	6 g
Sodyum Sitrat*	0,1 g	Sodyum Sitrat*	0,3 g	Sodyum Sitrat*	0,5 g
Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml	Distile Su	50 ml

Hazırlanan formülasyonların süspansiyon kontrolleri aşağıda metotlar kullanılarak yapıldı. Formülasyonların değerlendirilmesinde sadece çökme hacmi ve flokülasyon derecesi değil redispersiyon zamanı da önemli bir değerlendirme kriteri oldu.

3.2.1.2.1. Hazırlanan Süspansiyonların Kontrolleri

Hazırlanan F1-F17 süspansiyon formülasyonları aşağıda belirtilen metotlara göre kontrol edildi.

Çökme Hacmi

Süspansiyonlarda çökme hacmi (F) 0 ile 1 arasında değer almaktadır. Son çökelti (V_u) hacminin ilk toplam hacme (V_o) oranı çökme hacmi olarak hesaplandı.

İdeal bir süspansiyonda (F) değeri 1'dir. Yani çökme olmadığı gibi hacimde de artış olmaz. (F) değerinin 1 den büyük olduğu durumlarda görülmektedir. Bu durumda dispers faz ilk hacmin üstüne çıkar. Çökme hacminin hesaplanmasında kullanılan eşitlik (Eşitlik 8) aşağıdaki gibidir [94].

$$F = \frac{V_u}{V_o}$$

Eşitlik 8

Flokülasyon Derecesi

Floküle sistemlerin karşılaştırılması için flokülasyon derecesi (β) floküle sistemin çökme hacmi (F) ile defloküle sistemin çökme hacminin (F_∞) oranıdır. Flokülasyon derecesinin bulunmasında kullanılan eşitlik (Eşitlik 9) aşağıda gösterilmiştir.

$$\beta = \frac{F_{floküle}}{F_{defloküle}}$$

Eşitlik 9

Redispersiyon süresi ve Çevirme Sayısı

Süspansiyon çöktükten sonra tekrar dağılması için 100 ml dereceli mezür içerisinde 2 defa 180° döndürülerek yeniden süspande hale gelmesi sağlandı. Döndürme sayısı ve geçen süre kayıt edildi. 180 derece döndürme 2 saniyede 1 kez olacak şekilde yapıldı.

Dipte tortu kalmayacak şekilde görünüm kazandığı zamana kadar saniye ölçümü yapıldı.

Reolojik Tayinler

Süspansiyonların uygulanacağı alana göre viskoziteleri değişiklik gösterir. Viskozitenin şişeden akmayı engelleyecek kadar yüksek olması istenmez. Süspansiyonlar non-newtonian akış karakterine sahiptirler ve bu nedenle tek noktalı viskozite ölçümleri doğru sonuç vermeyecektir. Süspansiyonların viskozite tayinleri için koni-plak viskozimetresi, silindir viskozimetresi ve dönen mil viskozimetreleri kullanılabilir [94].

Süspansiyon kontrollerinde Çökme hacmi, redispersiyon hızı gibi kriterleri ile öne çıkan F10, F11, F12 formülasyonları için viskozite tayini yapıldı. Bu formülasyonlar “F7-F17 formülasyonlarının hazırlanması” kısmında anlatıldığı gibi hazırlandı. Daha sonra hazırlanan süspansiyonlar 150 ml beher içerisine konuldu. Brookfield viskozimetresi kullanılarak yapılan çalışmada uygun spindle ve dönme hızı seçilerek ölçüm yapıldı. Süspansiyondaki çökmeye bağlı viskozite değişimlerini göstermek için 1 ve 5. dakikalarda viskoziteler uygun spindle ve dönüş hızı (rpm) ile santipauaz değerleri(cp) ve tork değerleri kayıt edildi.

Yükselen dönüş hızına bağlı olarak kuvvetin artması ile oluşan viskozite değişimi F12 formülasyonu için incelendi. Viskozite ölçümlerinde partiküllerin çökmesine bağlı viskozitenin düşmesi en düşük F12 formülasyonunda görülmesi sebebiyle kuvvete bağlı viskozitedeki değişimi tespit etmek amacıyla artan tork değerlerine (kuvvet) karşı viskozite değişimi bu formülasyon için ölçüldü.

3.2.1.3. Pelet formülasyonlarının Hazırlanması

Pelet formülasyonlarının hazırlanmasındaki amaç yüksek etken madde oranına sahip tek düze birimler elde etmek, yem ile verildiğinde etken maddenin tozlaşma sebebiyle kaybını azaltmak, akış özelliklerini gelini geliştirmek ve dozajlamayı kolaylaştırmaktır. Tablo 3-10’da gösterilen formülasyonlar hazırlanarak pelet oluşturmak istendi.

Peletlerin hazırlanması için formülasyonda belirtilen içerikler paletli karıştırıcıda karıştırılarak son şekline getirilmiştir.

Pelet formülasyonlarının hazırlanma metodu aşağıdaki gibidir.

- 1)Kolofan, terebentin karışımının (KTK), HPMC, gliserin, PVP 30K’nin tartılması
- 2) KTK ve HPMC’nin geometrik seyreltme yöntemine göre paletli karıştırıcıda karıştırılması
- 3)Formülasyonda varsa gliserin, PVP 30K, damla damla alkol ilavesi
- 4)Formülasyondaki ölçülen distile suyun damla damla ilavesi ve karıştırılması
- 5)Homojen karışım oluşturulduktan sonra hazırlanan karışımın karıştırıcıdan alınması
- 6) Boyutlandırma için uygun olup olmadığının incelenmesi için 1 mm elekten geçmek için zorlanması

Tablo 3-10: Hazırlanan Pelet formülasyonları

Formülasyon F18		Formülasyon F19		Formülasyon F20	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
HPMC 10.000 Mw 6cP	0,5 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	0,75 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g
Distile Su	6 ml	Distile Su	6 ml	Distile Su	6 ml
Formülasyon F21		Formülasyon F22		Formülasyon F23	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g
Gliserin	2 g	Gliserin	2 g	Gliserin	2 g
Distile Su	2 ml	Distile Su	2 ml	Distile Su	2 ml
Etil Alkol %96	1 ml	Etil Alkol %96	2 ml	Etil Alkol %96	3 ml
Formülasyon F24		Formülasyon F25		Formülasyon F26	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g
PVP 30K	0,5 g	PVP 30K	1 g	PVP 30K	1,5 g
Distile Su	6 ml	Distile Su	6 ml	Distile Su	6 ml
Formülasyon F27		Formülasyon F28		Formülasyon F29	
Madde	Miktar	Madde	Miktar	Madde	Miktar
KTK	15 g	KTK	15 g	KTK	15 g
HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g	HPMC 10.000 Mw 6cP	1 g
PVP 30K	1,5 g	PVP 30K	1 g	PVP 30K	1,5 g
CaCO ₃	4,5 g	CaCO ₃	6 g	CaCO ₃	7,5 g
Distile Su	6 ml	Distile Su	6 ml	Distile Su	6 ml

Ekstrüder ile pelet hazırlanması

Pelet oluşturmak amacıyla hazırlanan F18-F29 formülasyonları ekstrüder cihazında pelet oluşturmada önce pelet oluşturmaya uygunluğunu (yapışma problemi) test etmek amacıyla 1 mm çapından çelik eleklerden geçiş için zorlanarak ön denemeleri yapıldı.

3.2.1.4. Boncuk formülasyonlarının Hazırlanması

Kolofan ve terebentin karışımının hayvanlara uygulanmasındaki en büyük kısıtlamalardan birisi yeme katılan karışımın terebentin uçucu yağından dolayı kokması ve sığırlarda yem yeme ile ilgili isteksizlik oluşturmaktır. Bu problemi giderebilmek için terebentin'in enkapsülasyonu gereklidir. Enkapsülasyonda ucuz bir polimer kullanılması ve basit üretim yöntemi ile üretilmesi boncukların yeme ilave edilecek şekilde üretilmesi için önemli iki faktördür. Bu amaçla sodyum aljinat polimeri istenen özellikteki formüllerin hazırlanmasında kullanıldı.

Üretilen boncuklara ait formülasyonlar Tablo 3-11’de gösterilmiştir.

Tablo 3-11: Hazırlanan Boncuk formülasyonları

Formülasyon F30		Formülasyon F31		Formülasyon F32	
Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)
KTK	1	KTK	2	KTK	3
Sodyum Aljinat	0,5	Sodyum Aljinat	0,5	Sodyum Aljinat	0,5
Distile Su	98,5	Distile Su	97,5	Distile Su	96,5
Formülasyon F33		Formülasyon F34		Formülasyon F35	
Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)
KTK	1	KTK	2	KTK	3
Sodyum Aljinat	1	Sodyum Aljinat	1	Sodyum Aljinat	1
Distile Su	98	Distile Su	97	Distile Su	96
Formülasyon F36		Formülasyon F37		Formülasyon F38	
Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)
KTK	1	KTK	2	KTK	3
Sodyum Aljinat	1,5	Sodyum Aljinat	1,5	Sodyum Aljinat	1,5
Distile Su	97,5	Distile Su	96,5	Distile Su	95,5
Formülasyon F39		Formülasyon F40		Formülasyon F41	
Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)	Madde	%(a/a)
KTK	1	KTK	2	KTK	3
Sodyum Aljinat	2	Sodyum Aljinat	2	Sodyum Aljinat	2
Distile Su	97	Distile Su	96	Distile Su	95

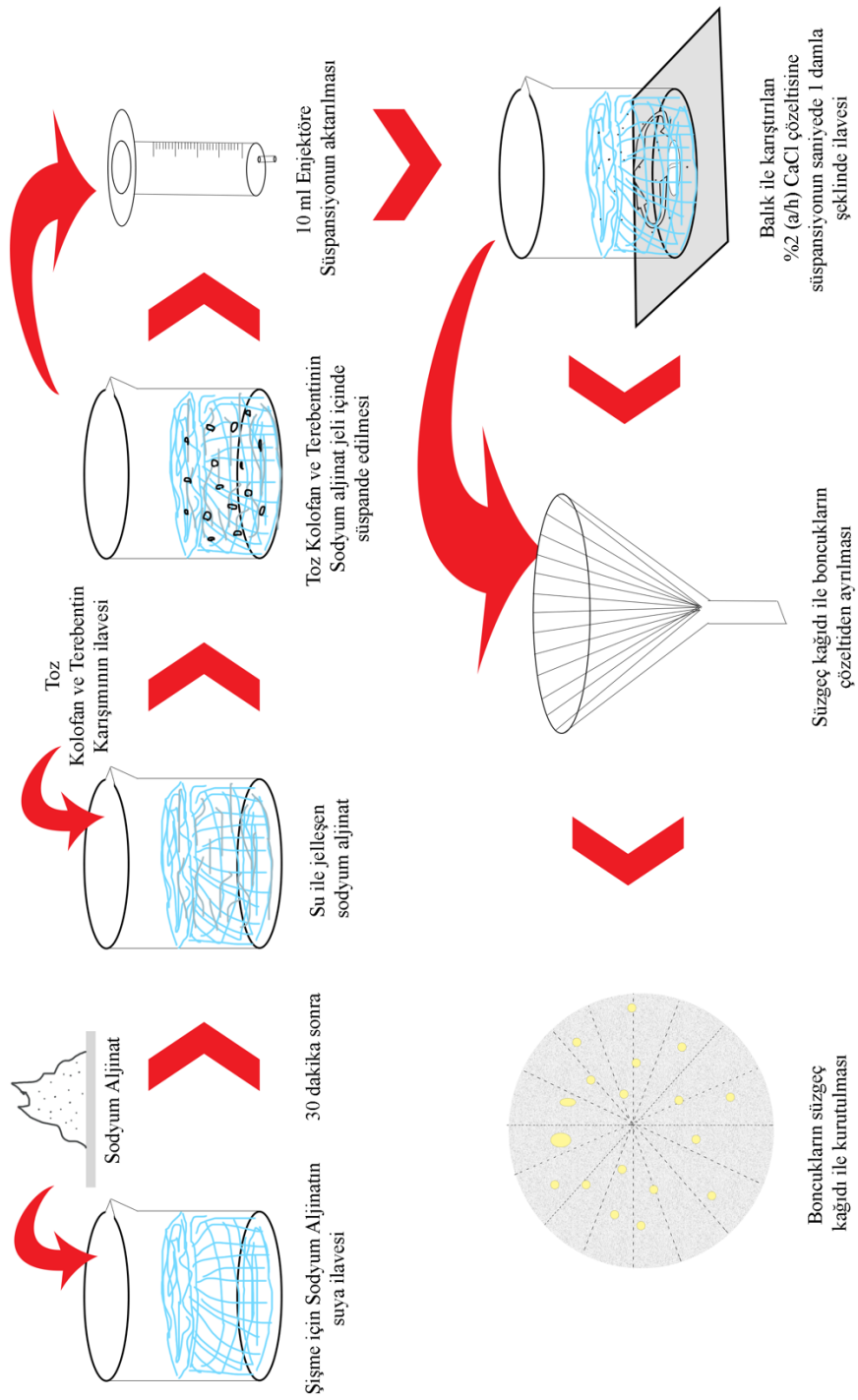
Boncuk hazırlama metodu

Drog materyalinin koku problemini en aza indirmek ve terebentin oranını koruması amacıyla aljinik asit jeli içerisinde süspande edilen toz terebentin ve kolofanın aljinat boncukları ile hapsedilmesi düşünülmüştür.

Tablo 3-11’de verilen boncukların hazırlanmasında izlenen aşamalar aşağıda sırasıyla belirtilmiştir. Boncuk üretimine ait akışın iyi anlaşılması için Şekil 3-20’de boncukların hazırlanmasına ait şema ile verilmiştir.

Boncuk Hazırlama Metodu:

- 1) Tartılan sodyum aljinat hacmine tamamlanmadan önce yeteri miktar su içerisinde ağzı parafilmle kapatılarak 150 ml beher içerisinde şişmeye bırakıldı (30 dakika).
- 2) Şişen sodyum aljinat hacmine tamamlandı.
- 3) Tartılan toz terebentin, kolofan karışımı şişen sodyum aljinat su karışımına ilave edilerek süspande edildi.
- 4) İçerisine karıştırıcı balık atılan süspansiyon sodyum aljinat oranına göre (viskozite artışına bağlı olarak) 3000-4000 rpm’de karıştırıldı.
- 5) Süspande haldeki karışım 10 ml’lik steril enjektörlerin arka kısmı çıkarılarak enjektöre doldurulur. Enjektörden madde kaybı olmaması için süspansiyonun iğneden geçemeyecek kadar büyük partiküller bulundurması sebebiyle enjektöre iğne ve koruyucusu takılarak enjektörden akma engellendi.
- 6) %2’lik (a/h) Kalsiyum klorür çözeltisi için yeteri miktar su içerisinde çözündürülen kalsiyum klorür balon jodede hacmine tamamlanarak tekrar karıştırıcı balık içeren behere aktarıldı.
- 7) Saniyede 1 damla olacak şekilde şırıngadan 3000 rpm’de balık(manyetik karıştırıcı) ile karıştırılan kalsiyum klorür çözeltisine hazırlanan süspande haldeki karışım damla damla şırınga ile ilave edildi.
- 8) Tüm damlatılacak süspansiyon tüketildikten sonra sertleşmenin sağlanması için 30 dakika daha oluşan boncuklar kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde karıştırıldı.
- 9) Sertleşen boncuklar huni ve süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek elde edildi.
- 10) Elde edilen boncuklar bir gece oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- 11) Kuruyan boncuklar optik mikroskop altında incelenerek fotoğraflandı ve küresel boncuk oluşturan formüllerin boncuk çapları ölçüldü.



Şekil 3-20: Boncuk hazırlanmasına ait şema

3.2.2. Formülasyona Karar Verilme Kriterleri

Hazırlanan formülasyonların in-vivo deneylerde uygulanması sırasında, depolanmasında farklı formülasyondan kaynaklı avantaj ve dezavantajlar olacağı öngörülmüştür. Hazırlanan tüm formülasyonlar aşağıda bulunan uygulama kolaylığı, birim dozun oral yoldan verilme kesinliği, stabilite, depolama, birim maliyet açısından değerlendirilerek nihai formülasyona karar verilmiştir.

Uygulama kolaylığı: Hazırlanan formülasyon çeşitleri hayvanlara uygulanması ve uygulamanın tekrarlanabilirliği açısından değerlendirildi. “İyi” uygulama kolaylığı ve tekrarlanabilirliği en yüksek formülasyonlara, “Kötü” uygulama kolaylığı ve tekrarlanabilirliği en düşük formülasyonlara verilerek aşağıdaki şekildeki gibi puanlanmıştır.

	İyi	Orta	Kötü
Uygulama Kolaylığı	+++	++	+

Birim Dozun Oral Yoldan Verilme Kesinliği: Hazırlanan formülasyonların her bir hayvana oral yoldan verilmesinde birim dozun hayvana ulaştırılma kesinliği değerlendirildi. “İyi” birim dozun hayvana ulaşmasında en yüksek kesinliği verecek formülasyonlara, “Kötü” en düşük kesinliği verecek formülasyonlara verilerek aşağıdaki şekildeki gibi puanlanmıştır.

	İyi	Orta	Kötü
Birim Dozun Oral Yoldan Verilme Kesinliği	+++	++	+

Stabilite: Kolofan, terebentin karışımının camsı geçiş sıcaklığı düşünülerek in-vivo uygulama esnasında uygulamayı kısıtlayacak, sıcaklıkla oluşacak problemler değerlendirilmiştir. “İyi” uygulama sırasında en az problem teşkil edecek, “Kötü” uygulama sırasında en çok problem oluşturabilecek formülasyonlara verilerek aşağıdaki tablodaki gibi puanlanmıştır.

	İyi	Orta	Kötü
Stabilite	+++	++	+

Depolama: Hazırlanan formülasyonların kapladığı hacim değerlendirilmiştir. “İyi” depolama hacmi düşük, “Kötü” fazla miktarda depolama hacmine ihtiyaç duyan formülasyonlara verilerek aşağıdaki tablodaki gibi puanlanmıştır.

	İyi	Orta	Kötü
Depolamada gereken hacim	+++	++	+

Birim Maliyet: Hazırlanan formülasyonların uygulama başı birim maliyeti üzerinden karşılaştırma yapılmıştır. “İyi” en az birim maliyet oluşturan, “Kötü” en fazla birim maliyet oluşturan formülasyonlara verilerek aşağıdaki tablodaki gibi puanlanmıştır.

	İyi	Orta	Kötü
Birim maliyet	+++	++	+

Yukarıda gösterilen kriterlere göre formülasyonlara (+) şeklinde puan verildi ve son formülasyona karar verilirken (+) sayısı en fazla olan formül uygulama için tercih edildi.

3.2.3. Karar verilen formülasyon üzerinde yapılan kontroller

Bölüm 3.2.2’de belirtilen kriterlere göre en yüksek puanı alan ve in-vivo deneylerde kullanılmasına karar verilen formülasyonun kontrolleri aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

3.2.3.1. Partikül Şekli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Optik mikroskop

Partikül büyüklüğü tespiti için kullanılan optik mikroskop yönteminde manuel olarak sayma dışında elde edilen görüntülerin yazılımsal olarak dökümü de sağlanabilmektedir.

Malvern Morphologi G-3 cihazı ile bakılan toz numunelerinin şekilleri açısından bilgi edinilerek toz karakterizasyonu için görüntülenen partiküller farklı yakınlık düzeyinde fotoğraflandı. Tozların partikül büyüklükleri elek analizi ile tespit edildiği için optik mikroskoptaki görüntüler toz partiküllerinin şekillerinin incelenmesi için faydalı olmuştur.

1-2 gram toz numunesi cihazın görüntünün alınacağı lam yüzeyine rastgele serpildi. Tozun tek bir noktada öbeklenmemesine dikkat edildi. Manuel serpme esnasında başarılı olunamıyorsa cihazın kendi içinde bulunan otomatik serpme cihazı da kullanılabilmektedir.

Cihaz serpilen tozun tarama şeklinde üzerinden geçerek fotoğraflar ve cihazın yazılımı üzerinden (Morphologi v7.11) görüntüler elde edildi.

Elek analizi

Bölüm 3.2.1.1.2’de anlatıldığı şekilde karar verilen formülasyonun son nokta tespiti yapıldı ve kaç dakikada elek analizinin sonlandırılması gerektiği gösterildi. Daha sonra final formülasyona ait 3 serinin elek analizi yapılarak partikül büyüklüğü dağılımı standart sapmaları ile bulundu.

3.2.3.2. Hausner oranı ve % Sıkışabilirlik

Bölüm 3.2.1.1.2’de belirtildiği gibi final formülasyona ait toz numunleri ile 250 ml mezür ile yapılan sıkıştırma işlemi ile final formülasyonun Hausner oranı ve % sıkışabilirlik oranları bulundu.

3.2.3.3. Yığın açısı ve Akma Süresi

Başlık 3.2.1.1.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan toz formülasyona yığın açısı ve akma süresi testi uygulandı. 3 seri ile çalışıldı.

3.2.3.4. Ağırlık Sapması Testi

20 adet doypack torba içeriğindeki toz maddeler darası alınmış cam 100 ml cam beher içerisinde tartıldı ve kayıt edildi.

Tartımların ortalamaları alındı, standart sapmaları hesaplandı. Bu tip preparatlar için farmakopede belirtilen kural tartılan preparatlardan 2’den fazlası %7,5 sapma miktarının dışına çıkmaması istenir ve hiç bir preparatın %15 oranından fazla sapma göstermemesi istenir.

3.2.3.5. İçerik Homojenitesi Testi

İçerik homojenitesi testinde uygulanan metot formülasyon bileşenlerinden kolofan ve terebentinin %100 organik solvanda çözünürken diğer bileşenlerden karboksi metil selüloz ve kalsiyum karbonatın %0 organik solvanda çözünmesine dayanarak ayrıştırılmasını içermektedir.

Mevcut formülasyondaki etken maddeler birçok farklı bileşenden oluşan kompleks yapılardır ve bu maddelerin stabilitelerine GC-MS cihazı ile bakılmıştır. Ancak bağıl oranlardan kaynaklanan homojen toz karışımı elde edilmesiyle ilgili problem olup olmadığını test etmek amacıyla böyle bir test tasarlandı ve uygulandı.

Kolofan ve terebentin toplam madde miktarlarının tüm formülasyon içeriğine oranı bulunması için primer ambalaj içerisinden çıkarılan tüm toz tartılmasının ardından organik solvanda (%96 (a/h)) çözündürülüp kalan çözünmemiş toz miktarı süzüldü ve tartılarak total çözünmemiş toz miktarı hesaplandı.

Hazırlanmış olan ağzı ısıyla kapatılmış 5 adet primer ambalaj (doypack torba) formülasyon numunesi toz kaybı oluşmayacak şekilde dikkatlice açıldı ve tartıldı ardından 250 ml erlene aktarıldı. Üzerine mezürde ölçülen 100 ml etil alkol %96 (a/h) konuldu. Hızla karıştırılarak alkolün tüm toza nüfuz etmesi sağlandı. Erlenin ağzı parafilm ile kapatıldı. Ardından sonikatörde 5 dakika bekletilerek çözünmemiş parçaların da çözünmeleri sağlandı. Ardından erlende hiç bir toz kalmayacak şekilde tüm çözündürülmüş ve çözünmeyen kısımların bulunduğu toz önceden darası kayıt edilmiş süzgeç kağıdından süzüldü. Erleninde aktarılamamış kısımlar kalması durumunda yeteri miktar etil alkol erlene aktararak tüm toz kütlesinin süzgeç kağıdına aktarılması sağlandı.

Süzgeç kağıdında herhangi bir kolofan ve terebentin kalıntısının kalmaması için filtre kağıdı üzerinde kolofan’a ait sarı renk kayboluncaya dek etil alkol ile yıkandı. Ardından filtre kağıdı huniden dışarı alınarak 3 saat boyunca 100° C’lik etüvde bekletildi. 2 saatin sonunda tartım yapıldı ve tekrar etüve konuldu 3. saatte tekrar tartıldığında ağırlığın değişmemesi beklendi.

Son tartım ağırlığı kayıt edilerek tüm toz formülasyon içerisindeki çözünmeyen bileşenlerin oranı bulundu.

3.2.3.6. DSC Analizi

Bölüm 3.2.1.1.3 de belirtilen DSC analiz yöntemine göre hazırlanan toz formülasyonun DSC analizi yapılarak Tg sıcaklığı bulundu.

3.2.3.7. Stabilité Testleri

Bölüm 3.2.2’de belirtilen kriterlere göre rekonstitüe süspansiyon formülasyonu hazırlanmasına karar verildi. Ve hazırlanan F7-F17 rekonstitüe süspansiyon formülasyonlarından F11 çökme hacmi, redispersiyon hızı, viskozite değerlerine göre in-vivo deneylerde kullanılmaya aday formül olarak belirlendi ve bu formül hızlandırılmış stabilite testleri için ICH klavuzlarına göre (Şekil 3-20) $40^{\circ}\text{C} \pm 2$ ve 75 ± 5 rölatif nemde başlangıç, 1. ay, 3. ay, 6. ayda 3 numune (n=3) doypack torbalarda bekletilerek aşağıda belirtilen analiz metodlarına göre incelendi.

Çalışma	Saklama Koşulları	Başvurularda istenen asgari zaman aralıkları
Uzun dönem*	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RN} \pm 5\% \text{ RN}$ or $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RN} \pm 5\% \text{ RN}$	12 ay
Orta**	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RN} \pm 5\% \text{ RN}$	6 ay
Hızlandırılmış	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RN} \pm 5\% \text{ RN}$	6 ay

Şekil 3-21: ICH Q1A-Q1F Stabilité testleri [121]

*Başvuru sahibine göre uzun dönem stabilite testlerinde birini seçebilir. **Eğer uzun dönem için $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\%$ Rölatif Nem (RN) ± 5 seçilirse orta seviye çalışma yapılmaz

Kolofan için analiz metodu

Test Çözeltisinin Hazırlanması:

25 mg test örneği 25 ml balon jojeye alındı. Hacmine Dimethylformamide ile tamamlandı. Çözünmesi için 2-3 dakika ultrasonik banyoda bekletilir. Çözeltinin 0,5 ml si 5 ml balon jojeye alındı ve üzerine 0,5 ml TMS türevlendirme (n o-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + %1 trimethylchlorosilane) reaktifi eklendi. 70°C sıcaklıkta 30 bekletilir. Oda sıcaklığına soğutulan örnek hacmine 5 ml ye n-hexane ile tamamlandı. Karıştırıcıda karıştırıldı. Fazlar birbirinden ayrıldıktan sonra n-hexane fazı sisteme enjekte edildi.

Kolofan analizine ait Kromatografik Şartlar

Kolon: HP-5MS 30m x 0,25mm x 0,25µm

Kolon Sıcaklığı:

Sıcaklık Artışı	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)
----	150	2
5 °C/dk	150 → 250	8
Toplam		30 Dakika

Enjeksiyon Hacmi: 5µl

Enjeksiyon Sıcaklığı: 250 °C

Split: 2:1

Kolon Akışı: 2 mL/dak

İyon Kaynağı Sıcaklığı: 230 °C

Arayüz Sıcaklığı: 250 °C

Solvent Kesim Zamanı: 3 dak

Quadripole Sıcaklığı: 150 °C

m/z Tarama: 40-550 m/z

Terebentin için analiz metodu

Test Çözeltilisinin Hazırlanması

50 mg test örneği 25 ml balon jojeye alındı. Hacmine n-hexane ile tamamlandı. Karıştırıcıda karıştırıldı. n-hexane fazı sisteme enjekte edildi.

Terebentine ait Kromatografik Şartlar

Kolon: HP-5MS 30m x 0,25mm x 0,25µm

Kolon Sıcaklığı:

Sıcaklık Artışı	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)
----	70	5
5 °C/dk	70 → 280	13
Toplam		60 Dakika

Enjeksiyon Hacmi: 5µl

Enjeksiyon Sıcaklığı: 250 °C

Split: 20:1

Kolon Akışı: 1,5 mL/dak

İyon Kaynağı Sıcaklığı: 230 °C

Arayüz Sıcaklığı: 250 °C

Solvent Kesim Zamanı: 3 dak

Quadripole Sıcaklığı: 150 °C

m/z Tarama: 40-550 m/z

Stabilite örnekleri ve zaman aralıkları

Paketlenmesi biten formülasyon numuneleri her zaman dilimine 3 adet denk gelecek şekilde numune hazırlanarak başlangıç, birinci, üçüncü, altıncı aylarda

bakılmak üzere $40^{\circ} \text{C} \pm 2$ %75 ± 5 rölatif nem (Şekil 3-20) ortamında zamanı geldiğinde incelenmek üzere stabilite kabinine (Nüve TK252) bırakıldı.

GC-MS cihazı ile yapılan testlerde karışım halde olan kolofan ve terebentin maddelerinin içinde yeni bir maddeye ait pik oluşup oluşmadığı, kolafan için içindeki madde miktarlarının tespiti ve terebentin için içindeki madde miktarlarının oranlarına bakıldı.

GC-MS cihazında yukarıda anlatıldığı şekilde formülasyon içerikleri incelendi. Kromatogramlarda farklı bir bileşiğe ait pik oluşup oluşmadığına bakıldı.

3.2.4. Ambalajlama

Tüm toz karışımı Şekil 2-13 (a)'da gösterilen kurdeleli (ribbon) karıştırıcıda karıştıktan sonra depolama alanına alınarak paketlenmek üzere 2 katlı hava geçirmeyen PE torbalara aktarıldı.

3 kg torbalar halinde bölünen bulk formülasyon manuel olarak hassas terazilerde tartılarak doypack torbalara dolduruldu.

Doldurulan doypack torbalar öncelikle kilit sistemleri kapatıldıktan sonra poşet kapatma cihazında 3 saniye boyunca tutularak ısı ile ağız kısmının yapışması sağlandı. Isı ile kapatma sayesinde doypack torbaların sızdırmaz özellik kazanmaları sağlandı.

3.2.5. İn-vivo çalışmalar

120 Holstein ırkı, 550-650 kg canlı ağırlıktaki sığırlarda yapılan ön süt numune alımı sonucu deney kriterlerine uygun grup ortalaması sağlayacak ve istatistiksel olarak anlamlı farklılığı olmayan iki grup belirlendi.

Deneye dahil edilen iki grup hayvandan hepsinin 50.000 somatik hücre/ml sayısının üstünde olmasına dikkat edildi. Deneye dahil edilen 25 hayvanın SHS ise 100.000 hücre/ml değerinin üzerindeydi.

Grup sayıları 15 hayvan deneme grubu için 15 hayvan kontrol grubu için belirlendi. Deney süreci 60 gün olarak tasarlandı.

3.2.5.1. Sığırların seçilmesine ait kriterler

İn-vivo deneyin yapılabilmesi için İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığından 13/01/2017-17793 tarih ve sayılı etik kurul izni alındı.

Aday hayvanlar belirlenirken SHS'ını etkileyen faktörler dikkate alınarak hayvanların özelliklerine göre sınıflandırma yapılmıştır. Deneyin yürütüldüğü çiftlikte hayvanların süt verimleri, sağım süresinin hangi döneminde olduğu kriterlerine göre değişik gruplar belirlenmiştir. Bu grupları yedikleri yemlerin rasyonu (karışım formülasyonu) grubun ihtiyaçlarına göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle deneye dahil edilecek hayvanların aynı grupta yer almalarına dikkat edildi.

Deneye dahil edilen hayvanlara ait özellikler Tablo 3-12'de gösterildi.

Deneye dahil edilen hayvanların yedikleri yem rasyonu (beslenmeye bağlı farklılıkların engellenmesi amacıyla), bulundukları ortamın aynı olması ile (hayvanların

maruz kalacağı fiziksel koşulların aynı olmasının sağlanması) gruplar arasındaki değişkenler en aza indirilmesi sağlandı.

Tablo 3-12: Deneye dahil edilen sığırlara ait özellikler tablosu

Hayvan Irkı	Holstein*
Yaşı (Ay)	42-116
SHS	>50.000 SHS
Canlı ağırlık	550-650 kg

*İn-vivo deneylerde kullanılan süt sığırları Doğamar /Çatalca-İstanbul işletmesine aittir.

Deneye dahil edilen hayvan gruplarının SHS arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olup olmadığı SPSS (IBM Statistics Ver 23) ile incelendi.

3.2.5.2. Rekonstitüe Süspansiyonun Uygulanması

Deney süresi boyunca yapılan süspansiyonun içirme uygulamaları aşağıdaki metoda göre yapıldı (Formülasyonun Oral Uygulama Metodu). Deneme süresince hazırlanan F11 formülasyonu günde bir defa sabah sağımının ardından yem yeme sırasında içirildi.

Formülasyonun Oral Uygulama Metodu:

- 1)Uygulanacak süspansiyonların hazırlanması için doypack torbalar içindeki tozlar 200 ml cam şişelere huni yardımı ile aktarılması
- 2)Ölçü kabında ayarlanmış işaretli yere kadar su ilavesi ve suyun dikkatlice toz dolu şişeye aktarılması
- 3)Homojen görüntü elde edene kadar 1-2 dakika çalkalanarak süspansiyon formülasyonunun hazırlanması
- 4) Deneme ve Kontrol grubundaki sığırların sağımdan sonra padoklarda yem yeme pozisyonuna gelmesi için yemliklere yem dökülmesi
- 5) Günlük hazırlanan ve deneme sığır grubunun kulak numaralarını içeren listenin kontrolü
- 6) Yem yeme durumunda olan sığırların kontrol edilerek listede olan hayvanların padoklardaki mekanizma ile sabitlenmesi
- 7) Yem yemeyen sığırların ayağa kaldırılarak sabitleme mekanizmasına gelmesi için uyarılması
- 8) Tüm hayvanların kulak numaralarının uygulama öncesi tekrar kontrol edilmesi
- 9) Hazırlanan süspansiyonların uygulama önce kısa şekilde çalkanarak (<15 saniye) sabitlenen hayvana içirilmesi (Şekil 3-22)
- 10) İçirme esnasında sığırın solunum yolunu korumak amacıyla dilin tutulmadan serbest içirme sağlanması
- 11) İçirme sonrası sabitleme mekanizmasının açılarak hayvanın salıverilmesi



Şekil 3-22: Rekonstitüe formülasyonların zapturapt altında içirilmesi

3.2.5.3. Süt Numunelerinin Alınması

Deney süreci boyunca hayvanlara uygulana F11 formülasyonunun sütteki SHS ve diğer süt parametrelerine olan etkileri incelendi. Süt numunelerinin alınması için aşağıda belirtilen protokol takip edildi.

Süt numune alma protokolü :

- 1) Süt numunesi alınacak hayvanlar için hazır 200 ml non steril kapların üzerine hayvan kulak numaralarının yazılması
- 2) Sağım alanına girmeden önce ellerin yıkanması ve eldiven takılması
- 3) Bone, maske takılması ve sağım için ayrı kıyafetlerin giyilmesi
- 4) Süt numune kaplarının ayrı bir kaba aktarılacak sayılarına göre büyükten küçüğe dizilmesi
- 5) Sağım için Delaval sağım sisteminde sağım bölümüne girilmesi
- 6) Otomatik kulak numarası okuyan sistemden hayvan kulak numaralarının takip edilmesi, deneme ve kontrol grubundaki 30 hayvanın kulak numaraları sağım ekranlarında görüldüğünde ilgili hayvanın arkasına konumlanmış Şekil 3-23'de gösterilen sistemin sağım başlamadan önce numune alma moduna getirilerek için üstteki mavi kapağın süt akışını sağlayacak şekilde ayarlanması
- 7) Sağım sonlanana kadar süt akışının damla damla numune alma sistemine aktığından emin olmak için takip edilir.
- 8) Sağım bittikten sonra numune alma sistemindeki kapak negatif hava basıncını değiştirecek şekilde çevrilmesi sütün toplandığı numune kabının çevirilerek çıkarılması
- 9) Süt numune kabından homojen süt alınması için numune kabının hafifçe çalkalanması ve numune kabından hayvanın kulak numarasının yazılı olduğu non-steril kaba 40 ml ve üstünde süt numunesinin aktarılması

10) Alınan süt numunelerinin ağızlarının sıkıca kapatılması. Numune alınan kabin hafif yana çevirilerek sızdırmazlığının kontrol edilmesi

11) Tüm numuneler alındıktan sonra mikrobiyal üremeyi durduracak ve süt incelenmeden önce yapısının bozulmaması için her bir numuneye bir adet microtab II konulması

12) Köpük kutu içerisinde bulunan buz içerisine süt numunelerinin konulması, numune kapağının kapatılarak aynı gün inceleme için laboratuvara götürülmesi

13) Laboratuvara ulaşan süt numuneleri analizleri öncesinde 2-8° C'de buzdolabında muhafaza edilmesi

Deney Süreci boyunca her hafta aynı gün sabah sağımlarında hayvanlardan süt numunesi alımı gerçekleştirildi. Süt numuneleri sabah sağımlarında Delaval otomatik sağımlar sistemi vasıtasıyla toplandı. Sağım kabinine giren hayvanların kulak numaralarını tespit eden bir sistem bulunmaktaydı. Bu sistem sayesinde sağımlar alanına giren kişi hayvan kulak numaralarını görebilmekteydi. Sağımda örnek toplamak için oluşturulmuş sistem sağımlar başından sonuna kadar damla damla numune kabına süt alınmasını sağlamaktaydı (Şekil 3-23). Bu sistem sayesinde sağımlar başında ve sonunda farklı seviyelerde olan somatik hücre sayısını tüm sağımlar ortalamasını gösterecek şekilde tek bir numune kabında toplanabilmekteydi. Bu şekilde alınan numune sağımlar başında ve sonundaki somatik hücre değişimlerinin hatalı sonuç vermesini engelleyerek sağımdaki SHS daha doğru analiz edilmesini sağlamaktaydı.



Şekil 3-23: Süt numunesi almak için kullanılan sistem [122]

Alınan örnek 100 ml non steril kaplara aktarıldıktan sonra 1 saat içerisinde süt numunelerine bakılacak laboratuvara iletili. Her bir kabin üzerinde hayvan kulak numarası belirtilmiş şekilde laboratuvara iletilen numuneler buzdolabında 2-8° C de bekletilerek gün içerisinde süt örneklerinin analizi yapıldı.

3.2.5.4. Süt Numunelerinin Analizi

Sağmal ineklerden çalışma süresince haftada bir kez aynı gün 30 sefer her defasında 40 ml süt örneği alındı. Süt örneklerinin nakli sırasında somatik hücre sayısı (SHS) ve süt bileşenlerini etkilemeden mikrobiyal üremeyi durduran kimyasal tabletler (Microtabs II) kullanılarak sütün yapısının bozulması engellendi ve süt örnekleri aynı gün içinde soğuk zincirde İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı Laboratuvarına götürüldü. Süt örnekleri su banyosunda 40°C’de ısıtıldıktan sonra somatik hücre sayısı, yağ, protein, laktoz ve kuru madde değerleri tespit edildi. Analizlerin yapılmasında, Zootečni Anabilim Dalı Laboratuvarında hücre sayım cihazı (Somacount 150) ve süt bileşenleri ölçüm cihazı (Bentley 150) entegrasyonu ile oluşturulmuş olan ve Flow cytometry analiz yöntemiyle çalışan Combi 150 (Bentley) birlikte kullanıldı. Mevcut cihaz ve kullandığı analiz yöntemleri ICAR tarafından onaylıydı.

Somatik Hücre Sayım Cihazı (somacount 150) laser flow cytometry prensibi ile çalışmakta olup analiz sistemin doğruluğu 100.000 somatik hücre/ml düzeyinde $CV < \%5$, 300.000 somatik hücre/ml düzeyinde $CV < \%3$, 500.000 somatik hücre/ml düzeyinde $CV < \%2$ olarak ölçmektedir. Ölçüm aralığı 0 ile 10.000.000 hücre/ml arasındadır.

Süt Bileşenleri Cihazı ise çiğ sütte infrared yöntemi ile yağ, protein, laktoz, toplam kuru madde ölçümü yapmaktadır. Analiz sisteminin ölçüm aralıkları; yağ için: % 0-50 arasında, protein için: % 0-15 arasında, laktoz için: % 0 – 15 arasında, kuru madde için: % 0 – 60 arasında ölçüm yapabilmektedir. Analiz sisteminin doğruluğu; yağ için: Majonnier yöntemine göre $CV < \%1$, protein için: Kjeldal yöntemine göre $CV < \%1$, laktoz için: Polarimetre yöntemine göre $CV < \%1$, kuru Madde için: kurutma fırınına göre $CV < \%1$ düzeyindedir.

3.2.6. Deney Sonuçlarının İstatistiksel olarak değerlendirilmesi

Sütte bulunan SHS, süt yağı, proteini miktarları ve haftalık sağılan süt miktarlarının günlük ortalaması (L) haftalık değişimleri deneme grubu ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Elde edilen veriler haftalık olarak kendi içerisinde non-parametrik Mann Whitney U testi ile SPSS (IBM Statistics Ver 23)’te değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. KTK'nın Toz edilmesi ve Toz KTK'da Yapılan Kontroller

KTK'nın toz edilmesi ve Toz KTK'DA yapılan kontrollere ait bulgular alt başlıklarda gösterildi.

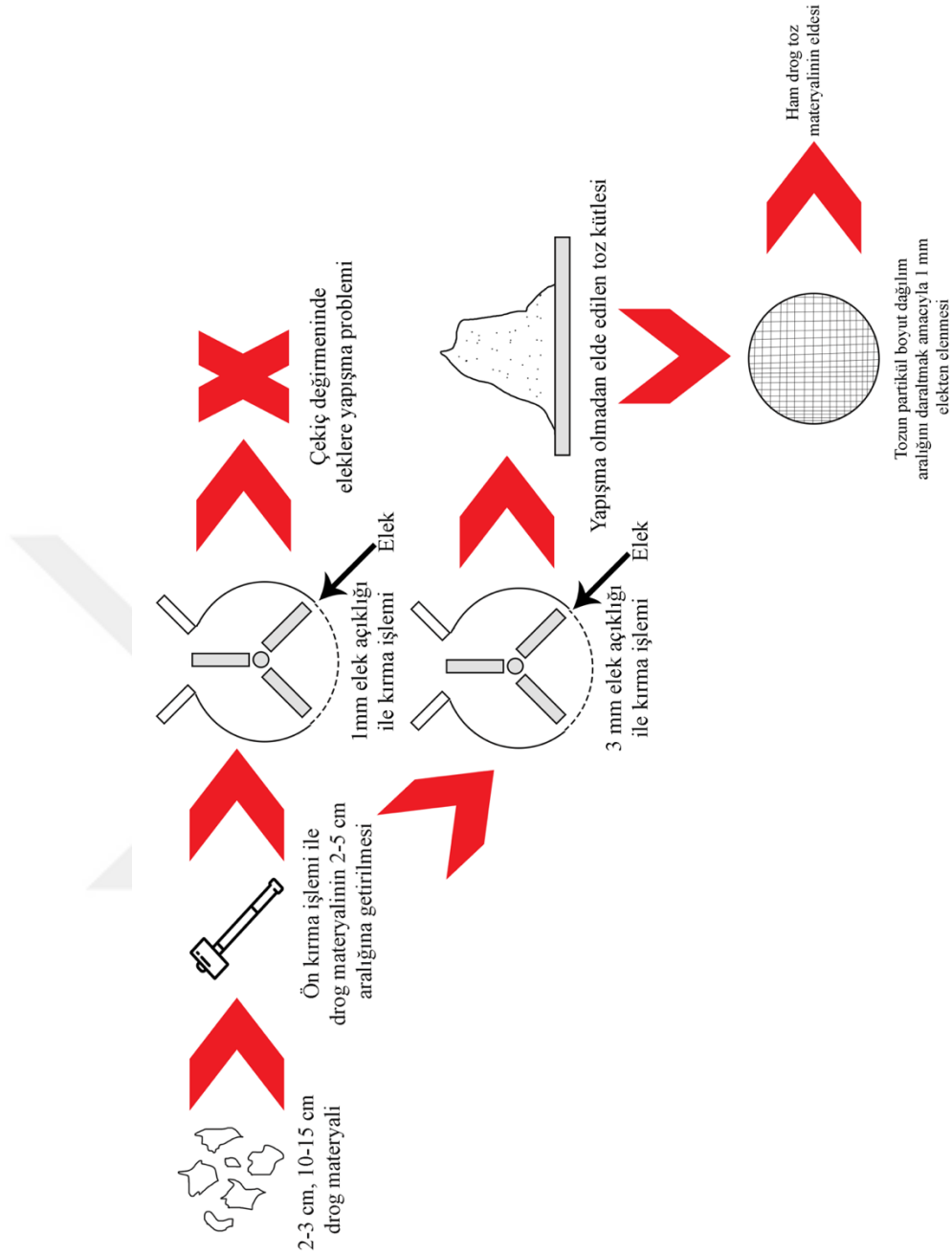
4.1.1. KTK'nın Toz Edilmesi

Elde edilen drog materyali 3-5 cm ve 10-15 cm büyüklüğündeydi. Drogları çekiç değirmeninde besleme bölümüne dökmeden önce 10-15 cmlik büyük parçalar ayrı bir alanda çekiçle parçalanarak daha küçük parçalar elde edildi. Daha sonra bu parçalar çekiç değirmenin besleme bölümüne döküldü. Çekiç değirmeni 1 ton/saat işleme kapasitesine sahipti.

İstenilen toz materyalinin 1 mm'nin altında olması isteniyordu. Bu nedenle çekiçli değirmen sisteminde elek kısmına 1 mm açıklıktaki elek yerleştirildi. Büyük parçaların değirmeni zorlamayacak şekilde küçültülmesiyle 2-3 cm aralığında drog materyali değirmenin besleme bölümüne döküldü. Kısa sürede bitmesi beklenen toz etme işlemi esnasında kısa sürede elekten toz gelmemeye başladı. Bunun üzerine cihaz kapatılıp elek sistemi çıkarıldı. Parçalanmış drog materyalinin elek deliklerini tıkararak elemeyi engellediği fark edildi. Bunun üzerine 3 mm elek ile üretim tekrar denendi.

3mm elek takıldıktan sonra aynı şekilde 3-5 cm aralığında boyutlarda drog materyali çekiç değirmeninin besleme bölümüne konuldu. 5 dakikadan kısa sürede tüm drog materyalinin toz edilmesi sağlandı. Drog materyalinin 1 mm altında olmasını sağlamak ve partikül boyut dağılımının daha dar bir aralığa çekmek amacıyla elde edilen tüm toz drog 1 mm elekten elendi.

Yapılan işlemlere ait akış şeması Şekil 4-24'te gösterildi.



Şekil 4-24: KTK materyalini toz edilmesi için yapılan işlemlere ait akış şeması

4.1.2. Toz Edilen KTK’da Yapılan Kontroller

Toz edilen KTK’nın kontrollerine ait sonuçlar alt başlıklarda verildi.

4.1.2.1. KTK materyalindeki yabancı madde miktarları

1 mm elekten geçirilmeden önce ve sonra tespit edilen yabancı madde miktarları sırasıyla Tablo 4-13 ve Tablo 4-14’te gösterildi.

Tablo 4-13: KTK materyalinin 1 mm elekten geçirilmeden önce yabancı madde miktarları

Tartılan drog miktarı (g)	Süzgeçte kalan madde miktarı (g)	Yabancı madde miktarı yüzdesi(%)
1,0032	0,051	5,084
1,0021	0,049	4,890
1,0005	0,047	4,477
Ortalama $\pm$ SD: 4,817 $\pm$ 0,253 g		

Tablo 4-14: KTK materyalinin 1 mm elekten geçirildikten sonraki yabancı madde miktarları

Tartılan drog miktarı (g)	Süzgeçte kalan madde miktarı (g)	Yabancı madde miktarı yüzdesi(%)
1,0005	0,032	3,184
1,0004	0,03	2,999
1,0006	0,0343	3,428
Ortalama $\pm$ SD: 3,204 $\pm$ 0,176 g		

Bölüm 3.2.1.1.2 de belirtildiği şekilde yapılan toz drogtaki yabancı madde miktarlarının tespitinde drogun 3 mm elek bulunan çekimli değirmen ile toz edilmesi sonrasında 1 mm elekten ön eleme yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra alınan numuneler incelendi.

4.1.2.2. % Sıkışabilirlik (Carr İndeksi) ve Hausner Oranı

Toz KTK'ya ait küme, sıkışmış dansite, housner oranı ve % Sıkışabilirlik değerleri Tablo 4-15'te gösterildi.

Tablo 4-15: Toz KTK'ya ait küme, Sıkışmış Dansite, Housner Oranı ve % Sıkışabilirlik Değerleri

Numune ağırlıkları: 100 g	N₁	N₂	N₃
V₀	242 ml	216 ml	220 ml
V₁₀	222 ml	202 ml	204 ml
V₅₀₀	182 ml	154 ml	160 ml
V₁₂₅₀	176 ml	150 ml	154 ml
V₁₇₅₀	176 ml	150 ml	154 ml
ρ_{küme}	0,413 g/ml	0,463 g/ml	0,455 g/ml
ρ_{küme ort ± SD}	0,444 g/ml ± 0,022		
ρ_{sıkışmış}	0,568 g/ml	0,667 g/ml	0,649 g/ml
ρ_{sıkışmış ort ± SD}	0,628 g/ml ± 0,043		
Housner Oranı	1,375	1,441	1,426
Housner Oranı Ort. ± SD	1,414 ± 0,028		
%Sıkışabilirlik	37,53	30,585	29,892
%Sıkışabilirlik Ort. ± SD	32,669 ± 3,449		

V₀ : İlk Hacim

V₁₀ : 10 vuruş sonrası hacim

V₅₀₀ : 500 vuruş sonrası hacim

V₁₂₅₀ :1250 vuruş sonrası hacim

V₁₇₅₀ :1750 vuruş sonrası hacim

Toz KTK housner oranına göre 1,414 ± 0,028 sonucu ile kötü akış karakteri gösterdi.

Toz KTK % sıkışabilirlik değerine göre $32,669 \pm 3,449$ çok kötü akış karakteri gösterdi.

4.1.2.3. Yığın Açısı ve Akma Süresi

Bölüm 3.2.1.1.2 belirtildiği şekilde huniye konulan toz KTK numunesinin serbestçe akması beklendi. Ancak maddenin adeziv ve kohezif kuvvetlerinin fazla olması sebebiyle serbest akış görülmedi.

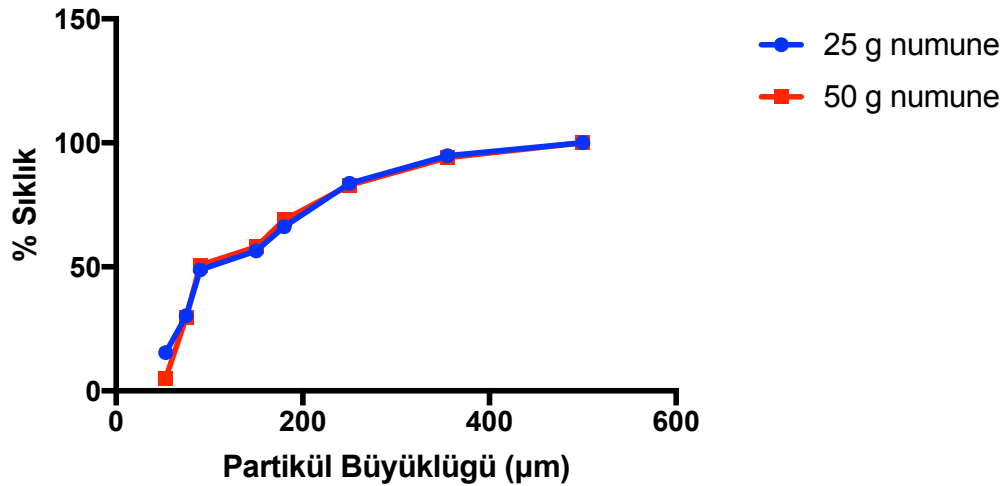
Yığın açısı için farmakopede belirtildiği üzere düzgün koni oluşumu sonuçların değerlendirilebilmesi için gereklidir. Ancak koniden serbestçe akmayan toz sebebiyle akış esnasında koniye müdahale edildiği için tozun yığın açısını hesaplamak için düzgün koni oluşturulamadı.

4.1.2.4. Elek Analizi

Son Nokta Tespiti ve Test Örnek Miktarının Belirlenmesi

25, 50 g toz KTK numunesinden alınarak farklı gram ağırlıklarında son nokta tespit edilmeye çalışıldı. Bölüm 3.2.1.1.2’de anlatıldığı gibi her 5 dakikada bir elek sallama cihazı durdurularak eleklerin ağırlıkları ölçüldü ve eleklerin bir önceki ağırlıkları ile aralarındaki fark tüm elekler için %5’i geçmeyecek duruma geldiğinde test bitirildi. Farklı ağırlıktaki test numuneleri için farklı son dakikalar bulundu.

Son nokta tayini sırasında elek üstlerinde kalan yüzde miktarlar karşılaştırılarak elekler için uygun olan numune miktarı 25 g olarak seçildi. Numune miktarının seçilmesinde 50 g numunenin 75 µm’lik elekte biriken madde oranının(Şekil 4-27) 25 g numuneye göre (Şekil 4-26) fazla olması sonucu 50 g numunenin 75 µm elek için fazla geldiği düşünüldü.



Şekil 4-25: Toz KTK numunelerine ait son nokta tespitinde kümülatif yüzde sıklık partikül büyüklüğü dağılımı

25 ve 50 g toz KTK numunesi ile yapılan son nokta tespitine ait kümülatif yüzde sıklık ve partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 4-25’te gösterildi.

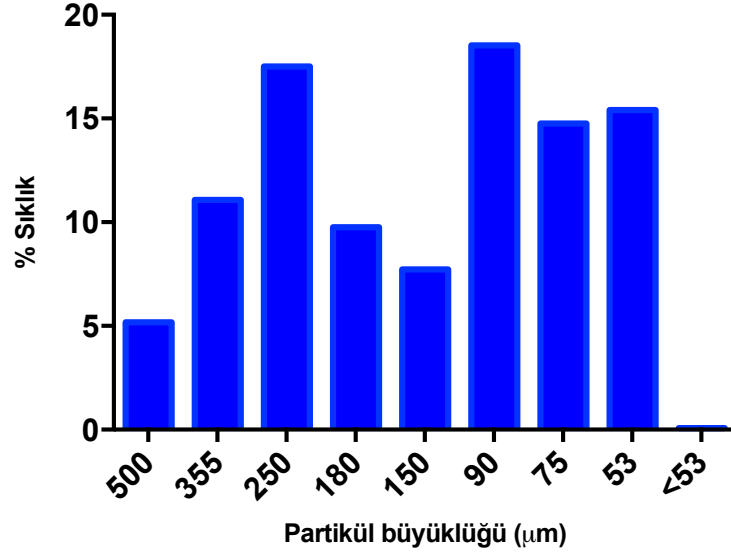
25 g toz KTK numunesi için yapılan son nokta tespiti testine ait % miktar, % kümülatif miktarlar Tablo 4-16’da gösterilmiştir. Hesaplanan toz partikül büyüklüklerinin 25 g toz numunesi için yüzde sıklıkları Şekil 4-26’da gösterilmiştir.

50 g toz KTK numunesi için yapılan son nokta tespiti testine ait % miktar, % kümülatif miktarlar Tablo 4-17’de gösterilmiştir. Hesaplanan toz partikül büyüklüklerinin 50 g toz numunesi için yüzde sıklıkları Şekil 4-27’de gösterilmiştir.

25 g toz KTK numunesi için son nokta 30 dakika iken, 50 g toz numunesi için son nokta 35 dakika olarak bulundu.

Tablo 4-16: 25 g Toz KTK numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi

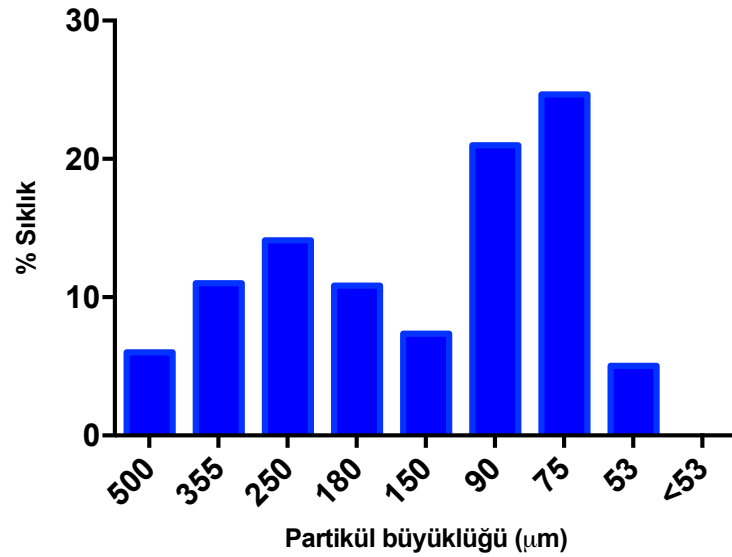
Mesh no	Elek boyutu (μm)	% Miktar	% Miktar Kümülatif
35	500	5,18	100,00
45	355	11,08	94,82
60	250	17,51	83,74
80	180	9,75	66,23
100	150	7,72	56,49
170	90	18,52	48,77
200	75	14,76	30,25
270	53	15,41	15,49
	53>	0,08	0,08



Şekil 4-26 : 25 g Toz KTK numunesine ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları

Tablo 4-17: 50 g Toz KTK numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi yüzde miktarları

Mesh no	Elek boyutu (μm)	% Miktar	% Miktar Kümülatif
35	500	6,00	100,00
45	355	11,01	94,00
60	250	14,10	82,99
80	180	10,83	68,90
100	150	7,37	58,07
170	90	20,99	50,70
200	75	24,66	29,71
270	53	5,05	5,05
	53>	0,00	0,00



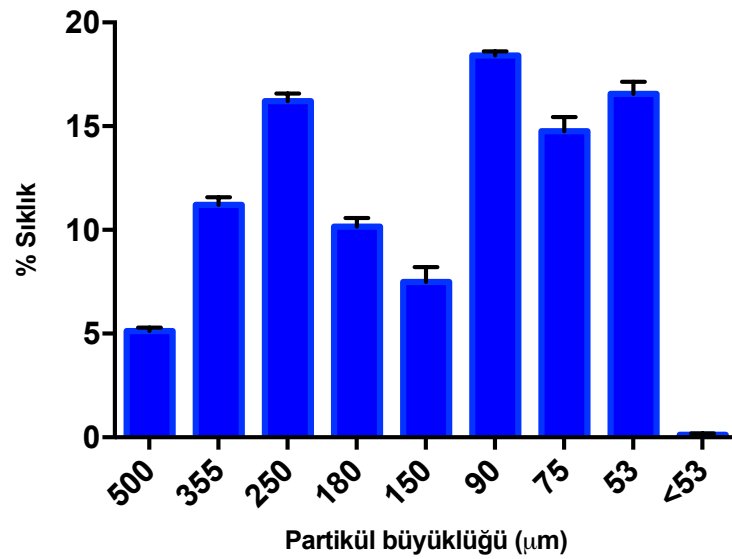
Şekil 4-27 : 50 g Toz KTK ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları

Elek analizi

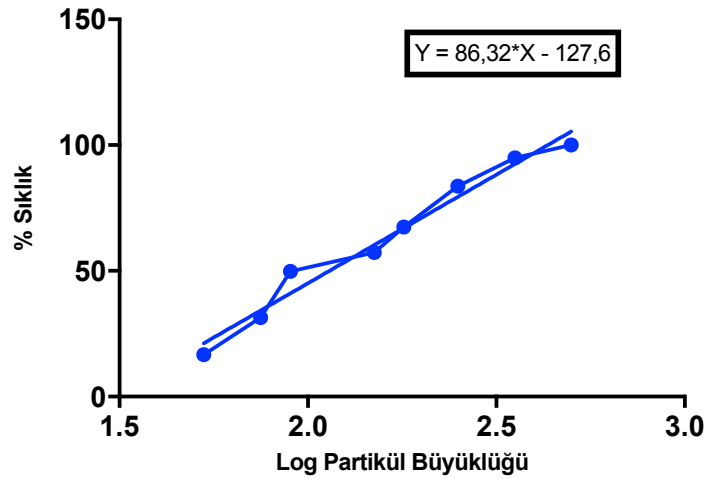
Son noktası ve numune miktarı tespit edilen toz drog için elek analizi 3 seri numune ile yapıldı. Toz KTK numunesine ait % miktarlar Tablo 4-18’de, partikül büyüklüğüne göre % Sıklık miktarları Şekil 4-28’de, toz drogun yarı logaritmik kümülatif % sıklık değerleri ile partikül büyüklüğüne ait denklem Şekil 4-29’da gösterildi.

Tablo 4-18 : Toz edilen KTK'ya Ait Elek Analizi

Elek boyutu (µm)	Mesh numarası	30 dk	%miktar	SD	% kümülatif
500	35	1,27	5,12	0,17	5,12
355	45	2,78	11,20	0,37	16,32
250	60	4,02	16,20	0,37	32,51
180	80	2,52	10,15	0,43	42,67
150	100	1,86	7,49	0,72	50,16
90	170	4,57	18,41	0,20	68,57
75	200	3,66	14,75	0,69	83,32
53	230	4,11	16,56	0,58	99,88
53>	270	0,03	0,12	0,07	100,00
Total Miktar		24,82			



Şekil 4-28: Toz edilen KTK numunesine ait elek analizi yüzde partikül miktarları



Şekil 4-29 : Toz KTK partikül büyüklüğü dağılımı yarı logaritmik

Şekil 4-29'da belirtilen denkleme göre toz KTK için d_{10} , d_{50} , d_{90} değerleri aşağıda gösterildi.

Toz KTK için değerler;

$$d_{10} = 39,269 \mu\text{m}$$

$$d_{50} = 114,112 \mu\text{m}$$

$$d_{90} = 331,601 \mu\text{m}$$

4.1.2.5. Toz Edilen KTK'daki Terebentin Miktarı

İlk ayda görülen terebentin miktarı ve altıncı ayda görülen terebentin miktarı Tablo 4-19 ve Tablo 4-20'de gösterildi. İlk ay terebentin miktarı $\% 3,72 \pm 0,21$ (h/a) iken 6 ayın ardından $3,1 \pm 0,041$ (h/a) oldu.

6 aylık sürede azalan terebentin oranının anlamlı olup olmadığı student t testi ile incelendi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ ($p = 0,116$) bulundu. Değişim miktarı student t testine göre anlamlı olmadı (Tablo 4-21).

Tablo 4-19: başlangıç toz KTK'da bulunan terebentinin tespiti

Hacim(ml)	Ağırlık(g)	Dansite(g/ml)
1,75	1,5274	0,8728
1,73	1,5262	0,8822
2,1	1,8478	0,8799
1,86	Ortalama	0,8783
0,208	Standart Sapma	0,005

Tablo 4-20: Altıncı ay toz KTK’da bulunan terebentinin tespiti

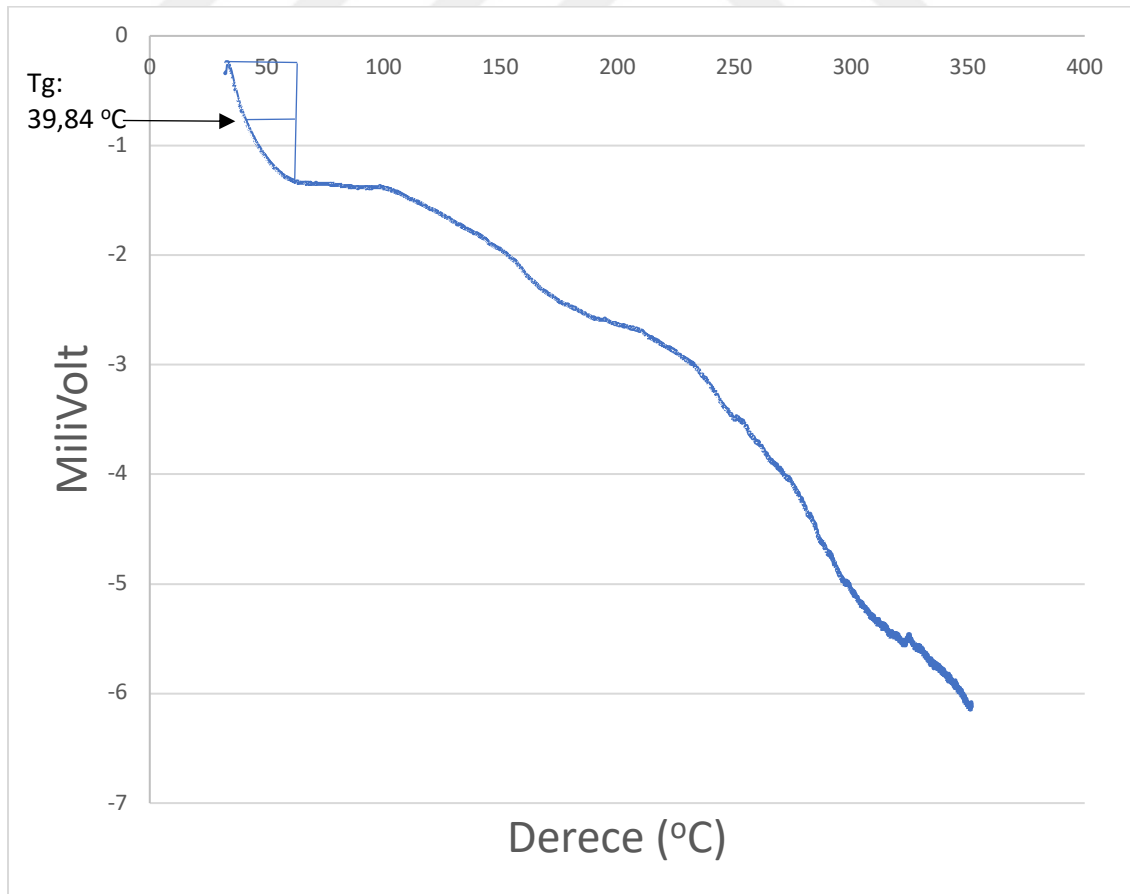
Hacim(ml)	Ağırlık(g)	Dansite(g/ml)
1,55	1,369 g	0,8834
1,6	1,362 g	0,8511
1,5	1,333 g	0,8887
1,55	Ortalama	0,8744
0,041	Standart Sapma	0,020

Tablo 4-21: Student t testi ile başlangıç ve altıncı ay sonuçlarının karşılaştırılması

Grup	n	Ort.	Std. Sapma	t	df	p
Başlangıç	3	1,8600	0,20809	2,509	2,230	0,116
6. ay	3	1,5500	0,05000			

4.1.3. KTK’nın DSC Analizi

Bölüm 3.2.1.1.3’te belirtildiği şekilde incelenen toz KTK’nın DSC analizine ait grafik ve bulunan Tg sıcaklığı Şekil 4-30’de gösterildi.

**Şekil 4-30: Toz KTK’nın DSC analizi**

4.2. Süspansiyon Kontrolleri

Tablo 3-9’da hazırlanan süspansiyon formülasyonları görülmektedir. Bu formülasyonların kontrollerine ait bulgular aşağıdaki gibidir.

4.2.1. Çökme Hacmi, Flokülasyon Derecesi, Redispersiyon Hızına ait Bulgular

Çökme hacmi, flokülasyon derecesi ve redispersiyon hızı bölüm 3.2.1.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 3-9’da gösterilen formüllere ait süspansiyon kontrolleri Tablo 4-22’de gösterildi.

Tablo 4-22: Hazırlanan süspansiyon ve rekonstitüe süspansiyon formülasyonlara ait süspansiyon kontrollerine ait veriler

Formülasyon Kodu	Çökme Hacmi(F)	Flokülasyon Derecesi (β)	Redispersiyon Zamanı(sn)	Çevirme Sayısı(kez)
F1	0,451 $\pm$ 0,011	-*	33,33 $\pm$ 1,16	16,67 $\pm$ 1,53
F2	0,495 $\pm$ 0,018	-*	24 $\pm$ 1	11,67 $\pm$ 0,58
F3	0,542 $\pm$ 0,031	-*	16,33 $\pm$ 0,58	8,33 $\pm$ 0,58
F4	0,546 $\pm$ 0,015	-*	14 $\pm$ 1	7,33 $\pm$ 0,58
F5	0,631 $\pm$ 0,026	-*	10,33 $\pm$ 0,58	4,33 $\pm$ 0,58
F6	0,663 $\pm$ 0,014	-*	19,33 $\pm$ 0,58	8,33 $\pm$ 0,58
F7	0,589 $\pm$ 0,023	-*	67 $\pm$ 2,65	35 $\pm$ 1
F8	0,641 $\pm$ 0,003	-*	66 $\pm$ 3,61	32,67 $\pm$ 3,06
F9	0,624 $\pm$ 0,018	-*	77,67 $\pm$ 2,52	43,33 $\pm$ 1,528
F10	0,548 $\pm$ 0,014	-*	57,33 $\pm$ 2,52	30,33 $\pm$ 1,53
F11	0,853 $\pm$ 0,025	-*	48,33 $\pm$ 1,53	24,33 $\pm$ 2,31
F12	0,989 $\pm$ 0,009	-*	139 $\pm$ 3,61	70 $\pm$ 1
F15	0,974 $\pm$ 0,009	1,144 $\pm$ 0,036	59,33 $\pm$ 0,58	32,33 $\pm$ 1,16
F16	0,979 $\pm$ 0,009	1,149 $\pm$ 0,036	60 $\pm$ 4,36	29,67 $\pm$ 2,52
F17	0,995 $\pm$ 0,009	1,168 $\pm$ 0,031	78 $\pm$ 2,65	43,33 $\pm$ 1,53

*Flokülasyon ajanı kullanılmayan formülasyonların β değerleri hesaplanmamıştır.

F16, F17, F18 formüllerinde artan oranda flokülasyon ajanı kullanılmış ve defloküle halleri için flokülasyon ajanı içermeyen F11 formülasyonu baz alınmıştır.

4.2.2. Reolojik Tayinlere ait Bulgular

Bölüm 4.2.1’de süspansiyon kontrolleri ile incelenen formülasyonlar arasında F10, F11, F12 formülasyonları redispersiyon süresi, çökme hacmi özellikleri ile öne çıkmaktaydı. Bu formülasyonların viskozite özelliklerini tespit etmek amacıyla Brookfield dönen mil viskozimetresi ile yapılan viskozite ölçümlerine dair bulgular Tablo 4-23, 4-24, 4-25’te gösterilmiştir.

Tablo 4-23: F10 Formülasyonu İçin Viskozite Tayini

Spindle 2/ 30 rpm	N1	N2	N3	ORT ± SD
1’ Cp	128	109	115	117,3 ± 9,7
1’ Tork	9,6	8,2	8,8	8,9 ± 0,7
5’ Cp	85	84	84	84,3 ± 0,6
5’ Tork	6,4	6,3	6,3	6,3 ± 0,1

Tablo 4-24: F11 Formülasyonu İçin Viskozite Tayini

Spindle 2/ 30 rpm	N1	N2	N3	ORT ± SD
1’ santipuaaz	621	623	630	624,7 ± 4,7
1’ Tork	46,6	46,7	46,7	46,7 ± 0,1
5’ santipuaaz	580	591	605	592 ± 12,5
5’ Tork	43,6	44,4	44,7	44,2 ± 0,6

Tablo 4-25: F12 Formülasyonu İçin Viskozite Tayini

Spindle 3/ 30 rpm	N1	N2	N3	ORT ± SD
1’ santipuaaz	1677	1777	1650	1701,3 ± 66,9
1’ Tork	50,3	53,3	49,5	51 ± 2
5’ santipuaaz	1627	1690	1607	1641,3 ± 43,3
5’ Tork	48,8	50,7	48,2	49,2 ± 1,3

Artan tork değerlerine karşı viskozitenin değişimi için F12 formülasyonu ile çalışıldı. Tablo 4-26’da F12 formülasyonuna ait artan hız ile viskozite ve tork değişimi gösterildi.

Tablo 4-26: F12 formülasyonunun artan hıza karşı viskozite ve tork değişimi

Spindle 3	Viskozite(cp)	Tork %
10 rpm	2550	25,5
12 rpm	2442	29,3
20 rpm	2150	43
30 rpm	1923	57,7
50 rpm	1642	82,1
60 rpm	1537	92,2

4.3. Pelet Oluşturmak Amacıyla Denenen Formülasyonlara ait Bulgular

Yukarıda granülasyon oluşturmak amacıyla verilen F19, F20, F21 kodlu formüllerin hazırlanması sonrası birbirine bağlı ancak yeterince tek düze olmayan çatlakların bol olduğu bir yapı elde edildi.

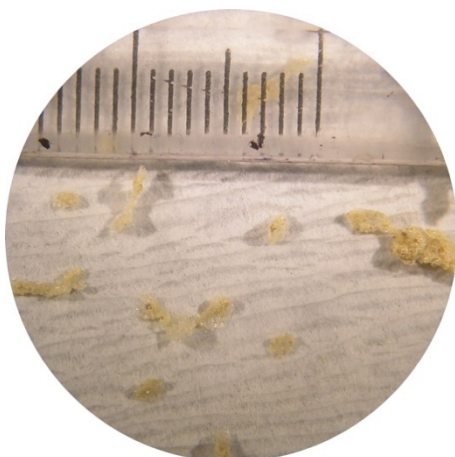
F22, F23, F24 formüllerinde F19, F20, F21 formüllerindeki kuru görüntünün engellenmesi için gliserin ve maddenin kendi çözündüğü ortam olan alkol ilavesi ile etken maddenin kendisinin bağlayıcı olarak görev alması istendi. Ancak alkolün farklı oranlarda kullanılması ile formül fazla ıslak yapıya dönüştü. Kullanılan en düşük alkol miktarında da formülasyonun ıslak yapısı devam etti.

F25, F26, F27 ile yapılan formüllerde bağlayıcı olarak PVP ilave edildi. Bağlayıcı ilavesi ile gliserin ve alkole gerek kalmadan bağlanma ve homojen görüntü elde edildi. Ancak denenen tüm formüllerde belirli karıştırmanın ardından engellenemeyen bir macun kıvamına gelme görüldü ve boyutlandırma esnasında elek yüzeyine yapışma problemi oluştu.

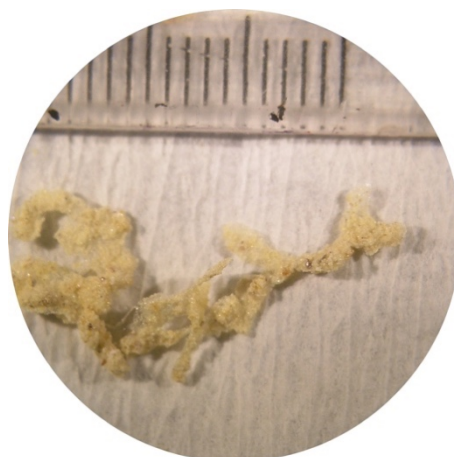
Formülasyonun hamur kıvamı almaması için farklı miktarlarda dolgu maddesi eklenerek F28, F29, F30 formülasyonları oluşturuldu. Oluşturulan formülasyonların ekstrüderden geçecek durumda olmaması ve işlem esnasında oluşabilecek ısı kaynaklı yapışma özelliği düşünülerek cihaz ile deneme yapılmadı.

4.4. Sodyum Aljinat Boncuklarına ait Bulgular

Tablo 3-11’de gösterilen boncuk formülleri boncuk hazırlama metoduna göre hazırlandı. Ardından optik mikroskopta boyut ve şekillerini incelemek amacıyla fotoğraflandı (Şekil 4-31).



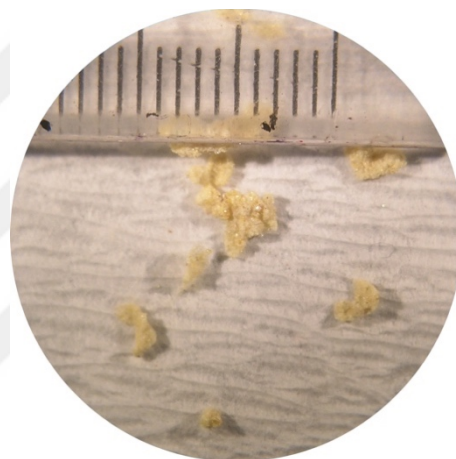
(a):F30



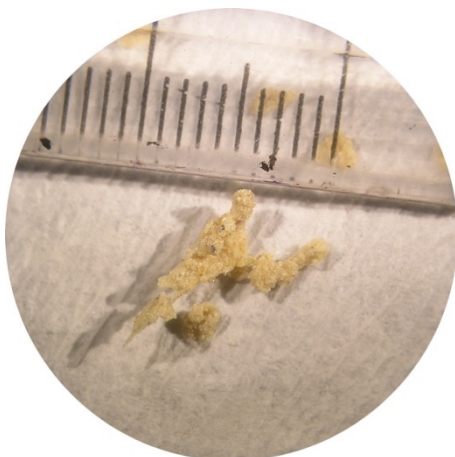
(b):F31



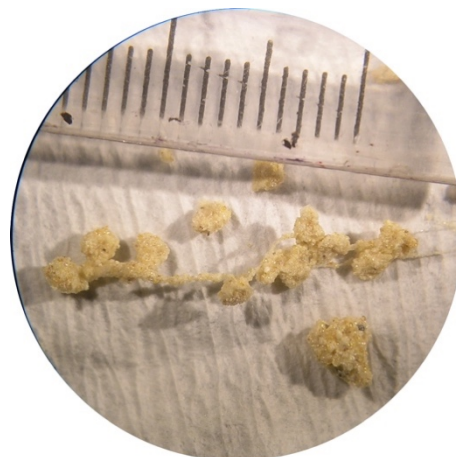
(c):F32



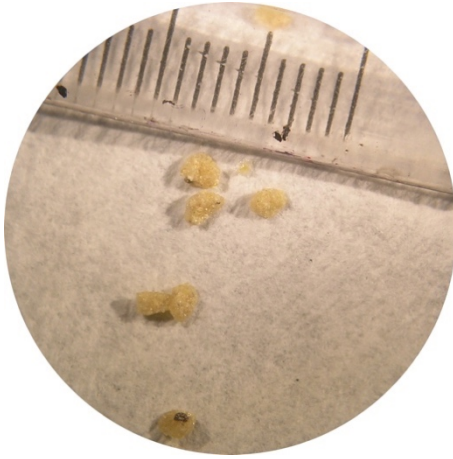
(d):F33



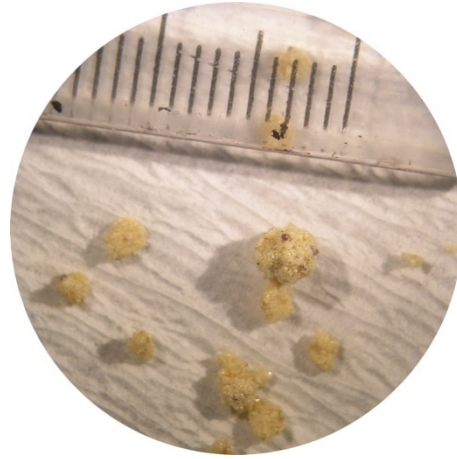
(e):F34



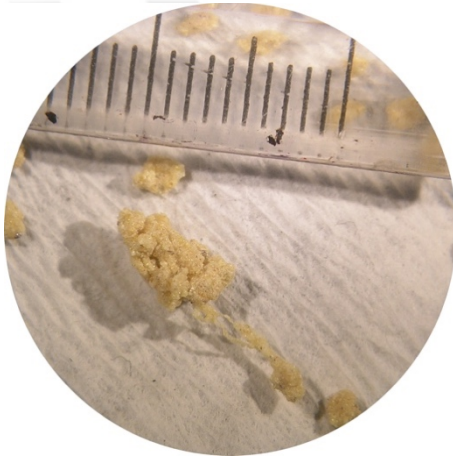
(f):F35



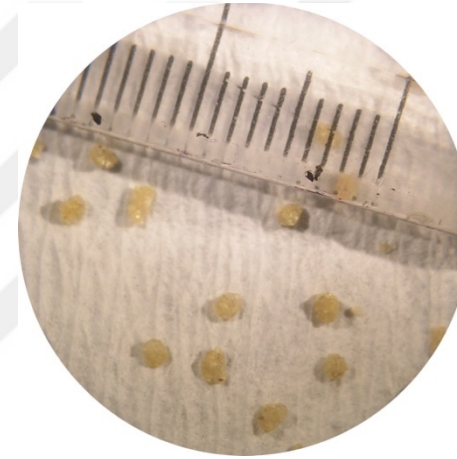
(g):F36



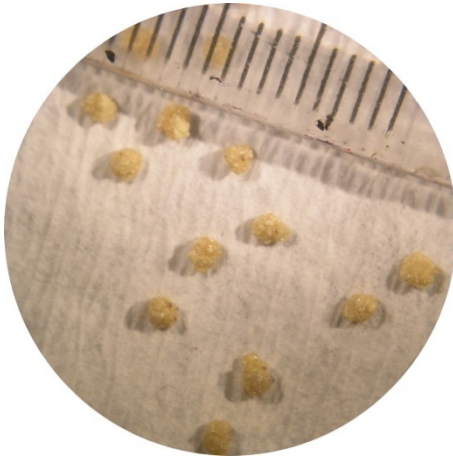
(h):F37



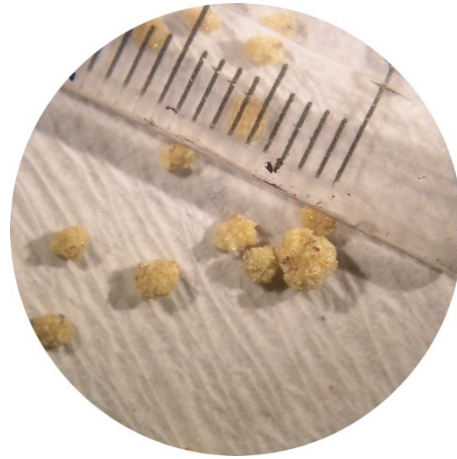
(i):F38



(i):F39



(j):F40



(k):F41

Şekil 4-31: Boncuk formüllerine ait farklı formülasyonlara ait fotoğraflar

(a):F30, (b):F31, (c):F32, (d):F33, (e):F34, (f):F35, (g):F36, (h):F37, (i):F38, (i):F39, (j):F40, (k):F41

4.4.1. Çap Ölçümü

Hazırlanan formüllerde küresel şekil alabilen formüller F36, F37, F39, F40, F41 oldu. Küreselleşme için kritik sınır %1,5 sodyum aljinat oldu. Sodyum aljinatın artan oranlarında etken maddenin artırılmasıyla yine elde edilen partikül boyutlarında artış Tablo 4-27’de gösterildi.

Tablo 4-27: Çalışılan formülasyonlar ve küresel formüllerin partikül boyutları

Formülasyon Kodu	Elde edilen boncuk çapları
F36	1-2 mm
F37	2-3 mm
F39	1 mm
F40	1-1,5 mm
F41	1-3 mm

4.5. Formülasyona Karar Verilmesine ait Bulgular

Formülasyona karar verilmesi için uygulama kolaylığı, birim doz doğruluğu, stabilite, depolama, birim maliyet kriterleri göz önüne alınarak puanlama Bölüm 3.2.2'deki kriterlere göre yapıldı. Puanlama sonucunda en yüksek (+) değer alan formülasyon tercih edildi (Tablo 4-28).

Tablo 4-28 : Hazırlanacak formülasyonlara ait avantaj, dezavantaj tablosu

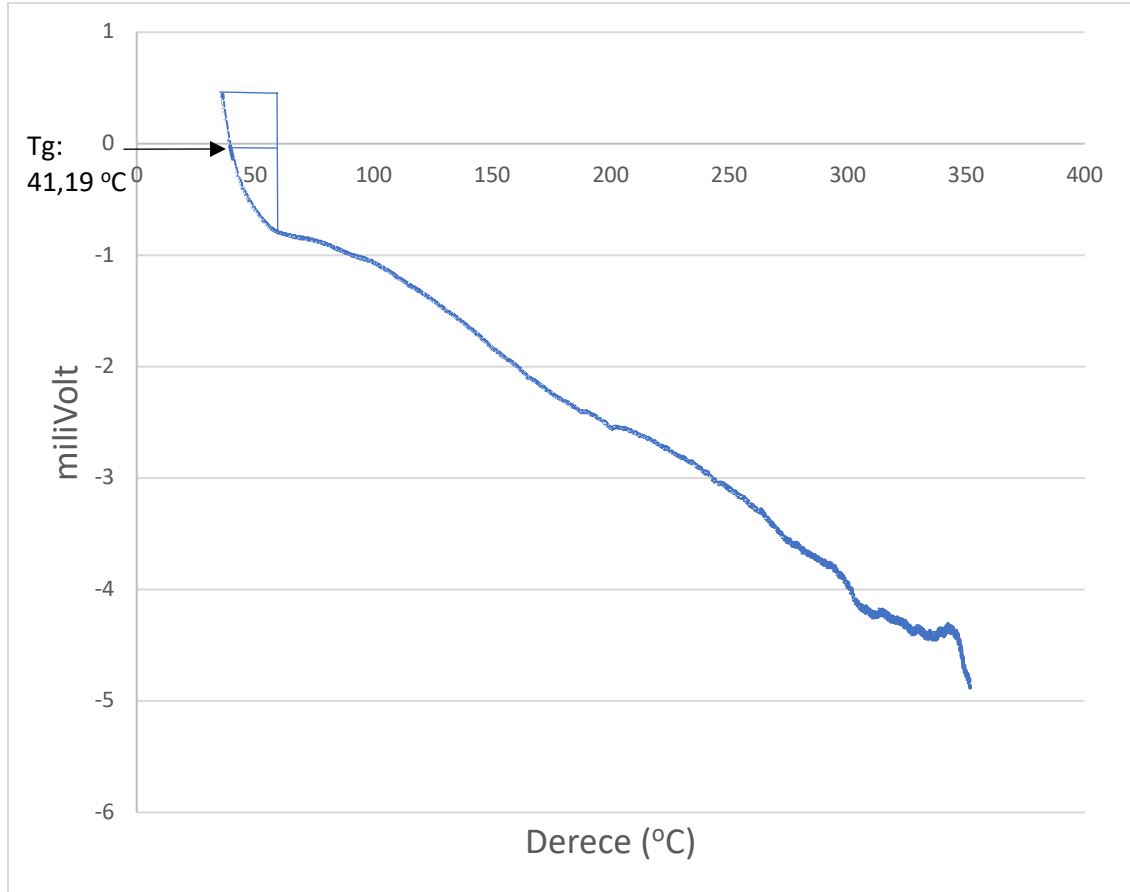
Formülasyon Çeşitleri	Uygulama Kolaylığı	Birim Dozun Oral Yoldan Verilme Kesinliği	Stabilite	Depolama	Birim Maliyet	Toplam
Süspansiyon	+	+++	+	+	++	8 (+)
Pelet	+++	+	++	+++	++	10 (+)
Rekonstitüe Süspansiyon	+	+++	++	+++	++	11 (+)
Sodyum Aljinat Boncukları	+++	+	++	+++	+	10(+)
İyi (+++) Orta (++) Kötü (+)						

4.6. Karar Verilen F11 Formülasyonunda Yapılan Kontroller

İn-vivo hayvan deneylerinde kullanılması kararlaştırılan F11 formülasyonuna ait yapılan kontroller aşağıdaki gibidir. Tüm kontroller ambalajlanmış F11 formülasyon numuneleri ile gerçekleştirildi.

4.6.1. F11 Formülasyonunun DSC Analizine ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.1.3'te belirtildiği şekilde incelenen F11 formülasyonuna ait DSC analizine ait grafik ve bulunan Tg sıcaklığı Şekil 4-32'de gösterildi.



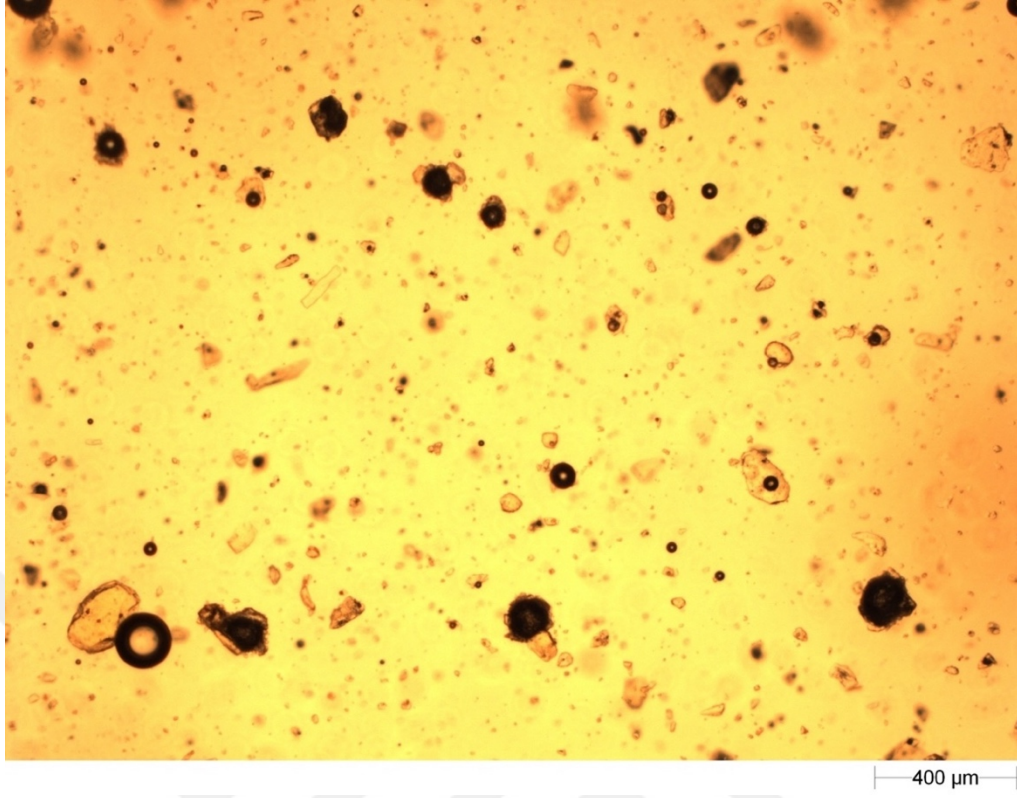
Şekil 4-32: F11 formülasyonunun DSC analizi

4.6.2. Partikül Şekli, Partikül Büyüklüğü Ve Dağılımına AİT Bulgular

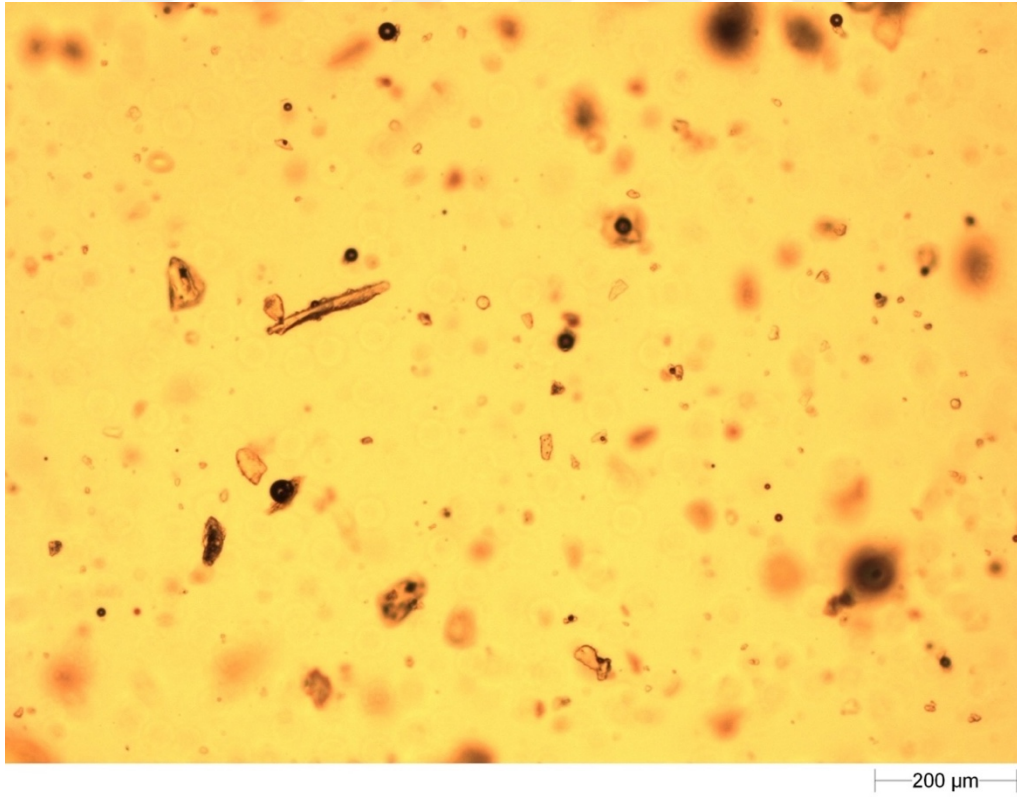
F11 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı, partikül şekillerine bakıldı. Aşağıda F11 formülasyonuna ait bulgular yer almaktadır.

4.6.2.1. Optik Mikroskop ile Partikül Şekillerinin İncelenmesi

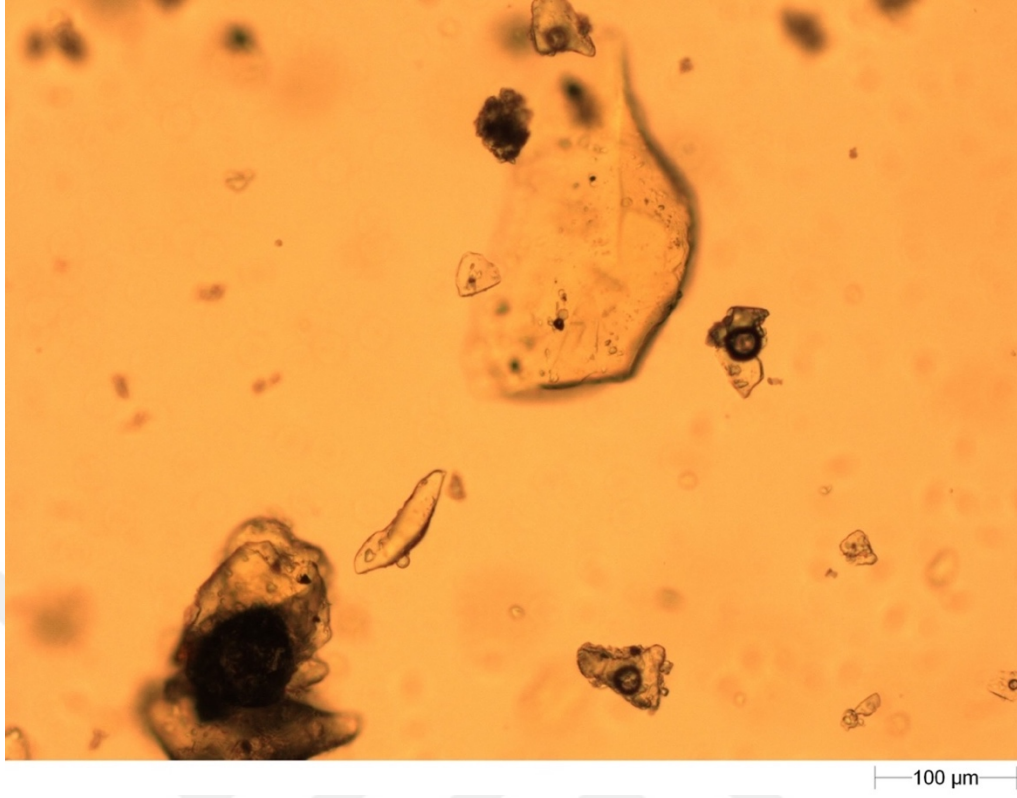
Partikül şekilleri incelendiğinde çekiçli değirmen ile kırılan drog materyalinin küresel olmasa da küresele yakın parçacıklar oluşturduğu görüldü. Farklı yakınlıklarda çekilen F11 formülasyonuna ait optik mikroskop ile çekilen fotoğraflar Şekil 4-33, Şekil 4-34, Şekil 4-35, Şekil 4-36'da gösterildi.



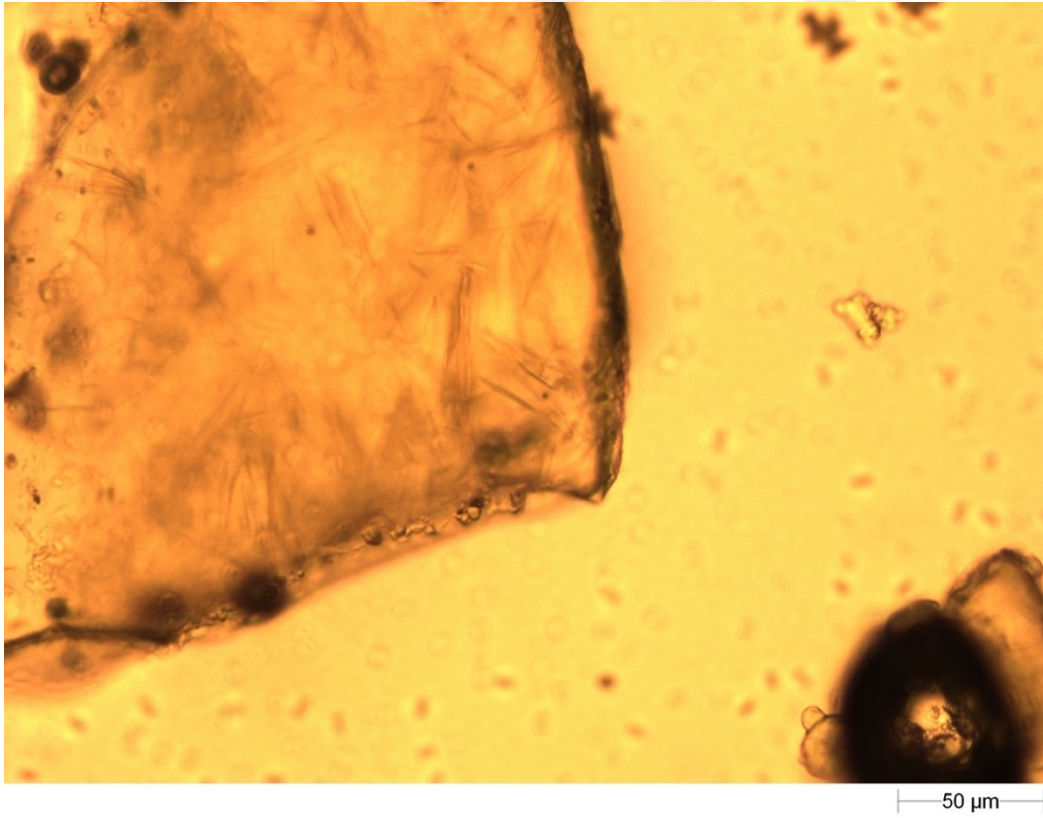
Şekil 4-33: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (400 µm)



Şekil 4-34: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (200 µm)



Şekil 4-35: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (100 µm)



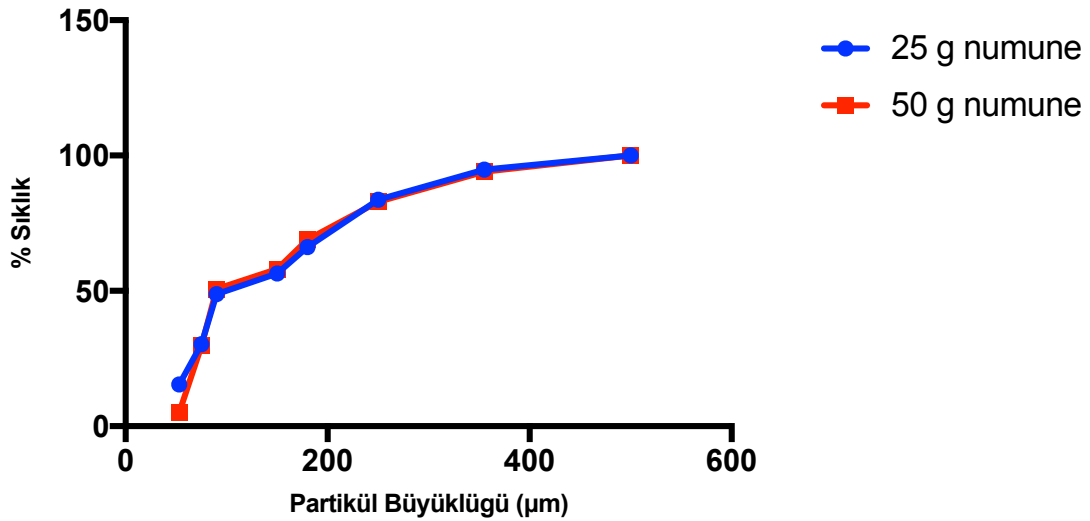
Şekil 4-36: F11 formülasyonuna ait toz numunesinin görüntüsü (50 µm)

4.6.2.2. Elek Analizi ile Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının bulunması

Son Nokta Tespiti ve Test Örnek Miktarının Belirlenmesi

25 ve 50 g formülasyon numunesinden alınarak farklı gram ağırlıklarında son nokta tespit edilmeye çalışıldı. Bölüm 3.2.1.1.2’te anlatıldığı gibi her 5 dakikada bir elek sallama cihazı durdurularak eleklerin ağırlıkları ölçüldü ve eleklerin bir önceki ağırlıkları ile aralarındaki fark tüm elekler için %5’i geçmeyecek duruma geldiğinde test bitirildi. Farklı ağırlıktaki test numuneleri için farklı son dakikalar bulundu.

Son nokta tayini sırasında elek üstlerinde kalan yüzde miktarlar karşılaştırılarak elekler için uygun olan numune miktarı 25 g olarak seçildi. Numune miktarının seçilmesinde 50 g numunenin 75 µm’lik elekte biriken madde oranının (Şekil 4-39) 25 g numuneye göre (Şekil 4-38) fazla olması sonucu 50 g numunenin 75 µm elek için fazla geldiği düşünüldü.



Şekil 4-37: F11 numunelerine ait son nokta tespitinde yüzde kümülatif partikül büyüklüğü dağılımı

25 ve 50 g F11 formülasyonu numunesi ile yapılan son nokta tespitine ait kümülatif yüzde sıklık ve partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 4-37’de gösterildi.

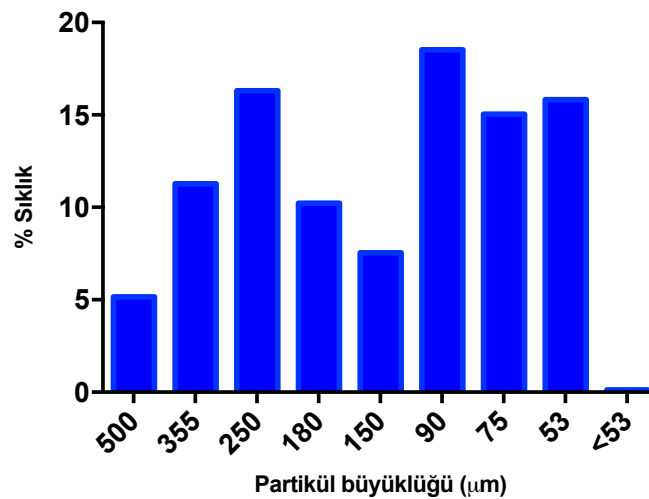
25 g toz F11 formülasyonu için yapılan son nokta tespiti testine ait % miktar, % kümülatif miktarlar Tablo 4-29’da gösterildi. Hesaplanan toz partikül büyüklüklerinin 25 g toz numunesi için yüzde sıklıkları Şekil 4-38’de gösterildi.

50 g F11 formülasyonu için yapılan son nokta tespiti testine ait % miktar, % kümülatif miktarlar Tablo 4-30’da gösterilmiştir. Hesaplanan toz partikül büyüklüklerinin 50 g toz numunesi için yüzde sıklıkları Şekil 4-39’da gösterildi.

25 g F11 formülasyonu için son nokta 30 dakika iken, 50 g toz numunesi için son nokta 35 dakika olarak bulundu.

Tablo 4-29: 25 g F11 formülasyon numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi

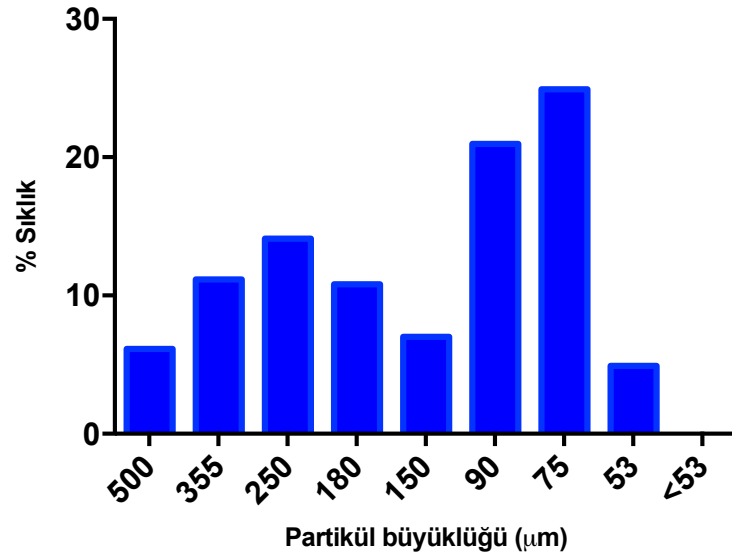
Mesh no	Elek boyutu (μm)	% Miktar	% Miktar Kümülatif
35	500	5,15	100,00
45	355	11,27	94,85
60	250	16,30	83,57
80	180	10,22	67,27
100	150	7,54	57,05
170	90	18,53	49,51
200	75	15,04	30,98
270	53	15,82	15,94
	>53	0,12	0,12

**Şekil 4-38: 25 g F11 formülasyonuna ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları****Tablo 4-30 : 50 g F11 formülasyon numunesi için son nokta tayininde bulunan elek analizi**

Mesh no	Elek boyutu (μm)	% Miktar	% Miktar Kümülatif
35	500	6,13	100,00
45	355	11,17	93,87
60	250	14,10	82,70
80	180	10,81	68,60
100	150	7,01	57,79
170	90	20,96	50,77
200	75	24,91	29,82

270	53	4,90	4,90
	>53	0,00	0,00

Tablo 4-30’da belirtilen 50 g toz formülasyon numunesi için son nokta değerlerine 7 adet 5 dakikalık elek sallama ile (35 dakika) ulaşıldı.



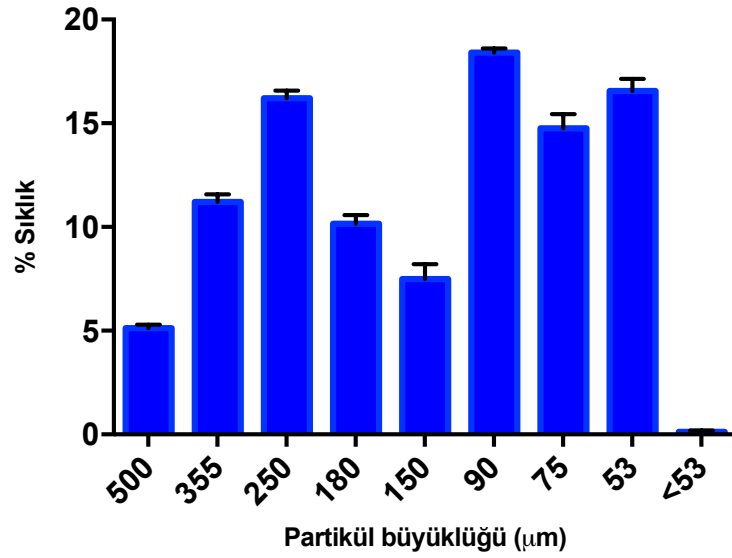
Şekil 4-39 : 50 g F11 formülasyonuna ait son nokta tayininde bulunan partikül büyüklüğü yüzde miktarları

Elek Analizi

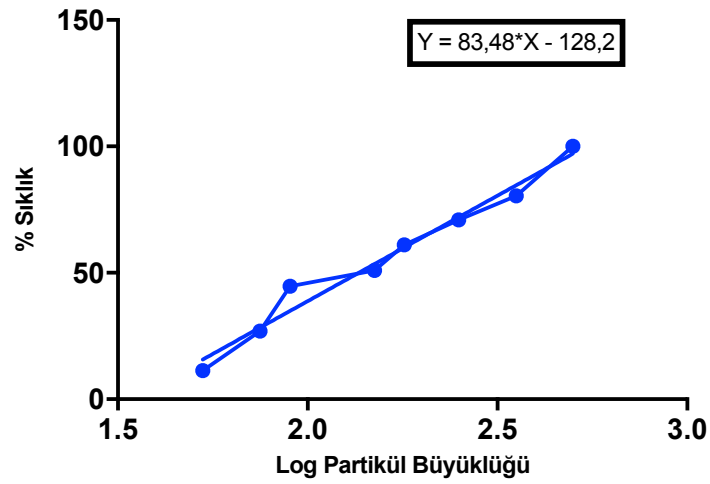
Son noktası ve numune miktarı tespit edilen F11 formülasyonu için elek analizi 3 seri numune ile yapıldı. F11 formülasyonuna ait % miktarlar Tablo 4-31’de, partikül büyüklüğüne göre % Sıklık miktarları Şekil 4-40’da, F11 formülasyonunun yarı logaritmik kümülatif % sıklık değerleri ile partikül büyüklüğüne ait denklem Şekil 4-41’de gösterildi.

Tablo 4-31: F11 formülasyonuna ait elek analizi sonuçları

Elek boyutu (µm)	Mesh numarası	30 dk	% miktar	SD	% kümülatif
500	35	1,27	19,57	19,57	19,57
355	45	2,78	9,49	0,10	29,06
250	60	4,02	9,90	0,53	38,97
180	80	2,52	10,05	0,45	49,02
150	100	1,86	6,29	0,70	55,30
90	170	4,57	17,81	1,07	73,12
75	200	3,66	15,52	0,99	88,64
53	230	4,11	10,90	2,17	99,54
toplama kabı	270	0,03	0,47	0,81	100,00
Total Miktar		24,82			



Şekil 4-40 : F11 Formülasyon numunelerine ait elek analizi sonucu



Şekil 4-41 :F11 Formülasyonuna ait Yüzde Kümülatif Partikül Büyüklüğü Dağılımı (Yarı Logaritmik)

Şekil 4-41’de belirtilen denkleme göre F11 formülasyonunun d_{10} , d_{50} , d_{90} değerleri aşağıda gösterildi.

F11 formülasyonu için değerler;

$$d_{10} = 45,236 \mu\text{m}$$

$$d_{50} = 136,346 \mu\text{m}$$

$$d_{90} = 410,96 \mu\text{m}$$

4.6.3. Hausner Oranı ve % Sıkışabilirliğe ait Bulgular

F11 formülasyonuna ait küme, sıkışmış dansite, hausner oranı ve % Sıkışabilirlik değerleri Tablo 4-32’de gösterildi.

Tablo 4-32: F11 formülasyonu numunesine ait küme, sıkışmış dansite, housner oranı ve % Sıkışabilirlik değerleri

Numune ağırlıkları: 100 g	N ₁	N ₂	N ₃
V ₀	150 ml	152 ml	150 ml
V ₁₀	142 ml	142 ml	140 ml
V ₅₀₀	120 ml	122 ml	120 ml
V ₁₂₅₀	118 ml	120 ml	118 ml
ρ _{küme}	0,667 g/ml	0,658 g/ml	0,667 g/ml
ρ _{küme ort}	0,664 g/ml ± 0,004		
ρ _{sıkışmış}	0,848 g/ml	0,833 g/ml	0,848 g/ml
ρ _{sıkışmış ort}	0,843 g/ml ± 0,007		
Housner Oranı	1,271	1,266	1,271
Housner Oranı Ort ± SD	1,269 ± 0,002		
%Sıkışabilirlik	21,344	21,008	21,344
%Sıkışabilirlik Ort ± SD	21,232 ± 0,158		

Housner oranına göre F11 formülasyonu 1,269 ± 0,002 zayıf akış karakteri gösterdi.

% Sıkışabilirlik değerlerine göre F11 formülasyonu 21,232 ± 0,158 Zayıf akış karakteri gösterdi.

4.6.4. Yığın Açısı Ve Akma Süresi

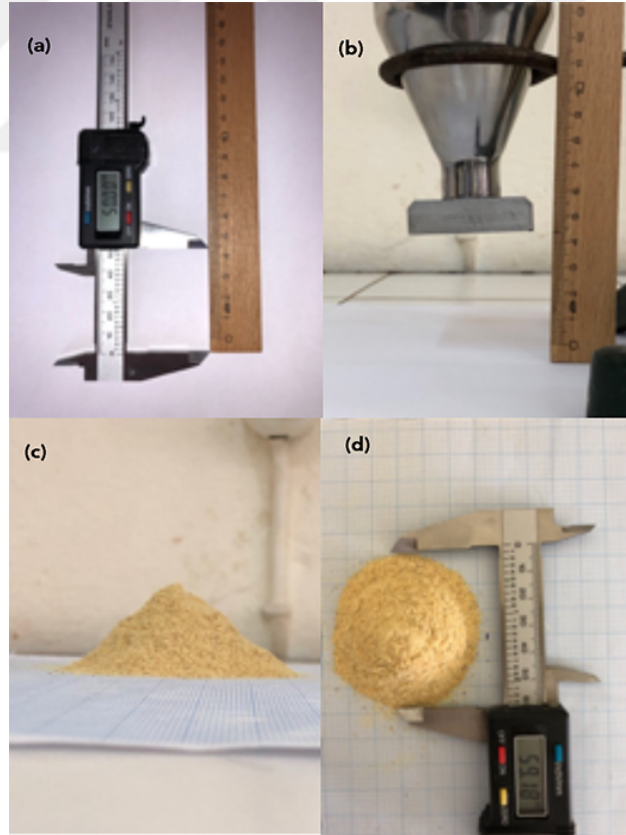
Tek başına formülasyonda kullanılan ve akış özellikleri kötü olduğu bilinen madde ile rekonstitüe süspansiyon oluşturmak için yapılan toz formülasyonu akış özelliklerinin tespiti için kapatılmış rekonstitüe formülasyonlardan 3 farklı örnek olacak şekilde bakılmıştır. F11 formülasyonuna ait yığın açısı Tablo 4-33’de gösterildi.

Tablo 4-33 : F11 numunesine ait yığın açıları

Numune ağırlık: 42,7 g	N1	N2	N3
Çap	59,18 mm	54,17 mm	56,51 mm
Yükseklik	18,80 mm	24,11 mm	21,80 mm
Açı (α)	32,430	41,67	37,652
Açı (α) ort ± SD	37,251 ± 3,783		

Kohezif bir toz kütlesi ile çalışıldığı için serbest akış göstermedi. Tekrarlanan delikten akış için denemelerde birbirine yakın sonuçlar elde edilemedi. Bu tarzda kohezif tozlar için Avrupa Farmakopesi 7.0 da Hausner oranını önermektedir.

F11 formülasyonu için $37,251 \pm 3,783$ değeri toz akışı Tablo 2-8'e göre "Fena Değil" çıktı. Yığın açısı tayininde yapılan işlemlere ait bir kesit Şekil 4-42'de gösterildi.



Şekil 4-42: F11 formülasyonunda yığın açısı tayini

(a):Cetvelde 5 cm tespiti, (b):Paslanmaz Çelik Huninin 5 cm yüksekliğine ayarlanması, (c):Tozun Akma testi sonrası görüntüsü, (d): Örnek 1'e ait Çap ölçümü

4.6.5. Ambalajlanmış F11 formülasyonunun Ağırlık Sapması Testi

20 adet ısıyla kapatılmış Doypack paket içerisindeki F11 formülasyonuna ait ağırlık sapması testi sonuçları Tablo 4-34’de gösterildi.

Tablo 4-34: F11 formülasyonu için ağırlık sapması testine ait bulgular

F11 formülasyonu içerik ağırlıkları			
1) 43,4819 g	2) 43,4031 g	3) 43,3790 g	4) 43,1921 g
5) 43,3733 g	6) 43,4872 g	7) 43,4555 g	8) 43,4251 g
9) 43,3671 g	10) 43,4213 g	11) 43,2990 g	12) 43,4513 g
13) 43,4265 g	14) 43,2077 g	15) 43,5305 g	16) 43,4110 g
17) 43,1606 g	18) 43,3533 g	19) 43,1872 g	20) 43,5538 g
Ortalama ağırlık	Standart Sapma	Yüzde sapma değeri %7,5’u aşan	Yüzde sapma değeri %15’i aşan
43,3783 g	0,1149 g	0	0
Test Sonucu		Preparatlar testi geçmiştir.	

4.6.6. Ambalajlanmış F11 Formülasyonu İçin İçerik Homojenitesi Testi

Bölüm 3.2.3.5’te belirtilen içerik homojenitesi testi hazırlanan ve doypack torbalar ile paketlenen F11 formülasyonuna uygulandı. F11 formülasyonunun içerik homojenitesi testine ait bulgular Tablo 4-35’te gösterildi.

Tablo 4-35: İçerik homojenitesi testine ait bulgular

	Preparat Ağırlığı	Filtre edilen miktar (g)
1)	43,4819	12,767
2)	43,4031	13,011
3)	43,379	12,913
4)	43,1921	12,897
5)	43,3733	12,867

Organik solvanda çözünmeyen madde miktarı ortalama $\pm$ SD: $12,891 \pm 0,079$ g olarak bulundu.

4.6.7. F11 Formülasyonunun Stabilité Testlerine ait Bulgular

F11 formülasyonuna ait stabilité testleri ICH klavuzuna göre hızlandırılmış stabilité test koşullarına göre yapıldı. Başlangıç, birinci, üçüncü ve altıncı aylara ait 3 numunenin incelendiği testlerde madde miktarlarının kendi arasındaki yüzdeleri ve kromotogramları bulgulara verildi.

4.6.7.1. F11 Formülasyonunun Kolofan kısmının GC-MS analizi

Ağız kısmı ısı ile kapatılmış doypack torbalarda muhafaza edilen her numune alma zamanı için 3 adet örnekten yapılan analizlerde kolofan içerisindeki madde oranları Tablo 4-36, 4-37, 4-38, 4-39’da gösterildi.

Tablo 4-36: F11 formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan’ın başlangıç yüzde miktarları

Başlangıç					
Madde	Yüzde Miktarı			Ortalama	SD
İzopimarik Asit	17,012	17,215	17,028	17,085	0,113
Palustrik Asit	10,896	10,596	11,235	10,909	0,320
Dehidroabietik Asit	48,612	47,623	48,925	48,387	0,680
Abietik Asit	23,481	24,566	22,812	23,620	0,885

Tablo 4-37 : F11 Formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan’ın 1.Ay yüzde miktarları

1.Ay					
Bileşik	Yüzde Miktarı			Ortalama	SD
İzopimarik Asit	17,451	17,625	17,892	17,656	0,222
Palustrik Asit	10,518	10,235	10,487	10,413	0,155
Dehidroabietik Asit	49,604	48,345	48,952	48,967	0,630
Abietik Asit	22,426	23,795	22,669	22,963	0,730

Tablo 4-38: F11 Formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan'ın 3.Ay yüzde miktarları

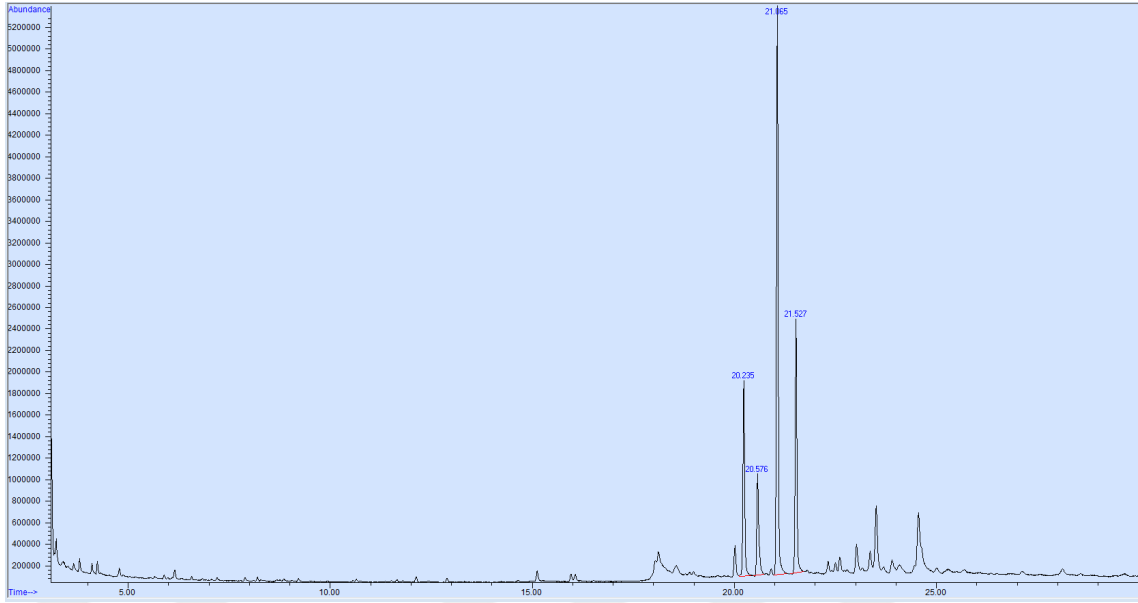
3.Ay					
Bileşik	Yüzde Miktarı			Ortalama	SD
İzopimarik Asit	18,49	18,257	17,962	18,236	0,265
Palustrik Asit	9,637	10,021	9,845	9,834	0,192
Dehidroabietik Asit	51,305	51,687	51,482	51,491	0,191
Abietik Asit	20,567	20,035	20,711	20,438	0,356

Tablo 4-39: : F11 Formülasyonundan alınan numunedeki Kolofan'ın 6.Ay yüzde miktarları

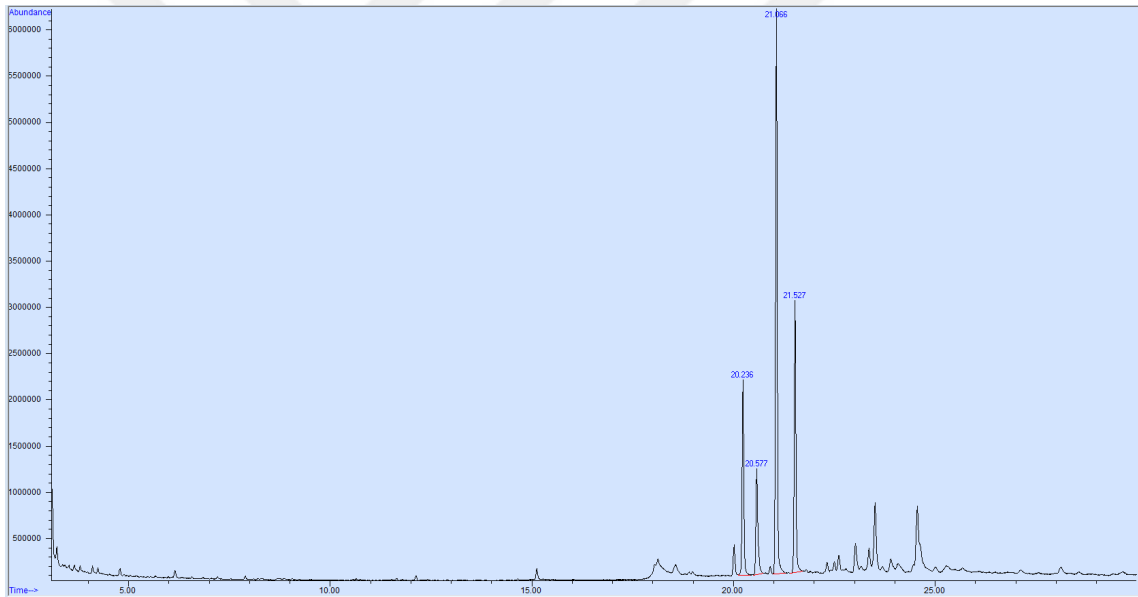
6.Ay					
Bileşik	Yüzde Miktarı			Ortalama	SD
İzopimarik Asit	16,925	17,035	17,176	17,045	0,126
Palustrik Asit	10,087	10,095	10,112	10,098	0,013
Dehidroabietik Asit	50,594	50,127	51,096	50,606	0,485
Abietik Asit	22,394	22,743	21,616	22,251	0,577

4.6.7.2. F11 Formülasyonunun Kolofan Kısımının Kromatogramları

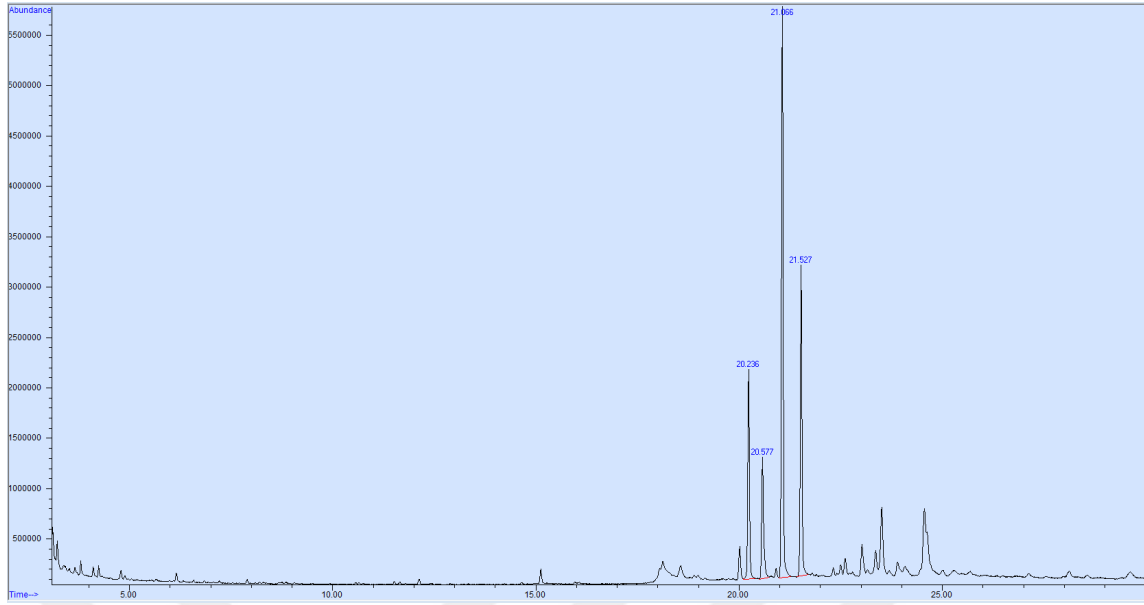
F11 formülasyonunda bulunan kolofana ait başlangıç, birinci ay, üçüncü ay, altıncı ay kromatogramları sırasıyla Şekil 4-43, Şekil 4-44, Şekil 4-45, Şekil 4-46'da gösterildi.



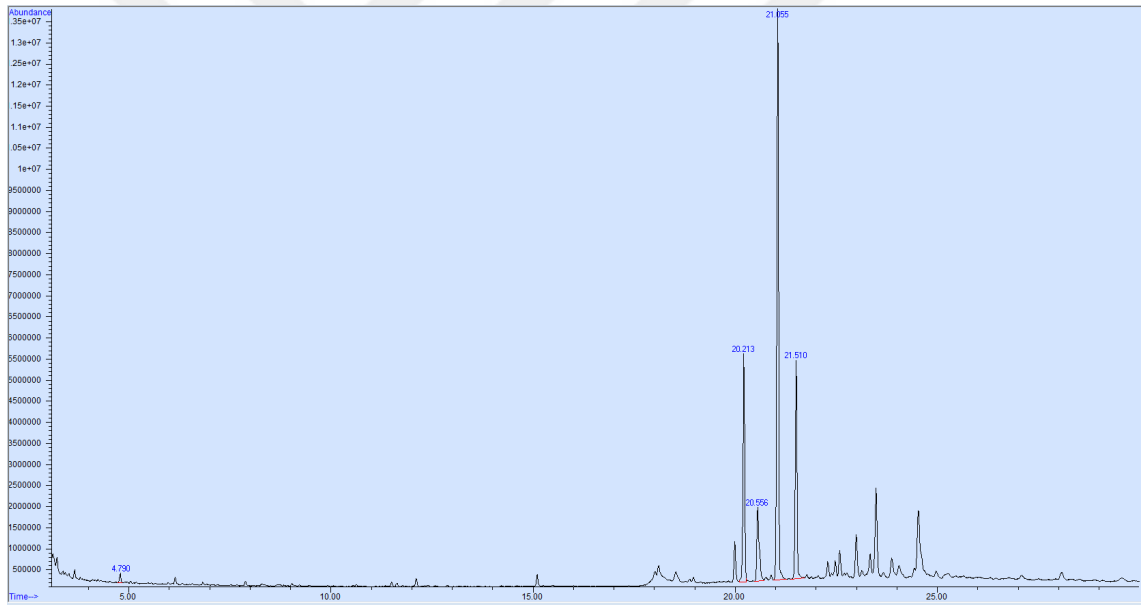
Şekil 4-43: F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının stabilite başlangıç kromatografisi



Şekil 4-44 : F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının 1'nci Ay Kromatografisi



Şekil 4-45 : F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının 3'ncü Ay Kromatografisi



Şekil 4-46 : F11 formülasyonuna ait kolofan kısmının 6'ncı Ay Kromatografisi

4.6.7.3. Formülasyona ait Terebentin Kısımının GC-MS Analizi

Ağız kısmı ısı ile kapatılmış doypack torbalarda muhafaza edilen her numune alma zamanı için 3 adet örnekten yapılan analizlerde terebentin içerisindeki madde oranları Tablo 4-40, 4-41, 4-42, 4-43'te gösterildi.

Tablo 4-40: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in başlangıç yüzde miktarları

Başlangıç					
Bileşik	Yüzde Miktarları			Ortalama	SD
Alpha Pinene	45,681	45,673	45,665	45,673	0,008
Fenchene	0,658	0,714	0,770	0,714	0,056
Camphene	0,397	0,386	0,375	0,386	0,011
Beta Pinene	10,908	11,027	11,146	11,027	0,119
Dehydrosabinene	0,890	0,962	1,034	0,962	0,072
3-Carene	6,590	6,631	6,672	6,631	0,041
p-Cymene	1,299	1,324	1,349	1,324	0,025
D-Limonene	3,366	3,254	3,142	3,254	0,112
m-Cymene	2,317	2,287	2,257	2,287	0,03
Alpha pinene epoxide	0,745	0,798	0,851	0,798	0,053
Cymenene	0,922	0,943	0,964	0,943	0,021
Alpha Longipinene	0,745	0,756	0,767	0,756	0,011
Longicyclene	0,499	0,521	0,543	0,521	0,022
Longifolene	8,884	8,796	8,708	8,796	0,088
Fenchyl Alcohol	1,326	1,412	1,498	1,412	0,086
Myrtenal	1,062	1,002	0,942	1,002	0,06
Pinocarveol	2,257	2,315	2,373	2,315	0,058
Alpha Terpeneol	1,773	1,814	1,855	1,814	0,041
Borneol	1,104	1,211	1,318	1,211	0,107
Verbenone	1,116	1,096	1,076	1,096	0,02
Myrtenol	0,878	0,847	0,816	0,847	0,031
p-Cymene-8-ol	0,888	0,756	0,624	0,756	0,132
Caryophyllene Oxide	1,263	1,112	0,961	1,112	0,151
Caryophyllene	0,622	0,658	0,694	0,658	0,036

Tablo 4-41: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in 1. Ay yüzde miktarları

1.Ay					
Bileşik	Yüzde Miktarları			Ortalama	SD
Alpha Pinene	45,713	45,761	45,699	45,724	0,033
Fenchene	0,598	0,426	0,633	0,552	0,111
Camphene	0,427	0,479	0,413	0,440	0,035
Beta Pinene	11,125	11,104	11,062	11,097	0,032
Dehydrosabinene	0,852	0,67	0,882	0,801	0,115
3-Carene	6,354	6,036	6,457	6,282	0,219
p-Cymene	1,384	1,419	1,355	1,386	0,032
D-Limonene	3,468	3,794	3,505	3,589	0,178
m-Cymene	2,387	2,517	2,353	2,419	0,087
Alpha pinene epoxide	0,699	0,547	0,728	0,658	0,097
Cymenene	0,954	0,944	0,945	0,948	0,006
Alpha Longipinene	0,821	0,875	0,793	0,830	0,042
Longicyclene	0,527	0,511	0,52	0,519	0,008
Longifolene	8,795	8,882	8,813	8,830	0,046
Fenchyl Alcohol	1,562	1,626	1,485	1,558	0,071
Myrtenal	1,086	1,23	1,064	1,127	0,090
Pinocarveol	2,133	1,893	2,194	2,073	0,159
Alpha Terpineol	1,762	1,669	1,775	1,735	0,058
Borneol	1,204	1,09	1,185	1,160	0,061
Verbenone	1,089	1,102	1,096	1,096	0,007
Myrtenol	1,022	1,228	0,958	1,069	0,141
p-Cymene-8-ol	1,056	1,488	0,962	1,169	0,281
Caryophyllene Oxide	1,324	1,687	1,269	1,427	0,227
Caryophyllene	0,897	0,842	0,743	0,827	0,078

Tablo 4-42: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in 3. Ay yüzde miktarları

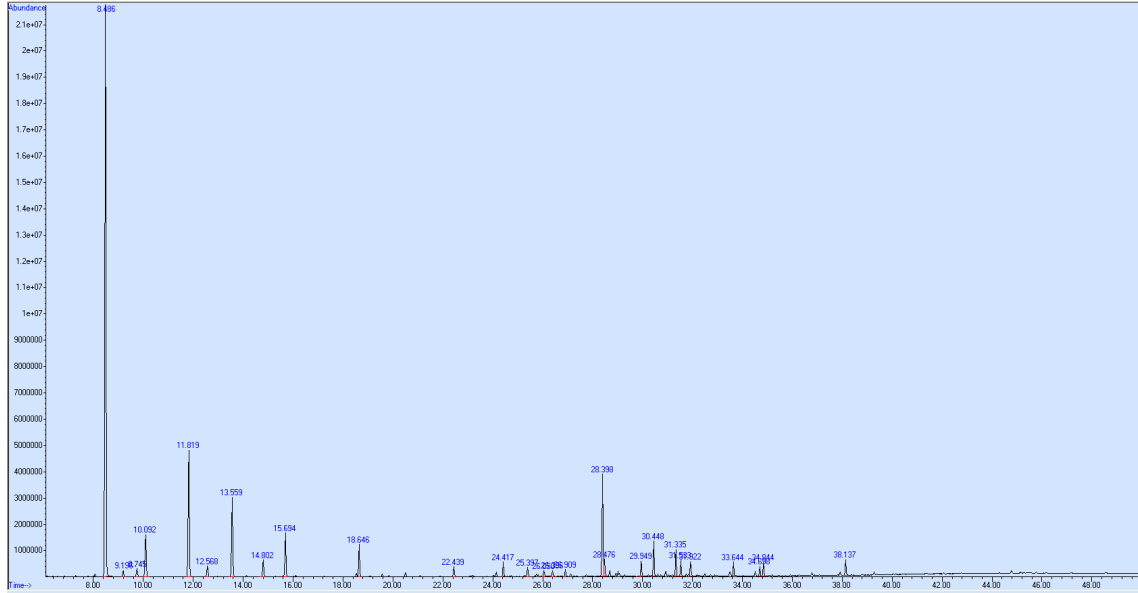
3.Ay					
Bileşik	Yüzde Miktarları			Ortalama	SD
Alpha Pinene	45,745	45,809	45,857	45,804	0,056
Fenchene	0,538	0,254	0,082	0,291	0,230
Camphene	0,457	0,531	0,583	0,524	0,063
Beta Pinene	11,042	11,083	11,062	11,062	0,021
Dehydrosabinene	0,874	0,888	0,306	0,689	0,332
3-Carene	6,218	6,318	5,4	5,979	0,504
p-Cymene	1,409	1,314	1,489	1,404	0,088
D-Limonene	3,57	3,52	4,446	3,845	0,521
m-Cymene	2,457	2,447	2,777	2,560	0,188
Alpha pinene epoxide	0,653	0,695	0,243	0,530	0,250
Cymenene	0,956	0,934	0,924	0,938	0,016
Alpha Longipinene	0,837	0,829	0,983	0,883	0,087
Longicyclene	0,555	0,517	0,479	0,517	0,038
Longifolene	8,706	8,669	9,056	8,810	0,214
Fenchyl Alcohol	1,698	1,69	1,654	1,681	0,023
Myrtenal	1,11	1,374	1,218	1,234	0,133
Pinocarveol	2,009	2,053	2,013	2,025	0,024
Alpha Terpeneol	1,751	1,576	1,683	1,670	0,088
Borneol	1,304	1,154	1,262	1,240	0,077
Verbenone	1,062	1,115	1,128	1,102	0,035
Myrtenol	1,166	1,334	1,24	1,247	0,084
p-Cymene-8-ol	1,224	1,22	1,352	1,265	0,075
Caryophyllene Oxide	1,385	1,347	1,389	1,374	0,023
Caryophyllene	1,172	0,787	0,732	0,897	0,240

Tablo 4-43: F11 formülasyonundan alınan numunedeki terebentin'in 6. Ay yüzde miktarları

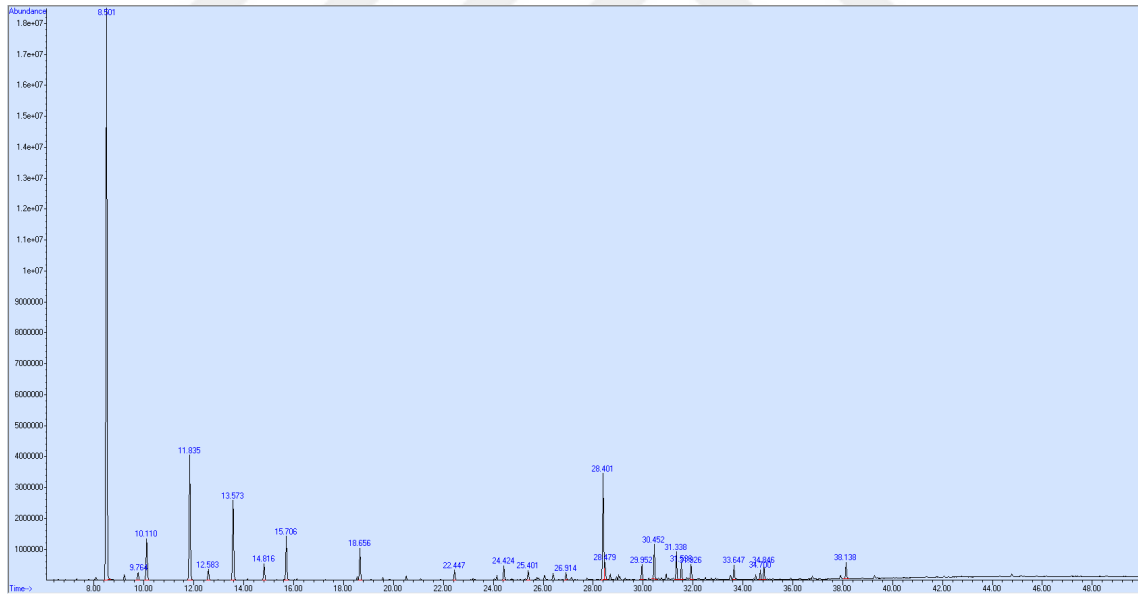
6.Ay					
Bileşik	Yüzde Miktarları			Ortalama	SD
Alpha Pinene	45,774	45,777	45,759	45,770	0,010
Fenchene	0,387	0,379	0,459	0,408	0,044
Camphene	0,493	0,495	0,474	0,487	0,012
Beta Pinene	11,131	11,136	11,209	11,159	0,044
Dehydrosabinene	0,632	0,624	0,717	0,658	0,052
3-Carene	5,946	5,928	6,041	5,972	0,061
p-Cymene	1,437	1,441	1,445	1,441	0,004
D-Limonene	3,867	3,882	3,726	3,825	0,086
m-Cymene	2,55	2,557	2,503	2,537	0,029
Alpha pinene epoxide	0,513	0,506	0,58	0,533	0,041
Cymenene	0,947	0,947	0,962	0,952	0,009
Alpha Longipinene	0,895	0,899	0,89	0,895	0,005
Longicyclene	0,512	0,512	0,529	0,518	0,010
Longifolene	8,885	8,886	8,812	8,861	0,042
Fenchyl Alcohol	1,671	1,679	1,71	1,687	0,021
Myrtenal	1,259	1,265	1,19	1,238	0,042
Pinocarveol	1,832	1,82	1,921	1,858	0,055
Alpha Terpeneol	1,651	1,647	1,697	1,665	0,028
Borneol	1,083	1,082	1,175	1,113	0,053
Verbenone	1,101	1,1	1,085	1,095	0,009
Myrtenol	1,285	1,297	1,221	1,268	0,041
p-Cymene-8-ol	1,589	1,61	1,412	1,537	0,109
Caryophyllene Oxide	1,761	1,776	1,587	1,708	0,105
Caryophyllene	0,855	0,858	0,946	0,886	0,052

4.6.7.4. F11 Formülasyonunun Terebentin Kısımının Kromatogramları

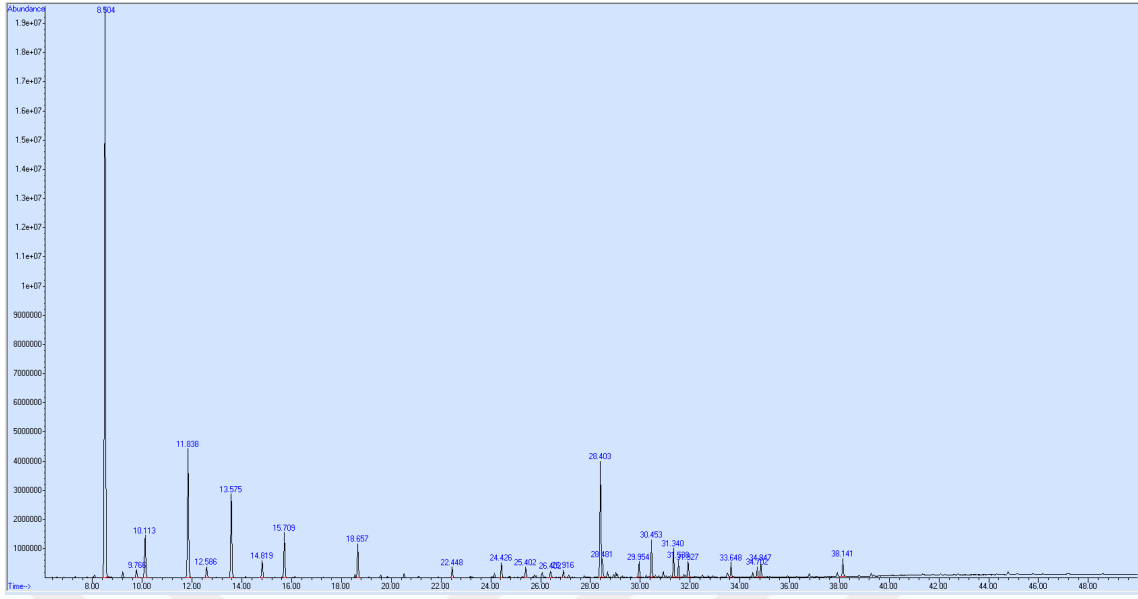
F11 formülasyonunda bulunan terebentine ait başlangıç, birinci ay, üçüncü ay, altıncı ay kromatogramları sırasıyla Şekil 4-47, Şekil 4-48, Şekil 4-49, Şekil 4-50'de gösterildi.



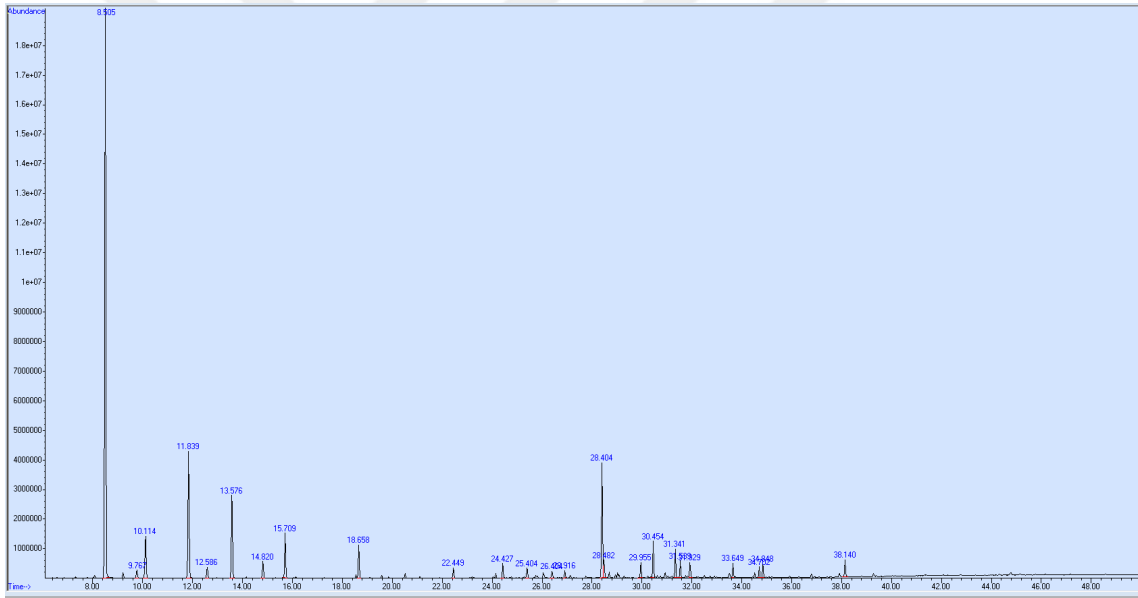
Şekil 4-47: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının stabilite başlangıç kromatografisi



Şekil 4-48: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının 1. Ay Kromatografisi



Şekil 4-49: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının 3. Ay Kromatografisi



Şekil 4-50: F11 formülasyonuna ait terebentin kısmının 6. Ay Kromatografisi

4.7. F11 Formülasyonunun İn-Vivo Çalışmalarına ait Bulgular

15 adet deneme ve 15 adet kontrol grubunda bulunan sağmal sığır ile yürütülen çalışmada deney grubunda bir hayvan içirme işlemlerinde yaşattığı zorluklar sebebiyle, bir hayvan da deneme ile ilgisi olmayan hastalık oluşması sebebiyle deney grubundan çıkarıldı.

Deneme sırasında 33 gün boyunca deney grubuna içirme işlemi yapıldı. Ancak deneme bitirildikten sonra da deney ve kontrol grubundaki değişiklikleri gözlemlemek amacıyla deney bitirildikten sonra 9. ve 10. haftalarda süt numuneleri alınarak deneye dahil edilen deney ve kontrol gruplarının süt verileri incelendi.

Tüm tablo ve şekillerde gösterilen 1. hafta değerleri deneme başlamadan önceki haftanın verilerini göstermektedir. 2. hafta ile 7. hafta değerleri denemenin devam ettiği günleri göstermektedir. 8., 9. ve 10. haftalar ise deneme bitirildikten sonraki haftaları göstermektedir.

Tablolarda gösterilen (Tablo 4-44, 4-45, 4-46, 4-47) veriler Mann Whitney U testine göre incelenen haftalık belirtilen verilerin haftalık karşılaştırmalarını göstermektedir.

SHS'lerinin karşılaştırılmasına ait veriler Tablo 4-44'te, SHS'ların haftalık deney ve kontrol gruplarındaki seyri Şekil 4-51'de, Logaritmik SHS'ların haftalık deney ve kontrol gruplarında seyri Şekil 4-52'de gösterildi.

Süt yağına ait haftalık istatistiksel karşılaştırma verileri Tablo 4-45'te, yüzde süt yağının deney ve kontrol grubunda haftalık seyri Şekil 4-53'te gösterildi.

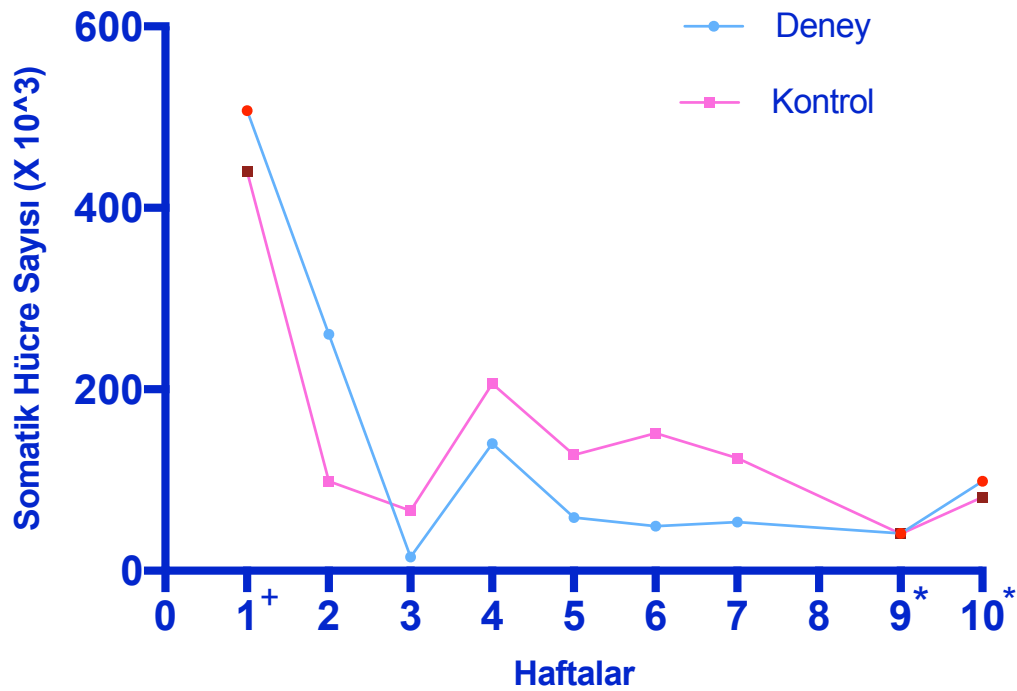
Süt proteinine ait haftalık istatistiksel karşılaştırma verileri Tablo 4-46'te, yüzde süt proteininin deney ve kontrol grubunda haftalık seyri Şekil 4-54'te gösterildi.

Süt miktarının (L) ait haftalık istatistiksel karşılaştırma verileri Tablo 4-47'te, süt miktarının (L) deney ve kontrol grubunda haftalık seyri Şekil 4-55'te gösterildi.

Süt miktarı, SHS, süt yağı, süt proteini değerlerinde deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşmadı ($p>0,05$).

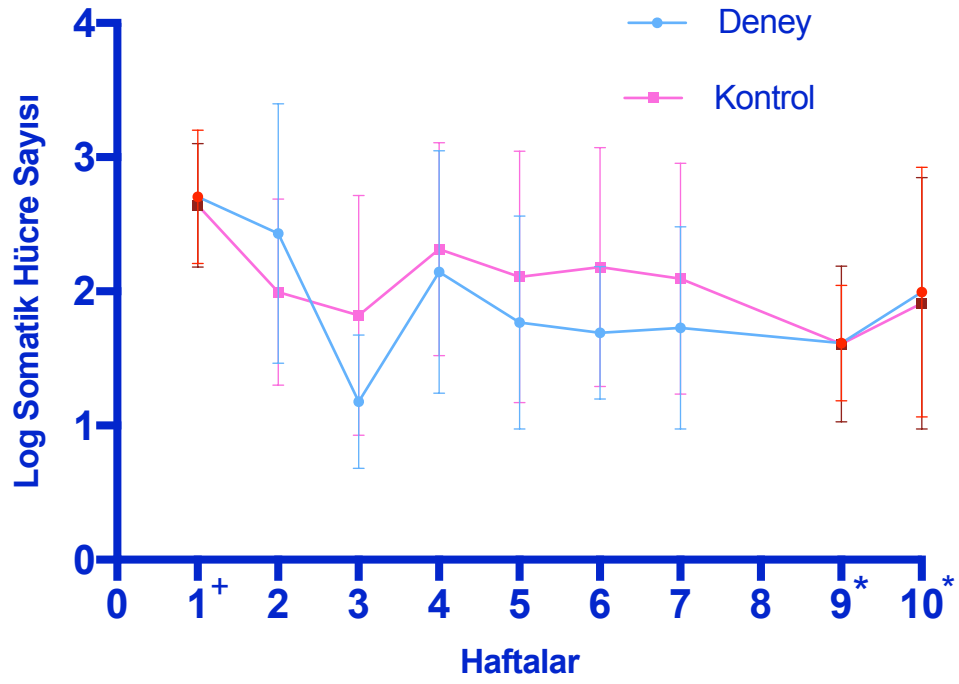
Tablo 4-44: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlardaki somatik hücre sayılarının hafta bazında istatistiksel karşılaştırılması

	GRUPLAR					
	Deney		Kontrol		Z*	p*
Haftalar	Sayı	Med (Min, Maks)	Sayı	Med (Min, Maks)		
1	13	159 (74, 2329)	15	196 (62, 2173)	-0,1	0,98
2	13	23 (2, 1544)	15	22 (2, 622)	-0,1	0,98
3	13	7 (2, 83)	15	13 (0, 643)	-0,2	0,85
4	13	11 (1, 1501)	15	54 (4, 1166)	-1,5	0,14
5	13	13 (0, 406)	15	24 (0, 971)	-0,1	0,95
6	13	20 (7, 166)	15	38 (0, 1520)	-0,5	0,61
7	13	13 (0, 234)	15	20 (1, 750)	-0,6	0,53
9	13	30 (3, 204)	14	33 (0, 127)	-0,2	0,81
10	11	19 (0, 821)	11	20 (0, 407)	-0,3	0,77



Şekil 4-51 : Deney ve kontrol gruplarına ait haftalık somatik hücre sayısı değişimi

*: 9 ve 10ncu haftalar deneme sonlandırıldıktan sonra alınan sonuçları göstermektedir.
+:1nci hafta grupların belirlendiği haftadır.

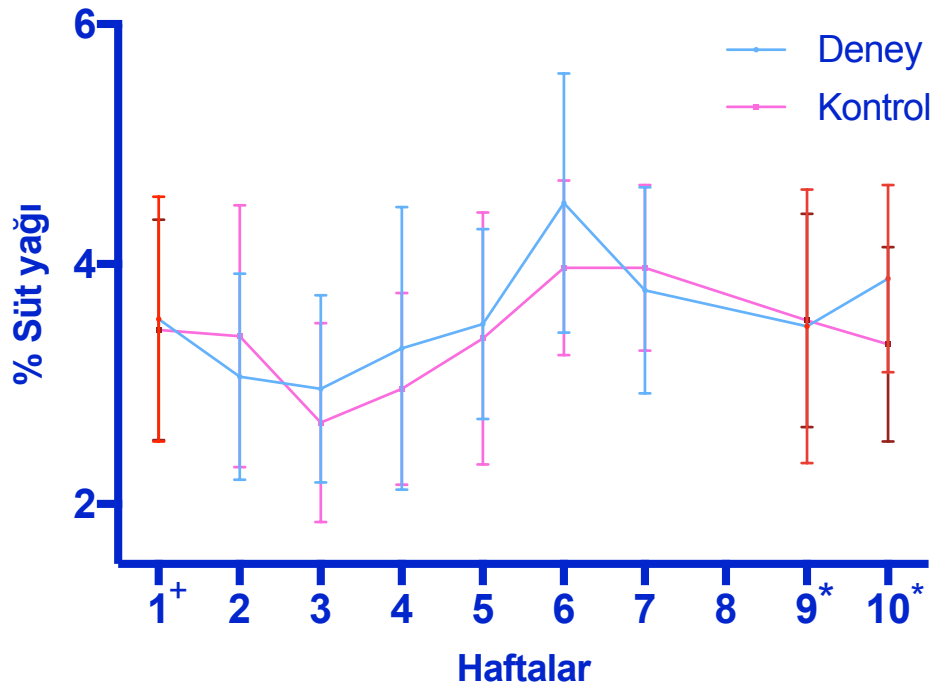


Şekil 4-52: Haftalık Logaritmik SHS deney ve kontrol grununa ait değerleri

*: 9 ve 10ncu haftalar deneme sonlandırıldıktan sonra alınan sonuçları göstermektedir.
 +: 1nci hafta grupların belirlendiği haftadır.

Tablo 4-45: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlarda ölçülen süt yağı miktarlarının hafta bazında istatistiksel karşılaştırılması

	GRUPLAR					
	Deney		Kontrol		Z*	p*
Haftalar	Sayı	Med (Min, Maks)	Sayı	Med (Min, Maks)		
1	10	3,8 (2,8, 5,9)	13	3,6 (2,6, 5,4)	-0,9	0,34
2	15	3,0 (2,0, 4,8)	14	3,4 (1,3, 5,1)	-0,8	0,41
3	15	2,9 (1,7, 3,9)	15	2,5 (1,4, 4,3)	-1,1	0,29
4	15	3,1 (1, 5,3)	14	3,0 (1,7, 4,3)	-1,1	0,26
5	15	3,4 (2,4, 4,9)	15	3,5 (1,4, 5,6)	-0,1	0,98
6	15	4,2 (3,1, 7,1)	15	4,0 (2,4, 5,3)	-0,6	0,52
7	15	3,6 (2,4, 5,5)	15	4,0 (2,4, 5,4)	-1,2	0,22
9	13	3,6 (0,5, 4,8)	14	3,2 (2,4, 5,3)	-0,3	0,77
10	10	4,2 (2,9, 5,0)	11	3,2 (2,4, 5,2)	-1,6	0,11



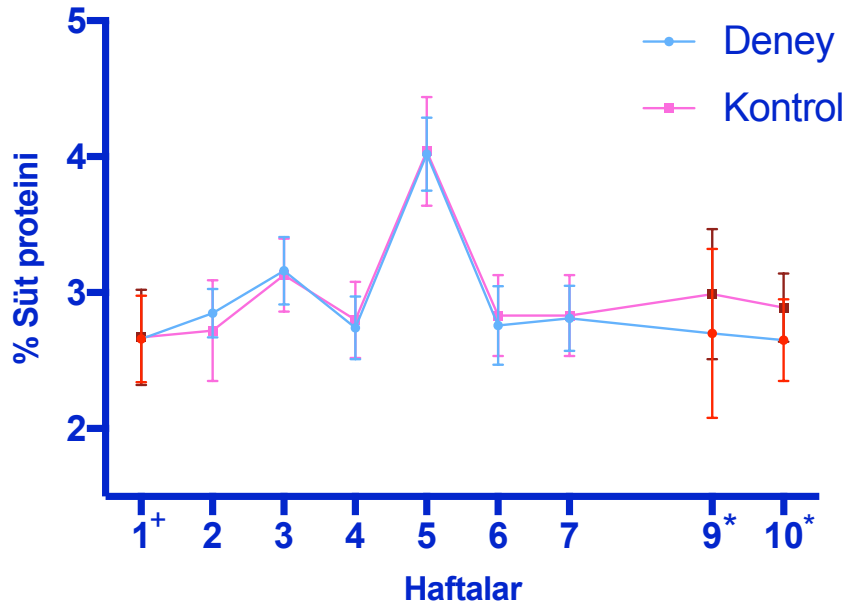
Şekil 4-53: Süt yağı yüzde miktarlarının deney ve kontrol grubuna ait haftalık değerleri

*: 9 ve 10ncu haftalar deneme sonlandırıldıktan sonra alınan sonuçları göstermektedir.

+: 1nci hafta grupların belirlendiği haftadır.

Tablo 4-46: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlarda ölçülen süt proteini miktarlarının hafta bazında istatistiksel karşılaştırılması

	GRUPLAR					
	Deney		Kontrol		Z*	p*
Haftalar	Sayı	Med (Min, Maks)	Sayı	Med (Min, Maks)		
1	13	2,7 (2,2, 4,8)	15	2,7 (1,7, 3,0)	-0,1	0,92
2	13	2,9 (2,4, 3,3)	15	2,8 (2,1, 3,3)	-1,3	0,18
3	13	3,2 (2,7, 3,7)	15	3,1 (2,5, 3,5)	-0,9	0,37
4	13	2,8 (2,3, 3,1)	15	2,8 (2,2, 3,3)	-0,1	0,95
5	13	4,0 (3,4, 4,4)	15	4,2 (3,2, 4,5)	-0,6	0,56
6	13	2,8 (2,3, 3,4)	15	2,9 (2,1, 3,3)	-0,2	0,80
7	13	2,9 (2,3, 3,3)	15	2,8 (2,1, 3,3)	-0,7	0,49
9	13	2,8 (0,5, 3,5)	14	2,8 (2,6, 4,5)	-0,8	0,40
10	11	2,7 (2,0, 3,0)	11	2,9 (2,5, 3,3)	-1,6	0,11



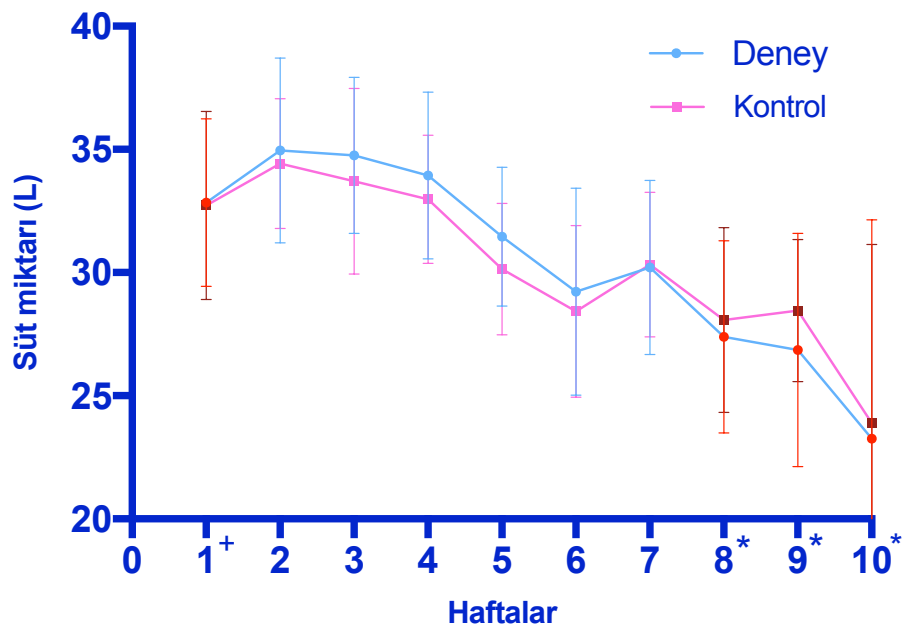
Şekil 4-54: Süt proteini yüzde miktarlarının deney ve kontrol grubuna ait haftalık değerleri

*: 9 ve 10ncu haftalar deneme sonlandırıldıktan sonra alınan sonuçları göstermektedir.

+: 1nci hafta grupların belirlendiği haftadır.

Tablo 4-47: Deney ve kontrol gruplarına göre farklı zamanlarda ölçülen süt miktarlarının (litre) istatistiksel karşılaştırılması

	GRUPLAR					
	Deney		Kontrol		Z*	p*
Değişkenler	Sayı	Med (Min, Maks)	Sayı	Med (Min, Maks)		
1	13	33,2 (25,2, 37)	15	32,4 (24,7, 38,3)	-0,4	0,68
2	13	34,3 (30,7, 41,6)	15	33,7 (30,2, 38,3)	0	1,0
3	13	34,4 (28,7, 39,8)	15	33,8 (25,5, 37,5)	-0,7	0,50
4	13	34,9 (38,9, 26,5)	15	33,7 (28,2, 36,9)	-1,1	0,26
5	13	32 (27,9, 38,3)	15	30,8 (24,2, 34,2)	-0,8	0,45
6	13	29,1 (21,9, 37,3)	15	28,2 (22,4, 33,9)	-0,4	0,68
7	13	30 (25,7 38,1)	15	30,2 (24,7, 36,2)	-0,1	0,89
9	13	28 (18,5, 32,8)	14	28,8 (22,3, 32,6)	-0,5	0,59
10	11	26,1 (1,7, 34,4)	11	26,2 (4,1, 31,5)	-0,1	0,95



Şekil 4-55: Haftalık süt miktarlarının deney ve kontrol gurubuna ait değerleri

*: 8., 9. ve 10. haftalar deneme sonlandırıldıktan sonra alınan sonuçları göstermektedir.

+: 1nci hafta grupların belirlendiği haftadır.

5. TARTIŞMA

Mastit tüm dünyada süt sığırlarında en çok görülen ve süt üretimi yapan işletmelerin karlılığını önemli ölçüde düşüren bir hastalıktır [4, 123]. Meme iltihabı olarak tanımlanan bu hastalık patojen mikroorganizmaların meme başından girerek meme dokusunda enflamasyon oluşturmalarıdır [4]. Patojenlerin meme başına ulaşması çevresel etkenler vasıtasıyla ya da temas ile gerçekleşmektedir [124]. Meme başındaki keratin tabakanın özellikle sağım sonrası açık kaldığı süre boyunca patojenlerin meme dokusuna giriş yapması kolaylaşır [125, 126]. Meme dokusunun önemli savunma mekanizmalarından olan meme başındaki keratinize tabaka [126] aşıldıktan sonra patojenler meme dokusunda farklı bağışıklık mekanizmaları ile karşılaşır. İlk karşılaşılacak hücreler doğal bağışıklık hücreleridir ve bu hücreler tekrarlanan enfeksiyon durumunda patojenlere karşı cevabı farklı seviyelerde oluşturmaktadır. Doğal bağışıklıktan farklı olarak tekrarlayan enfeksiyonların hatırlandığı antikorlar, makrofajlar ve farklı lenfoid bileşenlerinden oluşan diğer bağışıklık mekanizması enfeksiyona karşı öğrenilmiş bir cevap oluşturur [127]. Mastit hastalığının şiddetine göre hayvanda oluşan semptomlar da farklı şekilde seyreder [60]. Farklı tedavi yaklaşımları uygulanabilirse de özellikle akut mastit durumunda konvansiyonel tedavi yöntemleri uygulanır. En çok uygulanan tedavi yöntemi antibiyotik uygulanmasıdır [128]. Antibiyotik tedavisinde kullanılan dozaj şekillerini genel olarak İM enjeksiyon ve meme içi tüpleri oluşturmaktadır [129].

Mastit hastalığının şiddetine göre farklı tedavi yöntemleri uygulansa da en çok karşılaşılacak akut mastit vakalarında tedavi protokolü benzerdir. Öncelikle mastit gelişen hayvan diğer hayvanlardan farklı bir bölüme alınır. Antibiyotik tedavisine başlanacağından ve mastit oluşan memedeki süt insan kullanımına sunulamayacağından tedavi süresince ve antibiyotiğin arınma için geçen sürede sağılan süt atılır. Enfeksiyonun belirlenen etkenine göre, belirlenemiyorsa geniş spektrumlu bir antibiyotikle tedavisine başlanır [129]. Antibiyotik dışında topikal olarak meme dışına sürülen uçucu yağ içerikli kremler ile tedaviye destek verilebilir.

Akut klinik mastit hastalığında teşhis koymak oldukça kolaydır. Ön sağım esnasında çıkan sütün yapısı değişmiş ve sütte anormal görüntü (pelte oluşumları) varsa mastit olduğu söylenebilir [60]. Klinik mastiti bu şekilde teşhisi kolay olsa da subklinik mastit sürüde takip edilmesi gereken dışarıdan bakıldığında meme yapısında gözle görülür bir değişimin olmadığı (kızarıklık, yanma, ağrı, anormal süt) ancak SHS'nın sağlıklı memedeki SHS'lara göre daha yüksek seyrettiği bir durumdur. Bu durumun tedavi edilmesi konvansiyonel ilaç şekilleri kullanıldığında uygulama başına yüksek maliyet oluşturmaktadır. Ayrıca süt ile ıtrah edilen antibiyotiklerin kullanılması sütün tedavi süresince kullanılmasını engelleyen bir durumdur. Subklinik mastit aynı zamanda kronikleşerek yüksek SHS ile seyrederken süt verimini de düşürmektedir.

Mastit ve subklinik mastitten korunmak için çeşitli önlemler alınmaktadır. Çevresel patojenlere bağlı mastitten korunmada en etkili yollar süt veren ya da vermeyen ineklerin temiz, kuru bir ortamda barınmaları, meme başının sağım öncesi ve sonrası dezenfekte edilmesi, ineklerin sağımdan sonra ayakta kalmalarını sağlamak, sağım yapanların eldiven takması olarak sıralanabilir [75]. Bu şekilde sağlanan şartlar ile mastitin aylık görülme sıklığını %3 ve altına düşürmek ulaşılabilir bir hedeftir. Mastitten korunmada özellikle ana hedef meme başının patojenler ile temasını

azaltmaktır. Özellikle sağım sonrası meme başında keratinize tabakanın patojen girişini engelleyecek duruma gelinceye dek korunmasını sağlayan film oluşturuıcı ajanlar kullanılmaktadır [130].

Tüm koruma tedbirlerine uyularak mastitin ineklerde görülmesi azaltılabilmektedir.

Subklinik mastit teşhisinde sütteki artmış olan SHS en çok kullanılan yöntemlerden biridir ve kaynaklarına göre değişmekle birlikte 50.000[131], 100.000[63] üzeri SHS 'nın enfekte meme ile sağlıklı meme arasında arasındaki teşhis sınırı olduğu belirtilmiştir. SHS 'nın artmış olması dışında CMT testi ile de mastit için teşhis yapılabilmektedir ancak CMT'nin kullanımı hassas bir tespit yöntemi değildir [132]. SHS 'nin artması bir gösterge olması dışında süt bezlerinde enfeksiyonun devam ettiğini göstermektedir. Artmış SHS süt veriminde 1,4-2,7 litre aralığında düşüş yaptığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [65].

Mastit hastalığının tüm dünyada süt sığırlarında görülen en çok maliyet oluşturan hastalık olması insidansının azaltılması için yapılan çalışmaları artırmıştır. Ve sığır sindirim sistemi mevcut sağlıklı durumun devam etmesinde önemli bir rol aldığı için sığırlarda kullanılabilecek yem destekleri, katkıları önemli bir araştırma konusudur [72]. Mastit tedavisinde en çok tercih edilen yöntemin antibiyotik olması sebebiyle dirençli mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi için mastit oluşumunu engellemek insan sağlığı açısından da büyük önem arz etmektedir.

Mastit hastalığının görülmesinin engellenmesinde yukarıda sayılan koruma tedbirleri alınmasına rağmen mastitin eradikasyonu mümkün değildir. Bakım şartları dışında sığır beslenmesi, sığır metabolizmasında önemli bir organ olan işkembe dengeleri için önemlidir. Rumen yalnızca bir sindirim organı olmayıp sığırın tüm fizyolojik süreçlerini etkileyen bir organdır. Rumendeki yüksek miktarda bakteri, mantar, protozoa, virüs, methanojenler gibi birçok sindirime yardımcı mikroorganizmalar, patojenler arasındaki denge sığırın beslenmesinden, çevresel şartlardan etkilenmektedir.

Mastit insidansını azaltmak için diyet katılan iz mineraller, vitaminler, probiyotik, prebiyotik karışımları ile sığır metabolizmasında eksiklerin tamamlanması, sığır sindirim sisteminde işler dengenin korunması ve iyileştirilmesi ile süt verimi ve SHS arasında bağıntılar bulunmaktadır [8, 133, 134].

Yukarıda sayılan mastitin önemli bir sığır hastalığı olması ve insidansının düşürülmesi ile ilgili ihtiyaçlar göz önünde bulundurularak mastit hastalığını engellemek amacıyla kolofan ve terebentin karışımı oral dozaj formülasyonu hazırlamak için aday olarak seçilmiştir. Bu etken maddelerin tercih edilmesindeki en büyük sebep dünyada bu alanda yapılan ilk patent başvurusunun Türkiye'den yapılmış olması ve sığırlarda incelenen özellikler dışında sığırlarda ve patent başvurusuna konu birçok farklı hayvanda saha denemelerinden dikkat çekici sonuçların alınmasıdır.

Kolofan ve terebentin müstahzar olarak kullanımı topikal uygulamalar üzerine yoğunlaşmıştır. Topikal uygulanan müstahzar örneği olarak yanık, yara kapanması gibi durumlarda kullanılan biopin adlı ürünün deri iyileşmesinde yaptığı katkılar incelenirken immünolojik cevaba etkisi de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [120].

Günümüzde yapılan çalışmalarda kolofan ve terebetinin ayrı ayrı ya da birlikte antibakteriyal [30, 37, 45, 46], antifungal [28], antiviral [47], antikanser [48], antiparaziter [49] özelliklerinin yanında oral yoldan kullanımı ile bağırsak florasındaki

patojenleri baskıladığı ve yem verimliliğinde veteriner alanda önemli katkılar sağladığı [50] anlaşılmaktadır. Ayrıca sığırlarda enerji kaybına yol açan metan üreten bakterilere karşı kolofan içerisinde bulunan abietik asit ve terebentin içerisinde bulunan α -pinen'in bakterisidal etki gösterdiği görülmüştür[32].

Özellikle çalışmalarda kullanılan ürünler daha çok reçine asitleri üzerine yoğunlaşmıştır. Finlandiya'dan yapılan bir patent başvurusunda da reçine asitlerinin yanında özellikle kağıt üretim fabrikalarında atık olarak çıkan tall yağı yağ asitleri bulunmaktadır [37, 50].

Kolofan ve terebentin her ne kadar ülkemizde de geleneksel tedavi de kullanılan bir ürün olsa da oral yoldan uygulanmasına dair uygulamalar oldukça kısıtlıdır. Bu konuda ülkemizde de oral yoldan terapötik ve terapötik olmayan kullanımlarına ait patent başvurusu bulunmaktadır (İsmail Tekdemir, Başvuru No: 2015/05473).

Kolofan ve terebentinin sığırlarda oral yoldan kullanımı ile ilgili ön araştırmalar yapıldı. Örneğin kolofan ve terebentin içeren piyasa formülasyonu K-FON ® yem katkısı hayvan yemlerine katılarak kullanılmaktadır.

İn-vivo çalışma için uygulanacak dozun belirlenmesinde bölüm 2.1.5'de gösterilen literatürler incelendi. İn-vitro ve farklı hayvan gruplarında yapılan çalışmalarda mastit etkenleri olan *E. coli*, *S. aureus*'a karşı etkili konsantrasyonlar incelendi. Uygulanacak doz için sadece literatürdeki bilgiler dışında piyasada örneği bulunan ürünün (K-FON yem katkısı ®) uygulama dozlarından da faydalandı. Terapötik etki gösterecek doz yüksek aralıkta seçilerek farmakodinamik etkilerin (SHS'nin düşmesi, süt miktarı ve diğer süt parametreleri) daha kolay gözlemlenmesi istendi.

Kolofan ve terebentine ait toksisite çalışmaları incelenmiştir. Özellikle oral yoldan uygulamaya dair toksisite çalışmaları kısıtlıdır. Özellikle terebentin için yapılan çalışmalar inhalasyon yolu ve deri ile oluşan maruziyete yoğunlaşmıştır[55]. Terebentin kısmı için bulunan toksik dozlar kolofan için bulunan dozlara göre daha düşük olsa da çalışmada hayvanlar için belirlenen toksik dozlara her iki madde içinde ulaşılmamaktadır. Terebentin için LD₅₀ değeri 5760 mg/kg'ken[53, 55] deneyde kullanılan 500 kg canlı ağırlıkta süt sığırları için doz $\approx$ 2,1 mg/kg, kolofan için NOAEL değeri 105-200 mg/kg iken[56] kullanılan doz yine aynı özellikteki sığır için $\approx$ 57,9 mg/kg olarak hesaplandı.

Kolofan ve terebentin karışımı temel olarak reçine asitleri (kolofan) ve uçucu yağ (terebentin) olarak iki temel yapıdan oluşmaktadır. Kolofan kısmı kokusuzken, terebentin kendine has keskin bir kokuya sahiptir. KTK aynı zamanda sadece organik solventler olan etil alkol, kloroform, metanolde çözünmektedir. Suda çözünürlüğü yüzde sıfırdır.

Formüle edilmek istenen KTK karışımı daha önce literatürde geçmeyen yeni bir etken tezin konusu olan sığırlarda kullanımı açısından yeni bir maddedir. KTK'yı formülasyon içerisinde kullanmak için uygun boyutlara getirilmeden önce 3-15 cm çap aralığında partikül boyutlarında toplandı. Büyük partiküllerin işlem göreceği uygun boyut aralıklarına gelmesi için Şekil 4-24'te gösterildiği gibi ön kırma işlemi uygulandı.

Kolofanın ve terebentin formülasyon haline getirilmeden önce uygun partikül boyutlarında toz haline getirilmek istendi. Toz partiküllerinin 1 mm'nin altında olması için 2 farklı partikül boyutu küçültme yöntemi denendi. KTK'nın fiziksel özelliklerinden dolayı düşük sıcaklıkta yumuşama ve yapışma özelliklerinin artması

sebebiyle kullanılacak yöntem belirlenmeye çalışıldı. Kesme yöntemi için çift bıçaklı doğrayıcıda yapılan ön denemede yüksek miktarda yapışma gözlemlendi daha büyük üretim sırasında çıkabilecek sorunlar öngörülerek bu yöntem tercih edilmedi.

Partikül boyutunu küçültmek amacıyla daha sonra vurma yöntemi ile partikül boyutu küçülten çekiç değirmeni ile deneme yapıldı. İstenen partikül boyutunun hazırlanacak formülasyonlarda kullanılması için 1 mm'den altta olması istendi. Bu nedenle çekiç değirmeninin altında konumlanan elek kısmına (Şekil 2-11 (a)) 1 mm'lik elek kullanıldı. Ancak kısa süreli işlem sonrasında elek altlarına madde gelmemesinden dolayı cihaz durduruldu. Eleklerde yapışma gözlemlendi. Bunun üzerine 3 mm'lik elek boyutu kullanılarak partikül boyutlandırma işlemi tekrarlandı. Elde edilen toz partiküllerinin 1 mm altında olması için 1 mm elekten elenerek istenen boyut aralığına gelmesi sağlandı.

Elde edilen 1 mm altında partikül boyutuna sahip toz KTK'nın toz özellikleri incelendi.

KTK'nın çekiçli değirmende toz edildikten sonra KTK'daki yabancı madde oranını tespit etmek ve partikül boyutlandırma için yapılan 1 mm elekten ön eleme yapılma işleminin toz KTK'daki yabancı madde oranına etkisi incelendi. 1 mm elekten eleme öncesi ve sonrası yapılan yabancı madde miktarının bulunmasına dair işlem bölüm 3.2.1.1.2 belirtildiği şekilde uygulandı. Elde edilen kolofan ve terebentin içeren toz drogtaki eleme işleminin yabancı madde miktarına etkisi Tablo 4-13 ve Tablo 4-14'te gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre 1 mm ön eleme işleminin toz drogtaki yabancı madde miktarını düşürdüğü gösterildi.

Elde edilen toz KTK'nın Tg özelliklerini tespit etmek amacıyla toz KTK DSC cihazı ile bölüm 3.2.1.1.3'de belirtildiği şekilde bakıldı. Toz KTK'ya ait Tg sıcaklığı Şekil 4-30'da gösterildi. Yaklaşık 40 derecede olarak hesaplanan Tg sıcaklığı özellikle yaz aylarında yapılacak çalışma için stabilite konusunda (birleşme ve ayrışmama) sorun oluşturacağı öngörüldü.

Reçine asitleri yapısı gereği yüksek oranlı adeziv ve kohezif özelliklere sahiptir. Bu özellikleri toz akıcılığına negatif etki etmektedir. Toz akıcılık özelliklerinin belirlenmesi için farmakopede belirtilen çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

Toz KTK'nın toz akıcılık özelliklerini belirlemek amacıyla yığın açısı ve akma süresi, % sıkışabilirlik ve hausner oranları incelendi.

Toz akıcılığı için kullanılan paslanmaz çelik huni ile yapılan yığın açısı denemelerinde toz KTK huniden serbest akış göstermedi. Serbest akış göstermemesi sebebiyle huni içerisindeki tozun akması için titreşim uygulandığında akan toz ile düzgün koni şekli oluşturulamadı. Bu nedenle bu yöntem toz akıcılık özelliklerini tespit etmek için kullanılmadı.

Toz akıcılığını belirlemek için diğer bir yöntem Hausner oranı ve % sıkışabilirliktir. Bölüm 3.2.1.1.2'de anlatıldığı şekilde toz KTK'ya mezür içerisinde sıkıştırma cihaz yardımı ile belirli vurma sayıları ile sıkıştırma işlemi uygulandı. Toz KTK akıcılığı Tablo 4-15'te gösterildiği gibi hausner oranına göre "kötü", % sıkışabilirliğe göre "çok kötü" oldu.

Toz KTK'da yapılan diğer işlem içeriğindeki terebentin miktarının bulunmasıydı. Toz KTK'daki terebentin oranlarının oda sıcaklığındaki değişimini incelemek amacıyla karar verilen formülasyonun konulduğu paketler (doypack)

içerisinde 6 ay muhafaza edilerek Clevenger apereyi ile %h/a terebentin miktarları bölüm 3.2.1.1.2’de anlatıldığı şekilde uygulanarak bulundu. Student t testi ile karşılaştırılan başlangıç (Tablo 4-19) ve 6. ay (Tablo 4-20) sonuçlarına göre anlamlı bir düşüş gözlenmedi (Tablo 4-21)($p>0,05$, $p = 0,116$).

Toz KTK’nın partikül boyut dağılımını bulmak için bölüm 3.2.1.1.2’de anlatılan elek analizi ile inceleme yapıldı. Elek analizinde kullanılacak numune miktarını ve elek analizinde sarsma işlem süresinin tespiti için son nokta tespiti ve 25 g, 50 g numuneler kullanılarak bulundu. Her iki numune miktarı için elek üstlerinde kalan madde oranları ve miktarları incelendi (Şekil 4-26, Şekil 4-27, Tablo 4-16, Tablo 4-17). 25 g numune için son dakika süresi 30 dakika, 50 g numune için 35 dakika olarak hesaplandı. 50 g numune kullanılması ile 75 μm ’de takılı kalan madde oranlarının 25 g numuneye göre fazla olması sebebiyle 25 g numune ile elek analizi yapıldı. 25 g toz KTK ile yapılan elek analizine ait partikül büyüklükleri yüzde sıklık ve madde miktarları sırasıyla Şekil 4-28 ve Tablo 4-18’de gösterildi. Yarı logaritmik kümülatif yüzde partikül büyüklükleri ile oluşturulan denklem ile (Şekil 4-29) toz KTK için $d_{10}= 39,269 \mu\text{m}$, $d_{50}= 114,112 \mu\text{m}$ ve $d_{90}= 331,601 \mu\text{m}$ bulundu. Tablo 2-6’e göre çok ince olarak sınıflandırılabilir.

Toz KTK’nın günlük uygulanacak oral dozunun yüksek olması formülasyon geliştirmede en büyük kısıtlayıcı faktör oldu. Oral formülasyon olarak yeme katılabilen pelet ve boncuk, oral içirme için süspansiyon ve rekonstitüe süspansiyon formülasyonları hazırlandı.

Yapılacak hayvan deneyi çalışmasında hazırlanan formülü yem ile vermek en zahmetsiz ve uygulaması kolay yol olsa da yeme katılacak formülasyonun yem ile karıştırılmasının ardından her bir hayvanın yiyeceği yem miktarının ya da yem içerisinde ulaşabilecek kolofan terebentin miktarlarının tespit edilemeyeceği için yeme katılarak uygulama birim doz doğruğu temin etmek açısından dezavantajlıdır.

Uygulama esnasındaki fiziksel şartlar da formülasyon için önemlidir. Deney yapılacak alanda her bir hayvanın bireysel yeme ulaşma durumu olması halinde yeme katılacak bir formül denenmesi daha kolaydır. Ancak yeme katılmada bu sefer terebentinden kaynaklanan koku problemi sebebiyle deney başlangıcına ek olarak adaptasyon süreci gerekecektir. Eğer adaptasyon süreci uygulanmadan ürün hayvan yemlerine katılırsa koku ile ilgili problemten dolayı hayvanın yem yemesinde azalma ve buna bağlı süt azalması gibi problemlerin ortaya çıkabilmesi muhtemeldir.

Koku problemini gidermek amacıyla polimer içerisinde hapsedilmiş bir formülasyon düşünüldü. Seçilecek polimer için istenen özellikler belirlendi. Bunlar; ucuz olması, biyoparçalanabilir olması, toksisitesinin düşük ya da hiç olmaması ve formülasyon hazırlamasının kolay olmasıydı. Tüm bu özellikleri bir arada bulunduran bir polimer bulunmasa da sodyum aljinat içerisine yüklenen KTK ile aljinat boncukları oluşturuldu. En iyi etken madde/ sodyum aljinat oranını bulmak için etken madde %1-2-3 oranında ve Aljinik asidin %0,5-1-1,5-2 oranında içeren formülasyonların kombinasyonları şeklinde hazırlandı (Tablo 3-11) ve Şekil 4-31’de gösterildiği gibi optik mikroskop altında fotoğrafları çekildi. Fotoğraflarda da görüleceği üzere düzgün küresel şekillerin olduğu formülasyonlar F37, F39, F40 ve F41 kodlu formülasyonlar oldu.

Artan oranlarda toz KTK ve sodyum aljinat oranları ile oluşturulan formüllerde düşük sodyum aljinat oranları ile küresel partiküller elde edilmeye çalışıldı ancak sodyum aljinatın %0,5-1 oranlarında düzgün şekiller elde edilemedi.

Düzgün şekillerin elde edilebildiği en düşük sodyum aljinat konsantrasyonu F36-F37 formülleriyleydi.

Yeterli sodyum aljinatın konulmaması durumunda polimerin düzgün küresel şekiller oluşturmamasını engelleyecek düzeyde yüksek madde yüklenmesi şekil bozulmalarına ve boncukların ayrı ayrı sertleşmesini engelledi.

Etken madde yükleme ve sodyum aljinat boncukları elde etme açısından en yüksek verimi sağlayan formülasyon F41 formülü oldu. Ancak en düşük sodyum aljinat harcanarak küresel boncukların elde edildiği formülasyon F37 formülü oldu.

Sodyum aljinat boncuklarının özellikle kullanılmak istenmesinin sebebi kullanılan drogtaki terebentin uçucu yağının oluşturduğu koku probleminin giderilmesi idi.

Koku problemi giderildiğinde sığırların yemine katılan formülasyon hayvanlarda yem yeme isteğinin azalmasına sebep olmayacağı öngörüldü.

Formülasyonun yeme katılması düşünülerek hazırlanan bu formülde şekil yapıları bozuk olsa dahi en düşük sodyum aljinat kullanılan formülasyonlarda bile koku ile ilgili problemler azaldı.

Koku probleminin tamamen giderilmesi için %2 Sodyum Aljinat ile hazırlanan formüller daha başarılı bulundu.

Sodyum aljinat ile hazırlanan boncuklar toz partiküllerinin agregasyonunu sağladıkları için son oluşan granülün akışkanlığı adeziv ve kohezif karakterdeki etken maddenin akışla ilgili problemini tamamen ortadan kaldırma potansiyeline sahipti.

Sodyum Aljinat boncukları akış özelliklerinin artması ve koku probleminin baskılanması sebebiyle yeme katılacak formülasyon seçenekleri için çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Tek düze ve 1 mm den büyük partikül boyutları kaba yem ile karıştırmada homojenitenin sağlanması açısından avantajlıdır.

Dezavantaj olarak hazırlanma sürecinin güçlüğü ve zaman alması, sodyum aljinatın ucuz bir hammadde kaynağı olmaması ve in vivo deneyde uygulama esnasında birim doz doğruluğu tesis etme sıkıntısı oluşacağından diğer formüllere yönelindi.

Bu formülasyonlarda en iyi etken madde/sodyum aljinat oranına sahip olan formül F41 oldu.

Aljinat boncukları koku probleminin giderilmesinde öne çıkan özelliği olmasına karşın hazırlamada bulunan sodyum aljinatın şişirilmesi ve etken madde ile karıştırılması ardından karışım esnasında %2 (a/h) kalsiyum klorür solüsyonu içerisine damlatılması, oluşan boncukların süzülerek toplanması ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılması laboratuvar şartlarında bir dizi basit işlem olsa da büyük hacimli üretim için farklı ekipmanları gerektirmekte ve birim zamanda üretilen formülasyon miktarı açısından kısıtlıdır.

Sodyum aljinat boncukları yem ile verilmesi durumunda birim doz doğruluğu açısından dezavantajlıydı. Ancak bu formül koku probleminin engellenmesi önemli özelliklere sahipti. Daha uygun fiyatlı bir polimer ve üretim prosesi ile yeme ilave edilmesi için alternatif oluşturmaktadır.

Toz KTK'nın toz akıcılık özellikleri yukarıda belirtildiği gibi housner oranına göre kötüdür. Bu tozun akıcılığının artırılması ve partikül boyutlarının tek düze hale getirilmesi için pelet oluşturma üzerine formülasyon denemeleri yapıldı (Tablo 3-10).

Pelet oluşturmak amacıyla denenen formüllerde bağlayıcı olarak PVP ve alkol denendi. Alkol tek başına bağlayıcı özelliği taşımayan ancak granülasyon aşamasında kullanılabilen bir solvent iken burada alkol kullanılmasının asıl sebebi kolofan ve terebentin karışımının alkolde çözünmesi ve kendi özelliklerinden dolayı yapışkanlığın artması sebebiyle bağlayıcı etki için düşünüldü.

Pelet formülasyon denemelerinde farklı konsantrasyonlarda kullanılan bağlayıcı, kıvam verici gibi maddeler ile yüksek etken madde oranına sahip peletler oluşturmak için gerekli yapıda bir karışım oluşturulamadı. Formülasyonun hazırlanmasında görülen problem alkolün çok düşük miktarlarda ilave edildiğinde istenen yapışma ve homojenlik sağlanamazken az miktarda artırılması ile formülasyonun tamamen yapışkan ve ıslak bir forma dönüşmesi idi. Ayrıca katılan dolgu maddelerinin artırılmasıyla da granülasyonun istenen düzeyde olmadığı bir karışım oluştu. Hazırlanan granülasyonların bir araya gelmesiyle oluşan macun benzeri görüntü pelet cihazına verilemeyecek kadar yapışkan ve ekstrüderden geçtikten sonra tekrar birleşecek bir yapı oluşturdu.

Hazırlanan pelet formülasyonları arasında ekstrüder cihazına verilmesi en uygun görülen F28 formülasyonu oldu. Bu formül diğer pelet formülasyonlarına göre daha kuru bir görüntü oluşturdu. Ancak ekstrüderin çalışma mekanizması gereği vida benzeri itme mekanizması ile maddeyi ilerletmesi sebebiyle sürtünmeden dolayı ısınma olacağı ve düşük Tg sıcaklığına sahip kolofan terebentin karışımının cihazın iç çeperlerine yapışma problemi oluşabileceği ve cihazı tıkayabileceği düşünülerek ekstrüder cihazından geçirilmedi. 1 mm elek ile yapılan boyutlandırma denemesinde dahi eleğe yapışma gözlemlendi.

Formülasyon olarak çalışılan diğer bir dozaj şekli süspansiyondur. Hazırlanan tüm süspansiyon formülasyonları Tablo 3-9'da gösterildi. Süspansiyon formülasyonları ile yapılan çalışmalarda ıslatma ajanlarının kullanımı sayesinde hidrofob karakterdeki kolofan terebentin karışımının ıslanması sağlandı.

Geliştirilen süspansiyon formülasyonlarının çökme hacmi (F), flokülasyon derecesi(β), redispersiyon süresi ve redispersiyon çevirme sayısı gibi çeşitli özelliklerine bakılarak (Tablo 4-22) uygun formülasyon bulunmaya çalışıldı. Kolofan ve terebentin hidrofob özelliktedir. Bu nedenle süspansiyon hazırlanmasında ilk hazırlanan formülasyonlarda artan oranlarda ıslatıcı ajan olarak gliserin ilave edildi. Süspansiyon formülasyonlarında artan oranda gliserin ilavesi ile F1, F2, F3, F4 formülasyonlarında çökme hacmi arttı ve redispersiyon zamanı azaldı. F4 formülü baz alınarak süspansiyon formülasyonu bileşenlerinden kıvam artırıcı ve jelleştirici polimer olan metil selüloz (4000 cp) 3 seviye çalışılarak çökme hacmine ve redispersiyon zamanına bakıldı. F4,F5,F6 formülasyonları ile 3 seviye bakılan metil selüloz oranlarında en düşük redispersiyon zamanı ve çevirme sayısı F5 formülasyonu ile gerçekleşti. F6 formülasyonu F değeri daha yüksek olsa da F6 formülasyonunun redispersiyon zamanı F5 formülasyonuna göre iki katına çıktı.

Hazırlanan süspansiyon formülasyonu yazın verilmesi planlanan sıcaklıklarda stabil kalması açısından stabilite kabine kaldırılmadan önce etüvde 40 dereceye 6 saat mazur bırakıldı. Hazırlanan formül oda sıcaklıklarında stabil olsada etüvde kalan formülasyonda etken maddenin düşük Tg sıcaklığı sebebiyle formülasyonda kekleşme görüldü ve redispersiyonu imkansızdı. Süspansiyon formülasyonunun yüksek miktarda hazırlanması için ayrıca homojenizatör gibi teknik ekipmanlar zorunlu olacaktı. Ayrıca uygulanacak her bir madde için yaklaşık 150-170 ml hacmin depolanması ve her biri için ayrı şişe gerekmesi de maliyet açısından zorlayıcı bir unsurdur. Hazırlanan

formülasyonun bu şekilde bir stabilite problemi ve diğer dezavantajları nedeniyle hazır süspansiyon formülasyonu oluşturmaktan vazgeçildi.

Rekonstitüe süspansiyon formülasyonu ile toz KTK'nın fizikokimyasal özellikleri dolayısıyla oluşan dezavantajları çoğunlukla aşılmaktadır. Süspande hale gelmeden önce ürünü toz formunda beklemesi stabilite açısından önemlidir. Toz paketlerinin az yer kaplaması açısından depolama alanı ihtiyacı minimumdur. Birim dozların paketlenmesi sebebiyle her bir paketin sulandırılarak uygulanması birim doz doğruluğunu temin konusunda önemlidir. Ve Süspansiyon gibi ilk hazırlanmada ortamında disperse edilmediği için kekleşme problemi ve sıcaklığa bağlı bütünleşme problemi en azdır.

Birim doz doğruluğu konusunda yeme katılan formülasyona göre avantajlı bulunan süspansiyon formülasyonunun hazırlandıktan sonra bekletilmesi sırasında oluşacak stabilite problemini aşmak amacıyla rekonstitüe süspansiyon formülasyonları çalışıldı. F1-F6 formülasyonlarında ıslatıcı ajan olarak kullanılan gliserin çıkarılıp yerine dolgu maddesi olarak hayvancılık alanında yem katkılarında sıkça tercih edilen kalsiyum karbonat (CaCO_3) kullanıldı. Ancak F7-F8-F9 formülasyonlarında metil selüloz ile ıslatıcı ajan olmadan CaCO_3 kullanımı süspansiyonun ilk hazırlanması sırasında ıslanmayı zorlaştırdı.

Islanmanın daha kolay olması için suda dispersiyonu daha iyi olan karboksi metil selüloz (CMC cp 10.000) tercih edildi. CMC ile hazırlanan F10,F11,F12 formülasyonlarında artan oranda CMC eklendi. Bu formülasyonlarda F değeri, redispersiyon süresi ve çevirme sayısında en iyi formül F11 formülasyonu olarak bulundu.

CaCO_3 dolgu maddesi dışında F13, F14 formülasyonlarında sırasıyla Starch 1500 ve Avicel ph 102 kullanılmıştır. F11, F13, F14 formülasyonları 6 saatlik 40 °C 'lik etüvde bekletilerek farklı dolgu maddelerinin sıcakta erime ve katılma üzerine üstünlüklerine bakılmıştır. Ancak çalışılan 3 dolgu maddesinin de düşük Tg'den kaynaklı erime ve bütünleşme üzerine diğerlerinden üstünlüğü oluşmadı.

Hazırlanan F11 formülasyonunda defloküle süspansiyon özelliklerine benzer çökmenin yavaş ve küçük partiküllerin uzun süre asılı kaldığı bir görüntü oluşmaktaydı. Bu sebeple hızlı çökmenin sağlanması amacıyla farklı üç oranda flokülasyon ajanı olarak sodyum sitrat kullanılarak flokülle halde hızlı çöken bir süspansiyon hazırlanmak istendi. Artan oranlarda sodyum sitrata eşdeğer sodyum sitrat dihidrat eklenen F15-F16-F17 formülasyonları incelendi. F değeri hazırlanan üç formülasyonda da F11 formülasyonuna göre oldukça yükseldi F=1 değerine çok yaklaştı. Ancak redispersiyon zamanı ve çevirme sayısı oldukça arttı. Flokülasyonu artırması için kullanılan sodyum sitratın hızlı ve floklar halinde çökme açısından etkisi görülmedi aynı zamanda redispersiyonu zorlaştırması sebebiyle sodyum sitrat içeren formüller kullanılmadı.

Hazırlanan formülasyonlara ait kontrol ve denemeler bitirildikten sonra in-vivo denemede kullanılacak formülasyon değerlendirilerek uygulanacak formül seçildi.

Yeme ilave edilerek uygulanabilecek pelet formülasyonu ve aljinat boncuklarının denemenin yapılacağı çiftlik şartlarına uygun olamaması sebebiyle vazgeçildi. Deneme yapılacak çiftlikte padoklardaki hayvanlar dağınık şekilde yerleşmekteydi ve bireysel yemleme yapılamadığı için hazırlanan formüllerin denemeye dahil edilen hayvanlar tarafından yenildiğinin takip edilmesi mümkün değildi.

KTK'nın oral yoldan uygulanması amacıyla üzerinde çalışılan 2 farklı dozaj formu (katı; "boncuk, pelet", sıvı; "süspansiyon") , 4 farklı formülasyon şekli (boncuk, pelet, süspansiyon, rekonstitüe süspansiyon) ile ilgili puanlandırma bölüm 3.2.2'de belirtilen kıstaslara göre yapılarak Tablo 4-28 oluşturuldu. Tabloya göre en avantajlı olan rekonstitüe süspansiyon formülasyonunun in-vivo çalışmada kullanılmasına karar verildi.

Süspansiyon formülasyonlarında redispersiyon zamanı, çökme hacmi açısından diğer formülasyonlara göre daha az yardımcı madde taşıyan ve rekonstitüe süspansiyon formülasyonu olması uygulama ve depolama olarak avantajlı olan F10, F11, F12 formülasyonlarının viskoziteleri gösterilerek bu formüllerdeki süspansiyon ajanının oranlarına bağlı olarak viskozitelerdeki değişim ve viskozitenin artan rpm'e bağlı olarak artan torka göre hangi akış karakterinde olduğu gösterilmek istendi. Viskozite ölçümleri bölüm 3.2.1.2.1'de anlatıldığı şekilde uygulandı.

Tablo 4-23, Tablo 4-24, Tablo 4-25'te görülen tüm formüllerin 1. dakikaya göre 5. dakikadaki viskozite değerlerindeki azalma hazırlanan süspansiyon içerisindeki partiküllerin çökmesinden kaynaklanmaktaydı.

Hazırlanan süspansiyonların arasında ciddi miktarda viskozite farklılıkları olması sebebiyle viskozimetrenin sağlıklı sonuç verdiği 10-100 arasındaki Tork değerlerine 3 farklı formülasyonu incelemek için aynı spindle ile ulaşamadı. Karşılaştırma yapmak amacıyla 3 farklı formülasyon için 3 farklı spindle kullanmamak için F10 formülasyonu için 1. dakikada $8,9 \pm 0,7$ ve 5. dakikadaki $6,3 \pm 0,1$ değerleri göz ardı edildi.

1. ve 5. dakikadaki viskozitedeki farklılıklar en az Tablo 4-25'te gösterilen F12 formülasyonunda oldu. Viskozitenin yüksek olması sebebiyle partiküllerin çökmesi oldukça yavaştı, bu nedenle viskozitedeki azalma oldukça az oldu.

Süspansiyonlar non-newtonian akış karakterlerine sahiptir. Çalkalandığında yani güç uygulandığında viskozitenin düşmesi süspansiyonların karıştırılmasının kolay olması için istenen bir özelliktir. Bu özelliğin incelenmesi amacıyla artan tork değerlerinde viskozitenin düşmesi beklenmektedir. Ancak farklı dakikalardaki ölçümlerde dispers fazın çökmesi sebebiyle viskozitede düşme F10, F11, F12 formülasyonlarının hepsinde görüldü. Zamanla dispers fazdaki çökmenin en az olduğu ölçümler F12 formülasyonuna aittir. Bu nedenle farklı tork değerleri ile viskozitenin değişimini incelemek için F12 formülasyonu tercih edilmiştir. F12 formülasyonu hakkında elde edilen değişen tork değerlerine bağlı viskozite değişiminin aynı süspansiyon ajanının ve aynı miktar ve cins dolgu maddesinin kullanılması sebebiyle F10, F11 içinde geçerli olacağı aşikardır.

F12 formülasyonu ile denenen farklı rpmlerde ile tork miktarı artırıldığında viskozitenin düştüğü görüldü (Tablo 4-25). Kuvvet uygulandığında viskozitenin düşmesi non-newtonian akışlarda psödoplastik akış karakterinin özelliklerini göstermektedir.

CMC'nin süspansiyon ajanı olarak kullanıldığı bu formülasyonlar arasından seçilen F11 formülasyonu redispersiyon zamanı, çökme hacmi, bekletildiğinde oda sıcaklığında kekleşme problemi görülmemesi ve yüksek etken madde/dolgu madde oranına sahip olması sebebiyle hayvan deneylerinde etken maddelerin oral yoldan uygulanmasında kullanılacak formülasyon olarak tercih edildi.

En son karar kılınan F11 formülasyonu uygulamaya hazır hale getirmek için primer ambalaj ile ilgili araştırma yapıldı. Rekonstitüe toz formülasyonunun

paketlenmesi için çok dozun tek bir pakette toplanması hayvanalara uygulama öncesinde birim dozun tekrardan tartılmasını ya da belirlenecek bir ölçü kabında işaretli bölmeye kadar doldurmayı gerektireceği için tek dozluk paketleme yapılmasına karar verildi. Bunun için günümüzde gıda endüstrisinde sıkça tercih edilen doy-pack torbalar tercih edildi. Ağız kısmında kapatmak için ayrı bir bölme olması dışında ağız kısmını ısı ile kapatarak sızdırmazlık özelliği kazandırmak stabilite açısından üstünlük oluşturacağı düşünüldü.

İn-vivo çalışmada kullanılacak F11 formülasyonu doldurulmuş doypack torbalara konulacak toz karışımı Uğur Yem Katkıları LTD. şirketine ait üretim alanında üretildi. Yukarıda bahsedilen çekiçli değirmen ile partikül boyutu küçültülen toz KTK hava geçirmez çift katlı polietilen torbalarda muhafaza edildi ve diğer tozlarla karıştırılncaya dek oda sıcaklığında saklandı. Hayvanlara uygulanacak F11 formülasyonu kurdeleli (ribbon) karıştırıcıda geometrik seyreltme prensibine göre karıştırılarak hazırlandı. Ancak karıştırılan maddeler arasındaki bağıl oranlar homojen karışım elde etmek için zorlayıcı seviyedeydi. Bu nedenle kurdeleli (ribbon) karıştırıcıya aktarılmadan önce düşük miktardaki CMC, kalsiyum karbonat ve bir miktar kolofan, terebentin karışımı ön karıştırmaya tabi tutularak geometrik seyreltme prensiplerine göre karıştırıldıktan sonra ribbon karıştırıcıya eklendi ve kalan toz kütlesiyle karıştırıldı.

Ardından manuel olarak hassas terzide tartılarak doldurulan her doy-pack torba önce kilit mekanizması ardından ısı ile kapatma uygulanarak kapatıldı. F11 formülasyonu için yapılan tüm kontroller tek seferde üretilen doy-pack torbalara konulan seri kullanılarak gerçekleştirildi.

Karar verilen F11 formülasyonuna rekonstitüe süspansiyon formülasyonu olması sebebiyle toz formuna toz kontrolleri, süspansiyon formuna süspansiyon kontrolleri uygulandı.

F11 formülasyonunun toz KTK'ya göre karşılaştırması için DSC analizi yapıldı. Şekil 4-32'de gösterildiği şekilde az miktarda Tg sıcaklığında yükselme görüldü. Ancak bunun standart sapmalar dahilinde olduğu ve incelenen formülasyonun yüksek oranda içeriğini oluşturan toz KTK'nın saf bir madde olmamasından dolayı değişkenlik gösterebileceği düşünüldü.

F11 formülasyonu partikül şekilleri açısından Bölüm 3.2.3.1'de anlatıldığı şekilde optik mikroskop ile farklı yakınlık derecelerinde fotoğraflandı. Şekil 4-33, 4-34, 4-35, 4-36'da gösterildiği şekilde formüldeki toz partiküllerinin küresele yakın olduğu görüldü. Kolofanın camısı görüntüsü Şekil 4-36'da detaylıca görülebilmektedir. Çekiç değirmeni ile yapılan partikül küçültme işleminde küresele yakın KTK partiküllerinin elde edilebildiği görüldü.

F11 formülasyonunun toz halinin incelenmesinde elek analizi uygulandı. Bölüm 3.2.3.1'de belirtilen testler sırasıyla hazırlanan F11 formülasyonuna uygulandı. Son nokta tespiti için elek üstlerinde kalan miktarlar F11 formülasyonu için 25 g ve 50 g numuneler ile denendi. Şekil 4-37'de gösterilen kümülatif % sıklık oranları birbirine çok yakın gözükse de Tablo 4-29 ve Tablo 4-30'da görülen sayısal değerler ve Şekil 4-38 ve 4-39'da görüleceği üzere 25 g ve 50 g numune ile denemelerde 75 µm elek üstünde kalan toz miktarları oran olarak değişkenlik göstermiştir. 50 g toz numunesinin 75 µm elekten daha az geçebilmesi numune miktarının deneme için fazla olduğunu gösterdi. Bu nedenle 100 g için ayrı bir deneme yapılmadı. Şekil 4-39'da belirlenen son nokta ve numune miktarına göre 3 seri numune ile yapılan elek analizi sonucu

gösterilmektedir. Yarı logaritmik kümültatif yüzde partikül büyüklükleri ile oluşturulan denklem ile (Şekil 4-41) F11 formülasyonu için $d_{10}= 45,236 \mu\text{m}$, $d_{50}= 136,346 \mu\text{m}$ ve $d_{90}= 410,96 \mu\text{m}$ bulundu. Tablo 2-6'e göre ince olarak sınıflandırılabilir. Toz KTK'ya göre partikül boyutlarının artması formülasyondaki CaCO_3 ve CMC sebebiyle olduğu düşünüldü.

F11 formülasyonu için bölüm 3.2.3.2'de belirtildiği şekilde Hauser oranı ve % sıkışabilirlik özelliklerine göre toz akıcılığı bulunmaya çalışıldı. Tablo 4-32'de F11 formülasyonuna ait % sıkışabilirlik ve hausner oranları bulunmaktadır. Tablo 3-7'ye göre F11 formülasyonu Hausner oranına göre $1,269 \pm 0,002$ ile zayıf akış karakteri, % sıkışabilirlik değerine göre $21,232 \pm 0,158$ ile zayıf akış karakteri gösterdi. Toz KTK'nın F11 formülasyonu içerisinde kullanılarak akış karakterinin daha akıcı hale getirildiği görüldü.

Toz KTK'nın kohezif adezif özelliklerinden dolayı serbest akış gösteremediği için bakılamayan yığın açısı ve akma süresi F11 formülasyonu için bakıldı. Şekil 4-42'de F11 formülasyonu için uygulanan yığın açısı tayini fotoğrafları görülmektedir. Cetvel ile ölçülerek paslanmaz çelik huninin tabandan 5 cm yükseğe konumlanması sağlandı. F11 formülasyonunun akıcılığı toz KTK'ya göre daha iyi olmasına rağmen akma süresinin hesaplanacağı kadar serbest akış göstermedi. Ancak akan tozlar ile düzgün koni şekli oluşturulabildi. Tablo 4-33'te F11 formülasyonu için ölçülmüş 3 seriye ait yığın açıları ve Tablo 3-8'de bu açıların denk geldiği akıcılık özellikleri görülmektedir. Bu bilgiler ışığında numunelerin ortalama $37,251 \pm 3,783$ yaptığı açılı toz akıcılığı için "Fena değil"e karşılık geldi. Ancak çalışılan tozun adezif bir toz olması ve serbest akışı gerçekleştirememesinden dolayı Hausner oranı ve % Sıkışabilirlik değerleri toz akıcılığını tespit etmek için kullanılmalıdır.

Karışımın homojenitesini test etmek amacıyla formülasyon karışımı F11'in ağırlık sapması (Tablo 4-34), içerik homojenitesi (Tablo 4-35) ve viskozitelerine (Tablo 4-24) bakıldı. Tüm yapılan test sonuçlarına göre düşük standart sapma değerleri elde edildi. Ağırlık sapması testinin başarılı olması birim dozlara bölünmüş formülasyonun ağırlık sapması limitleri içinde kaldığını gösterdi. İçerik homojenitesi testi ile hayvanlara verilecek her bir dozaj formunda bulunun etken madde, yardımcı maddelerin düşük standart sapmalar gösterdiği ve formülasyondaki değerlere çok yakın şekilde paketlenildiğini gösterdi. Ve viskozite değerlerinde standart sapmanın düşük olması karıştırılan tozların bağıl oranları yüksek olmasına rağmen CMC'nin toz karışımına homojen dağıldığını gösterdi.

Ardından hazırlanan F11 formülasyonu başlangıç, birinci ay, üçüncü ay ve altıncı aylarda bakılacak her bir ölçüm için 3 numune ile $40^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ ve $\%75 \pm 5$ rölatif nemdeki stabilite kabinine bırakılarak hızlandırılmış stabilite testi koşullarında incelendi.

F11 Formülasyon içerisindeki kolofan ve terebentin 6 aylık $40^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ ve $\%75 \pm 5$ rölatif nemdeki stabilite testlerinde incelendiğinde farklı kimyasal yapıları sebebiyle aynı numunelerden farklı yöntemler ile analizleri yapıldı. İçeriklerin incelenmesine ait analiz metodları bölüm 3.2.3.8'de gösterildi.

Stabilite kabininden çıkarılan numunelerin katılaşması sebebiyle GC-MS cihazındaki işlemlerden önce tekrar toz edilmesi gerekmiştir.

F11 formülasyonunda bulunan kolofan için stabilite kabininde tutulan ağzı ısıyla kapatılmış, primer ambalaj içerisindeki numunelerden alınan örnekler ile 0,1,3,6 ncı

ayda kromatogramlarda farklı bir bileşik oluşmadığı ve ana bileşenleri oluşturan abietik asit, dehidro abietik asit, palustrik asit, izopimarik asit yüzdelерinde anlamlı bir değişim olmadığı Tablo 4-36, 4-37, 4-38, 4-39 ve Şekil 4-43, 4-44, 4-45, 4-46'da gösterildi.

Terebentin için ise Tablo 4-40, 4-41, 4-42, 4-43 ve Şekil 4-47, 4-48, 4-49, 4-50 de gösterildiği gibi içerik yüzdeleri ve kromatogramlarda önemli bir değişiklik oluşmadı.

Hazırlanan F11 formülasyonu in-vivo denemede SHS'ına karşı etkinliği ve diğer süt parametreleri ile süt miktarına etkisi incelendi. Bu denemede SHS'nın bölüm 2.2.6.'da belirtilen farklı durumlardan etkilenmemesi için deneme için seçilen deney ve kontrol grubuna ait hayvanlar aynı bölmede bulunan, aynı yem karışımı ile beslenen ve aynı anda sağıma giden hayvan grubu içinden seçildi. Bu deney ve kontrol grupları belirlenirken ortalama sağım gün sayısı ve ortalama yaşları da dikkate alınarak eşit gruplar oluşturulmaya çalışıldı. Seçilen hayvanların özellikleri Tablo 3-12'de gösterildi. Belirlenen gruplardaki SHS'nın istatistiksel olarak farklı olmadığı (1. hafta verileri) Mann Whitney U testi ile gösterildi ($p>0.05$) (Tablo 4-44).

Deney süresi boyunca haftada bir gün her bir hayvandan bireysel olarak Şekil 3-23'te gösterilen sağılan sütü en iyi şekilde homojen karışım olarak toplayan bir sistem ile süt numuneleri toplandı. Sütler numuneleri alınırken bölüm 3.2.5.3'te belirtilen süt numune alma protokolüne göre hareket edildi ve süt numuneleri aynı gün içerisinde laboratuvara ulaştırılarak süt somatik hücresi ve bileşenlerine bakıldı. Cihazda süt numunelerine bakılmadan önce numuneler 2-8° C buzdolabında muhafaza edildi.

Deneme süresince önceden tahmin edilenin üstünde somatik hücre sayılarında hayvan bazında dalgalanma görüldü. Ve yaz aylarında deneme yapılarak sıcaklık stresi etkisiyle beklenen SHS'ndaki artış görülemedi. Ancak deneme devam ettirilerek aynı etkilere maruz kalan deney ve kontrol grubundaki farklılıklar gözlenmeye çalışıldı. 33 gün boyunca devam eden F11 formülasyonunun içirilmesi sonucunda haftalık SHS'ları kendi içinde non-parametrik Mann Whitney U testi ile değerlendirildi (Tablo 4-44). Ancak haftalık karşılaştırmaların hiçbirinde anlamlı bir farklılık görülemedi. Ancak Somatik hücreleri gösteren Şekil 4-55, Şekil 4-56 ve haftalık sağılan süt ortalamalarını gösteren Şekil 4-57 te F11 formülasyonunun içirilmeye başladığı günden itibaren 2 hafta içinde SHS'nın deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla düştüğü ve süt miktarında deney grubu lehine ≈ 1 litre arttığı görüldü. Denemenin sonlandığı 7. haftada ise SHS'nın deneme grubunda tekrar yükseldiği ve kontrol grubuna göre de arttığı ve süt miktarının da kontrole göre gerilediği görüldü.

Haftalık süt miktarları (L) ve % süt yağı ve proteinin haftalık olarak Mann Whitney U testi ile incelendiği sırasıyla Tablo 4-47, Tablo 4-45 ve Tablo 4-46'da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$). Süt proteini miktarlarının gösterildiği Şekil 4-54'te iki grup arasında haftalık değerlerde farklılık gözlenmedi. Ancak süt yağı miktarlarının gösterildiği Şekil 4-53'te istatistiksel farklılık olmasada süt yağı miktarlarının deney grubunda 2. haftada arttığı ve 6. haftaya kadar kontrol grubuna göre yüksek seyrettiği görüldü.

İn-vivo deneylerde takip edilen SHS, süt yağı, süt proteini, süt miktarlarını haftalık gösteren Şekil 4-51, 4-52, 4-53, 4-54, 4-55'te birinci hafta sonuçları deneme başlamadan önce grupların belirlenmesi için yapılan verileri belirtmektedir. İkinci hafta deneyin başlangıç haftasını 7nci hafta deneyin bitirildiği haftayı göstermektedir. Sekizinci, dokuzuncu ve onuncu hafta sonuçlarına ise deney ve kontrol grubunun

deneme bitirildikten sonra paragrafın başında belirtilen değerlerin nasıl seyredeceğini görmek için bakıldı.

Her iki grupta da yaz döneminde süt miktarı açısından azalış beklenen bir durumdu ancak SHS'ndaki düşüş tahmin edilenin dışında oldu.

Eldeki veriler ışığında uygulanan F11 formülasyonunun istatistiksel yönden incelendiğinde deney grubunda kontrol grubuna göre SHS ve süt miktarlarında anlamlı bir farklılık oluşturmada da SHS, süt miktarları ve süt yağının sadece formülasyon uygulandığı dönemde deney grubu lehine istenen sonuçları vermesi dikkate değerdir.

Elde edilen sonuçları desteklemesi açısından sığır sindirim sisteminde metan üreterek enerji kaybına yol ajan methanojen bakterilerinin in-vivo deneyde kullanılan dozda rumen hacmine göre metanojenleri baskılayacağı beklenmekteydi[32]. Denemede deney grubunun kontrol grubuna göre F11 formülasyonunun içirildiği dönemde süt miktarlarının artması enerji kaybının düşürülerek süt miktarı artışı ve süt yağına destek sağladığı düşünülebilir.

Yine mevcut literatür bilgisine göre kullanılan reçine asitlerinin (*S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkili) denemede kullanılan dozlarının rumen hacmine göre hesaplandığında patojenlere karşı etkili aralıkta bulunması [37] somatik hücrenin düşürülmesi konusunda etkinin formülasyondan kaynaklı görülme ihtimalini desteklemektedir.

Kolofan ve terebentin karışımının sığırlarda ilk kez denenmesi dışında aynı reçine asitlerini içeren bir formülasyonun broiler tavuklarında (etlik piliç) kullanıldığı bir yayın 2015 yılında yayınlanmıştır. Ve alınan sonuçlara göre önemli bir bağırsak patojeni olan *Clostridium perferingens*'e karşı etkili olduğu *C. perferingens* bulaştırılmış broiler tavuklarında önemli ölçüde ölüm oranlarını azalttığı ve kilo artışı yaptığı gösterilmiştir[50]. Bu sene yayınlanan bir makalede ise aynı reçine asitlerinin broiler mikrobiotasında bulunan yararlı mikropları en az etkileyerek patojenlere karşı etki ettiği gösterilmiştir[135]. Bu hayvan beslenmesi ve gelişmesi açısından çok önemlidir.

Kolofan ve terebentin karışımı ilerleyen yıllarda hayvan sağlığı açısından sıkça görmeye başlayacağımız bir etken madde olarak şimdiden dikkatleri üzerine çekmeye başladı.

Kolofan ve terebentin karışımlarına ait patent başvurusu ilk olarak Türkiye'den yapılmış olup (İsmail Tekdemir, Başvuru No: 2015/05473) 2015 yılında başka bir başvuru Finlandiya'dan yapılmıştır.

Doktora tezimin konusu olan kolofan ve terebentinin süt sığırlarında mastit hastalığını engellemek amacıyla kullanılması ve oral formülasyonunun geliştirilmesi akademik olarak ilk kez çalışıldı.

Sonuç olarak oral formülasyon uygulaması için dört farklı formülasyon şekli (boncuk, pelet, süspansiyon, rekonstitüe süspansiyon) ile ön formülasyon çalışmaları yapıldı. Denemesi yapılan formüllerden boncuk üretim zorluğu ve maliyeti, pelet KTK'nın fizikokimyasal özelliklerinden dolayı yapışma probleminden, süspansiyon ortam sıcaklığının yüksek olduğu senaryolarda bekleme sırasında çökme ve rekonstitüe olamama probleminden dolayı vazgeçildi ve rekonstitüe süspansiyon formülasyonu hazırlanmasına karar verildi. Karar verilen formülasyonun toz formuna elek analizi, yığın açısı ve akma süresi, %sıkışabilirlik, DSC analizi testleri uygulanırken, süspande

hale getirildikten sonra çökme hacmi, redispersiyon süresi ve çevirme sayısı testleri uygulanarak formülasyonun karakterizasyonu yapıldı. Hazırlanan formülasyonun $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%75 \pm 5$ rölatif nemde stabil kaldığı görüldü. Bu şekilde hayvanlara birim doz doğruluğundan emin olunan, stabil, ortam şartlarından en az etkilenecek yapışma ve topaklanma problemi en aza indirilen bir rekonstitüe süspansiyon formülasyonu geliştirildi. KTK'nın Tg sıcaklığının düşük olması sebebiyle uygulama esnasında formülasyonun bütünleşmesi rekonstitüe süspansiyon kullanılarak aşıldı.

Formülasyon sığırlarda içirme esnasında hızlı hareket edilmesi gerektiği için viskozitesi ve bundan etkilenen şişeden akma hızı ayarlandı. Bu şekilde in-vivo uygulama esnasında şişede formülasyonun kalması engellendi.

Hazırlanan formülasyon in vivo hayvan deneyi ile mastitin önlenmesi amacıyla kullanıldı. Mastitin önlenmesi için deney ve kontrol grubundaki somatik hücre sayıları takip edildi. Haftalık somatik hücre sayısı, süt miktarları, süt yağı, süt proteini Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı ancak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Ancak süt miktarı ve süt yağında uygulama başlangıcından itibaren deney grubu için pozitif yönde sırasıyla $\cong 1$ L/sığır, $\cong 0,3$ % artış ve somatik hücre sayısının haftalık bazda $\cong 40.000$ hücre/sığır düşüş görülmesi hayvan sayısının artırılarak istatistiksel anlamlılık oluşturulabileceği düşünüldü.

KTK karışımı hayvan sağlığı ve dolaylı olarak insan sağlığı için umut vaat eden bir etken maddedir. Bu etken maddenin hayvan sağlığından kullanımı ile ilgili çalışmaların çeşitlendirilerek etki mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Mushtaq, S., et al., *Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure*. Microb Pathog, 2018. **114**: p. 357-361.
2. *Contents*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2018. **34**(3): p. v-vii.
3. Ruegg, P.L. and C.S. Petersson-Wolfe, *Mastitis in Dairy Cows*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2018. **34**(3): p. ix-x.
4. Bradley, A.J., *Bovine mastitis: an evolving disease*. Veterinary Journal, 2002. **164**(2): p. 116-128.
5. W E Owens, S.C.N., *Medical Therapy Options*. Elsevier, 2002. **3**: p. 1746–1751.
6. Dungan, R.S., C.W. McKinney, and A.B. Leytem, *Tracking antibiotic resistance genes in soil irrigated with dairy wastewater*. Science of The Total Environment, 2018. **635**: p. 1477-1483.
7. Qiao, M., et al., *Review of antibiotic resistance in China and its environment*. Environment International, 2018. **110**: p. 160-172.
8. Sharma, N., *Alternative Approach to Control Intramammary Infection in Dairy Cows: A review*. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 2007. **2**(2): p. 50-62.
9. Cao, L.T., et al., *Efficacy of Nisin in Treatment of Clinical Mastitis in Lactating Dairy Cows*. Journal of Dairy Science, 2007. **90**(8): p. 3980-3985.
10. Ingvarsten, K.L., R.J. Dewhurst, and N.C. Friggens, *On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper*. Livestock Production Science, 2003. **83**(2): p. 277-308.
11. *Distribution map of Pinus brutia*
2009 [cited 2018 21.11]; Available from:
http://www.euforgen.org/fileadmin/templates/euforgen.org/upload/Documents/Maps/JPG/Pinus_brutia.jpg.
12. Campbell, M.C., J & Ducci, Fulvio & Pichot, Christian., *Forest Tree Breeding in Europe. Managing Forest Ecosystems*. 2013: Springer, Dordrecht. 229-265.
13. Akkemik, Ü., et al., *Some Changes in Taxonomy of Pines (Pinus L.) Native to Turkey*. Vol. 61. 2010. 63-78.
14. Mauri, A., et al., *Pinus halepensis and Pinus brutia in Europe: distribution, habitat, usage and threats*. 2016.
15. *Reçine eldesi*. 2018 [cited 2018 21.11]; Available from:
<https://www.ogm.gov.tr/SitePages/OGM/OGMHaberler.aspx?List=d48f9a06%2D6f97%2D48b9%2D9ba4%2D7b9dfae5e8dd&ID=17796&Web=6b9add1f%2D52c2%2D4e71%2D826c%2D3f6be57bbc5d>.
16. M., C.W., *Products of Resin Processing*. FORESTS AND FOREST PLANTS. **II**.
17. *Non wood forest product*, in *Encyclopedia of Forest Sciences*, J. Burley, Editor. 2004, Elsevier. p. 620-625.
18. da Silva Rodrigues-Corrêa, K.C., J.C. de Lima, and A.G. Fett-Neto, *Oleoresins from Pine: Production and Industrial Uses*, in *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*,

- K.G. Ramawat and J.-M. Mérillon, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 4037-4060.
19. Önal, S., *Bazı uyarıcı maddelerle kızılçam (Pinus brutia Ten.) ve karaçamalarda reçine üretimi*. Enstitiler Teknik Bülten Serileri,, 1995.
 20. İlhan DENİZ, Z.O.S., Mehmet ÖZ, Onur Tolga OKAN, Bilge Yılmaz, Mustafa PEKEL, *Ülkemizde Asit-Pasta Yöntemi ile Reçine (Oleoresin) Üretim Çalışmaları*, in *3rd International Non-wood Forest Products Symposium 8-10 May*. 2014: Kahramanmaraş, Turkey.
 21. Cabaret, T., et al., *Study of rosin softening point through thermal treatment for a better understanding of maritime pine exudation*. European Journal of Wood and Wood Products, 2018. **76**(5): p. 1453-1459.
 22. Becker, H. and L.E. Locascio, *Polymer microfluidic devices*. Talanta, 2002. **56**(2): p. 267-287.
 23. Aouachria, K. and N. Belhaneche-Bensemra, *Miscibility of PVC/PMMA blends by vicat softening temperature, viscometry, DSC and FTIR analysis*. Polymer Testing, 2006. **25**(8): p. 1101-1108.
 24. Mohammadi, M., et al., *The glass transition temperature of PMMA: A molecular dynamics study and comparison of various determination methods*. European Polymer Journal, 2017. **91**: p. 121-133.
 25. PHYSIK, M.-N.F.I.I.F. *Investigation of Polymers with Differential Scanning Calorimetry*. [cited 2019 03.04]; Available from: <https://polymerscience.physik.hu-berlin.de/docs/manuals/DSC.pdf>.
 26. Bhojvaid, P.P. and D.C. Chaudhari, *NON-WOOD PRODUCTS | Resins, Latex and Palm Oil*, in *Encyclopedia of Forest Sciences*, J. Burley, Editor. 2004, Elsevier: Oxford. p. 620-627.
 27. Fekih, N., et al., *Chemical composition and antibacterial activity of Pinus halepensis Miller growing in West Northern of Algeria*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2014. **4**(2): p. 97-103.
 28. Savluchinske-Feio, S., et al., *Antimicrobial activity of resin acid derivatives*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **72**(3): p. 430-436.
 29. Satil, F., S. Selvi, and R. Polat, *Ethnic uses of pine resin production from Pinus brutia by native people on the Kazdağ Mountain (Mt. Ida) in Western Turkey*. Vol. SCI. 2011. 1059-1063.
 30. Dıǧrak, M., A. İlçim, and M. Hakkı Alma, *Antimicrobial activities of several parts of Pinus brutia, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia, Cedrus libani and Pinus nigra*. Phytotherapy Research, 1999. **13**(7): p. 584-587.
 31. Patra, A., et al., *Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances*. Journal of animal science and biotechnology, 2017. **8**: p. 13-13.
 32. Sierra-Alvarez, R. and G. Lettinga, *The methanogenic toxicity of wood resin constituents*. Biological Wastes, 1990. **33**(3): p. 211-226.
 33. Tumen, I. and M. Reunanen, *A Comparative Study on Turpentine Oils of Oleoresins of Pinus sylvestris L. from Three Districts of Denizli*. Vol. 4. 2010.
 34. Ulukanli, Z., et al., *Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean Pinus brutia and Pinus pinea resin essential oils*. Vol. 12. 2014.
 35. Xi, S. and Y. Gong, *Essentials of Chinese Materia Medica and Medical Formulas*. 2017.

36. Söderberg, T.A., et al., *Antibacterial Activity of Rosin and Resin Acids in Vitro*. Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery, 1990. **24**(3): p. 199-205.
37. Roy, K., et al., *In vitro inhibition studies of natural resin acids to Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus and Escherichia coli O149*. Journal of Applied Animal Nutrition, 2018. **6**: p. e2.
38. Savluchinske Feio, S., et al., *Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives*. Vol. 35. 1999. 201-6.
39. Gigante, B., Silva, Ana M. Marcelo-Curto, Maria João, Feio, Sónia Savluschinske, Roseiro, José, Reis, Lucinda V., *Structural Effects on the Bioactivity of Dehydroabietic Acid Derivatives*. Planta Med, 2002. **68**(08): p. 680-684.
40. Veneziani, R.C.S., et al., *Chapter 4 - Antibacterial Potential of Diterpenoids*, in *Studies in Natural Products Chemistry*, R. Atta ur, Editor. 2017, Elsevier. p. 109-139.
41. Park, J.Y., et al., *Abietic acid isolated from pine resin (Resina Pini) enhances angiogenesis in HUVECs and accelerates cutaneous wound healing in mice*. Journal of Ethnopharmacology, 2017. **203**: p. 279-287.
42. San Feliciano, A., et al., *Abietane acids: sources, biological activities, and therapeutic uses*. Planta Med, 1993. **59**(6): p. 485-90.
43. González-Peñas, E., et al., *Simultaneous GC determination of turpentine, camphor, menthol and methyl salicylate in a topical analgesic formulation (Dologex®)*. Chromatographia, 2000. **52**(3): p. 245-248.
44. Behtash Oskuie, A., S.A. Nasrollahi, and S. Nafisi, *Design, synthesis of novel vesicular systems using turpentine as a skin permeation enhancer*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018. **43**: p. 327-332.
45. Smith, E., et al., *Isopimaric Acid from Pinus nigra shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of Staphylococcus aureus*. Phytother Res, 2005. **19**(6): p. 538-42.
46. Savluchinske Feio, S., et al., *Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives*. Journal of Microbiological Methods, 1999. **35**(3): p. 201-206.
47. Gigante, B., et al., *Catechols from abietic acid: synthesis and evaluation as bioactive compounds*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003. **11**(8): p. 1631-1638.
48. Tanaka, R., H. Tokuda, and Y. Ezaki, *Cancer chemopreventive activity of "rosin" constituents of Pinus spez. and their derivatives in two-stage mouse skin carcinogenesis test*. Phytomedicine, 2008. **15**(11): p. 985-992.
49. Mercier, B., J. Prost, and M. Prost, *The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): A review*. Vol. 22. 2009. 331-42.
50. Kettunen, H., et al., *Natural resin acid –enriched composition as a modulator of intestinal microbiota and performance enhancer in broiler chicken*. Journal of Applied Animal Nutrition, 2015. **3**: p. e2.
51. Moran, J., *Tropical Dairy Farming: Feeding Management for Small Holder Dairy Farmers in the Humid Tropics*. 2005: Land Links.
52. Additives, J.F.W.E.C.o.F. *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. in *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. 2001. Rome, Italy: WHO.
53. Vulava, V.M., *Turpentine*, in *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*, P. Wexler, Editor. 2005, Elsevier: New York. p. 394-397.
54. Product, C.f.V.M., *Terebinthinae Aetheroleum Rectificatum*. 1998.

55. Saeidnia, S., *Turpentine*, in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, P. Wexler, Editor. 2014, Academic Press: Oxford. p. 860-865.
56. R, G. *Rosin-Review and Summary of Human Health and Ecological Toxicity Data*. [cited 2019 20.06]; 5/1/2006:[Available from: <https://www.pinechemicals.org/page/ID600TOXROSINRE/ROSIN---REVIEW-AND-SUMMARY-OF-HUMAN-HEALTH-AND-ECOLOGICAL-TOXICITY-DAT.htm>.
57. Nickerson, S.C. and R.M. Akers, *MAMMARY GLAND | Anatomy*, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, J.W. Fuquay, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 328-337.
58. Hurley, W.L. and J.J. Looor, *Mammary Gland | Growth, Development and Involution*, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, J.W. Fuquay, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 338-345.
59. Moreira, M.A.S., et al., *Chapter 11 - Infectious Diseases in Dairy Cattle*, in *Raw Milk*, L.A. Nero and A.F. De Carvalho, Editors. 2019, Academic Press. p. 235-258.
60. Adkins, P.R.F. and J.R. Middleton, *Methods for Diagnosing Mastitis*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2018. **34**(3): p. 479-491.
61. Watts, J.L., *34 - Bovine Mastitis*, in *Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology (Fifth Edition)*, G.R. Carter and J.R. Cole, Editors. 1990, Academic Press: San Diego. p. 469-478.
62. Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau, *Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds*. Vet. Res., 2003. **34**(5): p. 475-491.
63. Koç, A., *A study of somatic cell counts in the milk of Holstein-Friesian cows managed in mediterranean climatic conditions*. Vol. 32. 2008. 13-18.
64. Sordillo, L.M. and S.L. Aitken, *Mammary Resistance Mechanisms | Endogenous*, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, J.W. Fuquay, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 386-391.
65. Dohoo, I.R. and A.H. Meek, *Somatic cell counts in bovine milk*. Can Vet J, 1982. **23**(4): p. 119-25.
66. Harmon, R.J., *Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts I*. Journal of Dairy Science, 1994. **77**(7): p. 2103-2112.
67. Sharma, N., N. Singh, and M. Bhadwal, *Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview*. Vol. 24. 2011.
68. Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S., *Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2011. **24**(3): p. 429-438.
69. Ananda Baskaran, S., et al., *Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro*. J Dairy Sci, 2009. **92**(4): p. 1423-9.
70. Ryan, M.P., et al., *The Natural Food Grade Inhibitor, Lacticin 3147, Reduced the Incidence of Mastitis After Experimental Challenge with Streptococcus dysgalactiae in Nonlactating Dairy Cows*. Vol. 82. 2000. 2625-31.
71. Burmańczuk, A., et al., *Quercetin decrease somatic cells count in mastitis of dairy cows*. Research in Veterinary Science, 2018. **117**: p. 255-259.
72. Nickerson, S.C., et al., *Effects of an immunomodulatory feed additive on intramammary infection prevalence and somatic cell counts in a dairy herd*

- experiencing major health issues*. Research in Veterinary Science, 2019. **124**: p. 186-190.
73. McDougall, S., et al., *A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies*. Veterinary Microbiology, 2009. **134**(1): p. 177-185.
 74. Ismail, Z.B., *Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application*. Veterinary world, 2017. **10**(9): p. 1057-1062.
 75. Stevens, M., S. Piepers, and S. De Vliegher, *Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium*. Journal of Dairy Science, 2016. **99**(4): p. 2896-2903.
 76. *Farmasötik Teknoloji -Temel Konular ve Dozaj Şekilleri-*, G. A., Editor. 2004: İstanbul. p. 423-433.
 77. Beringer, P., *Remington : the science and practice of pharmacy*. 2006, Pharmaceutical Press: London. p. 702-719.
 78. *Particle-size reduction*, in *Aulton's pharmaceuticals: The design and manufacture of medicines.*, M.E. Aulton, Editor. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 169-170.
 79. [cited 2019 28.04]; Available from: <https://www.pharmapproach.com/cutter-mill/>.
 80. Pitroda, D.J., A. H. Memon, and R. Patel, *Design for Recovery of Precious and Base Metals from E-Waste Using Electrowinning Process*. 2017.
 81. Aulton, M.E., *Size reduction range for impact methods*, in *Aulton's pharmaceuticals: The design and manufacture of medicines*. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 170.
 82. Raja, D., et al., *Concepts and Techniques of Pharmaceutical Powder Mixing Process: A Current Update*. Vol. 2. 2009.
 83. *Mixing*, in *Aulton's pharmaceuticals: The design and manufacture of medicines.*, M.E. Aulton, Editor. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 181-196.
 84. Aulton, M.E., *Mixing of Powder*, in *Aulton's pharmaceuticals: The design and manufacture of medicines*. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 181-194.
 85. *Ribbon mixer*, in *Aulton's pharmaceuticals: The design and manufacture of medicines.*, M.E. Aulton, Editor. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 193.
 86. *V type mixer*. [cited 2019 01.05]; Available from: <http://www.tokujuk.co.jp/english/products/mixer/V/post-3.html>.
 87. *Method of analysis*, in *European Pharmacopoeia*, H. Jan, Editor. 2009.
 88. Beringer, P., *Remington : the science and practice of pharmacy*. 2006, Pharmaceutical Press: London. p. 319-338.
 89. *Pharmaceutical applications of suspension*, in *Aulton's pharmaceuticals: The design and manufacture of medicines.*, M.E. Aulton, Editor. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 336-342.
 90. Acartürk F., A.İ., Çelebi N., Değim T., Değim Z., Doğanay T., Takka S., Tırnaksız F., *Modern Farmasötik Teknoloji*. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını. Vol. 1. 2009. 302.
 91. Moghimipour, E., et al., *Influence of flocculating agents and structural vehicles on the physical stability and rheological behavior of nitrofurantoin suspension*. Jundishapur journal of natural pharmaceutical products, 2014. **9**(2): p. e12716-e12716.

92. *Metil Selüloz molekül şekli*. [cited 2019 09.06]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/methylcellulose12345900467511?lang=en®ion=TR>.
93. Aulton, M.E., *Aulton's pharmaceuticals: The design and manufacture of medicines*. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 334-342.
94. *Farmasötik Teknoloji -Temel Konular ve Dozaj Şekilleri-*. 2004, İstanbul.
95. Öner, F., *Süspansiyonlar*, in *Farmasötik Teknoloji Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, A. Z. Gürsoy, Editor. 2004, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği: İstanbul.
96. Beringer, P., *Coarse Dispersion*, in *Remington : the science and practice of pharmacy*. 2006, Pharmaceutical Press: London. p. 319-337.
97. Haznedar, S. and B. Dortunç, *Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **269**(1): p. 131-140.
98. Larosa, C., et al., *Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **115**: p. 900-906.
99. Takka S., A.F., *Aljinik Asit ve Tuzlarının Kullanımı*. FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi, 1998. **23**(1): p. 17-27.
100. Sanchez-Ballester, N.M., et al., *Flexible heteroionic calcium-magnesium alginate beads for controlled drug release*. Carbohydrate Polymers, 2019. **207**: p. 224-229.
101. Mladenovska, K., et al., *5-ASA loaded chitosan–Ca–alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **345**(1): p. 59-69.
102. Ching, A.L., et al., *Impact of cross-linker on alginate matrix integrity and drug release*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **355**(1): p. 259-268.
103. Maestrelli, F., et al., *Calcium alginate microspheres containing metformin hydrochloride niosomes and chitosomes aimed for oral therapy of type 2 diabetes mellitus*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. **530**(1): p. 430-439.
104. Torre, M.L., et al., *Formulation and Characterization of Calcium Alginate Beads Containing Ampicillin*. Pharmaceutical Development and Technology, 1998. **3**(2): p. 193-198.
105. Narra, K., et al., *Effect of formulation variables on rifampicin loaded alginate beads*. Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR, 2012. **11**(3): p. 715-721.
106. Xu, W., et al., *Encapsulation and release behavior of curcumin based on nanoemulsions-filled alginate hydrogel beads*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **134**: p. 210-215.
107. Muley, S., T. Nandgude, and S. Poddar, *Extrusion–spheronization a promising pelletization technique: In-depth review*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. **11**(6): p. 684-699.
108. Steckel, H. and F. Mindermann-Nogly, *Production of chitosan pellets by extrusion/spheronization*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(1): p. 107-114.
109. Sun, Z., H. Zhao, and Z. Liu, *Preparation of 1-deoxynojirimycin controlled release matrix pellets of capsules and evaluation in vitro-in vivo to enhance*

- bioavailability. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019. **52**: p. 477-487.
110. Gurram, R.K., S. Gandra, and N.R. Shastri, *Design and optimization of disintegrating pellets of MCC by non-aqueous extrusion process using statistical tools*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016. **84**: p. 146-156.
 111. Zoubari, G., R. Ali, and A. Dashevskiy, *Water-soluble and -insoluble polymers as binders for pellet preparation by extrusion/spheronization*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019. **49**: p. 1-5.
 112. Taneja, N., et al., *Chapter 16 - Package Types for Different Dosage Forms*, in *Dosage Form Design Parameters*, R.K. Tekade, Editor. 2018, Academic Press. p. 553-590.
 113. Campbell, G.A. and E. Vallejo, *Primary Packaging Considerations in Developing Medicines for Children: Oral Liquid and Powder for Constitution*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015. **104**(1): p. 52-62.
 114. *Rx MedaiPharma*, L. Üstünes, Editor. 2019.
 115. Amarji, B., et al., *Chapter 15 - Package Development of Pharmaceutical Products: Aspects of Packaging Materials Used for Pharmaceutical Products*, in *Dosage Form Design Parameters*, R.K. Tekade, Editor. 2018, Academic Press. p. 521-552.
 116. Aulton, M.E., *Packs and Packaging*, in *Aulton's pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 563.
 117. Marsh, K. and B. Bugusu, *Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues*. *Journal of Food Science*, 2007. **72**(3): p. R39-R55.
 118. *Doypack Torba*. [cited 2019 12.05]; Available from: http://www.torbadunyasi.com/doypack_torba.php.
 119. 09.06.2019]; Available from: <https://www.retsch.com.tr/tr/ueruenler/eleme/elek-sallayici/>.
 120. Simbirtsev, A.S., et al., *Pine resin and biopin ointment: effects of water-soluble fractions on cytokine production by peripheral blood neutrophils*. *Bull Exp Biol Med*, 2002. **134**(2): p. 151-5.
 121. *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)*. 2003 [cited 2019 09.07]; Available from: <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>.
 122. *Milk meter*. [cited 2019 15.06.]; Available from: <https://www.icar.org/index.php/certifications/icar-certifications-for-milk-meters-for-cow-sheep-goats/certified-milk-meters/>.
 123. Ruegg, P.L., *A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention*. *Journal of Dairy Science*, 2017. **100**(12): p. 10381-10397.
 124. Oliver, S., G. Pighetti, and R. Almeida, *Mastitis Pathogens| Environmental Pathogens*. 2011.
 125. Jain, N.C., *Common Mammary Pathogens and Factors in Infection and Mastitis*. *Journal of Dairy Science*, 1979. **62**(1): p. 128-134.
 126. Paulrud, C.O., *Basic Concepts of the Bovine Teat Canal*. *Veterinary Research Communications*, 2005. **29**(3): p. 215-245.
 127. Sordillo, L., *Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility*. Vol. 98. 2005. 89-99.
 128. Ruegg, P.L., *Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2018. **34**(3): p. 413-425.

129. Pyörälä, S., *Treatment of mastitis during lactation*. Irish Veterinary Journal, 2009. **62**(4): p. S40.
130. Oliver, S.P., et al., *Prevention of bovine mastitis by a postmilking teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide in a soluble polymer gel*. J Dairy Sci, 1989. **72**(11): p. 3091-7.
131. Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau, *Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds*. Vet Res, 2003. **34**(5): p. 475-91.
132. Alkan, H., Baştan, A. , Salar, S., Özdal, M., Kaymaz, M. , *Kuru döneme çıkarken enfekte ve sağlıklı meme loblarında California Mastitis Test ve somatik hücre sayısı ile bakteriyolojik muayene sonuçlarının karşılaştırılması*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 2014. **61**: p. 179-183.
133. Schären, M., et al., *Interrelations between the rumen microbiota and production, behavioral, rumen fermentation, metabolic, and immunological attributes of dairy cows*. Journal of Dairy Science, 2018. **101**(5): p. 4615-4637.
134. Olchow, T.W.J., M. Soust, and J. Alawneh, *The effect of a commercial probiotic product on the milk quality of dairy cows*. Journal of Dairy Science, 2019. **102**(3): p. 2188-2195.
135. Aguirre, M., et al., *In-feed resin acids reduce matrix metalloproteinase activity in the ileal mucosa of healthy broilers without inducing major effects on the gut microbiota*. Veterinary research, 2019. **50**(1): p. 15-15.

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY ERGİNER
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Başvuru : 23.12.2016

Toplantı Tarihi : 29.12.2016

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Eczacı Ozan TEKDEMİR**'e ait "Süt sağırılarında sıklıkla görülen mastitin önlenmesi için kolofon ve terebentin içeren yenilikçi, oral dozaj formlarının hazırlanması ve in-vivo, in-vitro değerlendirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sığır
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	30
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	01.02.2017/ 01.06.2018	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yrd. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak. Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar -İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail: hadyek@istanbul.edu.tr

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SÜT SIĞIRLARINDA GÖRÜLEN MASTİTİN ÖNLENMESİ İÇİN KOLOFAN VE TEREVENTİN İÇEREN YENİLİKÇİ, ORAL DOZAJ FORMLARININ HAZIRLANMASI VE İN VİVO-İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 2	% 1	% 0	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
3	www.istanbulmanda.org İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.papersesh.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	ikee.lib.auth.gr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Ataturk Universitesi	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	OZAN	Soyadı	TEKDEMİR
Doğ.Yeri	SAKARYA	Doğ.Tar.	11.07.1990
Uyruğu	TC	TC Kim No	43006708020
Email	ozantekdemir@gmail.com	Tel	0545 370 71 69

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ ECZCALIK FAKÜLTESİ	2013
Lise	SAKARYA ANADOLU LİSESİ	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Formülasyon Uzmanı	TOPRAK İLAÇ SANAYİ/SAKARYA	2013-2013
2.	Pazarlama	UĞUR ECZA DEPOSU	2013-2015
3.	Mesul müdür/sahip	NAR ECZANESİ	2015-2017
4.	Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2017-...

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	63,75	Yökdil 82,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Adobe Photoshop CS6	Orta
Final Cut Pro	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Ozan TEKDEMİR, Sevinç ŞAHBAZ, Timuçin UĞURLU “Formulation of a bilayer tablet containing amlodipine besylate and captopril for antihypertensive therapy” International Pharmaceutical Technology Symposium, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey (Poster)

Ozan TEKDEMİR, Sevinç ŞAHBAZ, Timuçin UĞURLU “Formulation and Evaluation of Orally Disintegrating Tablet (ODT) Formulations Containing Amlodipine Besylate” International Conference on Pharmaceutical Sciences, 14-16 October 2019, İzmir, Turkey (Poster)

Ozan Tekdemir, Yıldız ÖZSOY, İsmail ABAŞ “Evaluation of Oral Formulations of Turpentine and Colophony for Preventing Mastitis in Dairy Cattle ” International Pharmaceutical Technology Symposium, 14-16 October 2019, İzmir, Turkey (Poster)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

