



**T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜPERKRİTİK AKIŞKAN TEKNOLOJİSİYLE İYONİK
NANOLİPOZOMAL SİSTEMLERİN SENTEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Gökhan YILDIZ
(201492121080)**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Uğur SALGIN

SİVAS

ARALIK 2018

Gökhan YILDIZ'ın hazırladığı ve “**Süperkritik Akışkan Teknolojisiyle İyonik Nanolipozomal Sistemlerin Sentezi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Uğur SALGIN**

Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof.Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL**

Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil ÇETİNKAYA

Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. İsmail ÇELİK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından M-640 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir



Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Gökhan YILDIZ, 2018



Çalışma sırasında bana destek olan aileme ve tüm arkadaşlarıma...

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

25.12.2018

Gökhan YILDIZ

ÖZET

SÜPERKRİTİK AKIŞKAN TEKNOLOJİSİYLE İYONİK NANOLİPOZOMAL SİSTEMLERİN SENTEZİ

Gökhan YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Uğur SALGIN

2018, 87+xvi sayfa

Bu çalışmada, laboratuvar ölçekli sistemlerde anyonik ve katyonik lipozomal sistemlerin tasarımı süperkritik çözeltilerin ani genişmesi (RESS) prosesi ve bir sıvı çözücü içinde süperkritik akışkanın ani genişmesi (RESOLVE) prosesi gerçekleştirildi. Lipozomların fosfolipit çift tabakası L- α - fosfatidilkolin ve kolesterol bileşenlerinden oluşturuldu. Anyonik lipozomların tasarımında 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfo-rac-(1-glisero) sodyum tuzu (DPPG) kullanılırken, katyonik lipozomların tasarımında dimetildioktadesilamonyum bromür (DDAB) kullanıldı. Lipozomların hidrodinamik boyutuna işletme basıncı ve iyonik madde derişiminin etkisi sırasıyla; 10-30 MPa ve 1.25-5 mg/mL koşullarında incelendi. Bunun yanı sıra, depolama süresi boyunca lipozomların hidrodinamik boyut dağılımları ve yüzey yüklerindeki değişimler incelendi. Lipozomların hidrodinamik boyut dağılımları ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer Nano ZS analiz sisteminde gerçekleştirildi. RESS prosesi ile üretilen anyonik ve katyonik lipozomal sistemlerin genel olarak daha monodispers boyut dağılıma sahip olduğu ve ayrıca depolama süresince yüksek kararlılığa sahip olduğu belirlendi. Ancak RESOLVE prosesi ile üretilen anyonik ve katyonik lipozomal sistemlerin genel olarak hidrodinamik boyut dağılımını koruyamadığı ve yüksek kararlılığa sahip olmadığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Lipozom, Süperkritik CO₂ Teknolojisi, RESS, RESOLVE.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF IONONIC NANOLIPOSOMAL SYSTEMS WITH SUPERCRITICAL FLUID TECHNOLOGY

Gökhan YILDIZ

Master of Science Thesis,

Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Uğur SALGIN

2018, 87+xvi pages

In this study, the design of anionic and cationic liposomal systems at the laboratory-scale systems was carried out in the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) process and also in the rapid expansion of supercritical solution into a liquid solvent (RESOLVE) process. The phospholipid double layer of liposomes was composed of L- α -phosphatidylcholine and cholesterol components. 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) sodium salt (DPPG) was used in the design of the anionic liposomes, whereas dimethyltiododecylammonium bromide (DDAB) was used in the design of the cationic liposomes. The effect of the operating pressure and ionic substance concentration on the hydrodynamic dimension of liposomes were as follows; 10-30 MPa and 1.25-5 mg/mL. In addition, hydrodynamic size distributions of liposomes and changes of its surface charges were investigated during storage period. Hydrodynamic size distributions and zeta potential analyzes of liposomes were performed in Zetasizer Nano ZS system. The anionic and cationic liposomal systems produced by the RESS process were generally more monodisperse in size distribution and also had higher stability during storage. However, the anionic and cationic liposomal systems produced by the RESOLVE process were generally unable to maintain hydrodynamic size distribution and did not have high stability.

Key Words: Liposome, supercritical CO₂ technology, RESS, RESOLVE.

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, deneyim, destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Uğur SALGIN'a ve Sayın Prof.Dr. Sema SALGIN'a çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmaları boyunca destek ve tecrübelerini her zaman paylaşan Sayın Dr. Derya DİNÇYÜREK EKİCİ'ye ve Dr. Nagihan TUZLALI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen değerli aileme, birlikte aynı çalışma ortamını paylaştığım tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1 Süperkritik Akışkan Teknolojisi.....	1
1.1.1 Süperkritik akışkanların taşınım özellikleri.....	2
1.1.2 Süperkritik akışkan seçimi.....	2
1.1.3 Süperkritik CO ₂ ve özellikleri.....	4
1.1.4 Süperkritik CO ₂ teknolojisi uygulamaları.....	5
1.2 Lipozomlar.....	6
1.2.1 Lipitler.....	7
1.2.2 Lipozomların sınıflandırılması.....	10
1.2.3 Lipozomların hazırlanma yöntemleri.....	13
1.2.3.1 Lipozomların mekanik hazırlama yöntemleri.....	13
1.2.3.2 Lipozomların çözücü dispersiyon yöntemleriyle hazırlanması.....	16
1.2.3.3 Lipozomların hazırlanmasında deterjan ile çözündürme yöntemi.....	17
1.3 Lipozomal Sistemlerin Süperkritik Akışkan Teknolojisiyle Üretim Prosesleri.....	17
2. MATERYALVE YÖNTEM	28
2.1 Materyal.....	28
2.2 Lipozomal Sistemlerin Üretimi.....	28
2.2.1 RESS prosesi ile lipozomal sistemlerin üretimi.....	31
2.2.2 RESOLVE prosesi ile lipozomal sistemlerin üretimi.....	33
2.3 Lipozomal Sistemlerin Boyut Dağılımı ve Zeta Potansiyellerinin Analizi.....	34
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	39
3.1 RESS Prosesiyle Anyonik ve Katyonik Lipozomların Tasarımında Boyut Dağılımına İşletme Basıncının Etkisi.....	39
3.1.1 Anyonik lipozomal sistemler.....	39
3.1.2 Katyonik lipozomal sistemler.....	41
3.2 RESOLVE Prosesiyle Anyonik ve Katyonik Lipozomaların Tasarımında Boyut Dağılımına İşletme Basıncının Etkisi.....	43
3.2.1 Anyonik lipozomal sistemler.....	43
3.2.2 Katyonik lipozomal sistemler.....	45
3.3 Lipozomaların Tasarımında DPPG Derişiminin Boyut Dağılıma Etkisi.....	47

3.3.1	RESS prosesi.....	47
3.3.2	RESOLVE prosesi.....	49
3.4	Lipozomaların Tasarımında DDAB Derişiminin Boyut Dağılıma Etkisi.....	51
3.4.1	RESS prosesi.....	51
3.4.2	RESOLVE prosesi.....	53
3.5	Lipozomal Sistemlerin Depolama Kararlılıkları.....	55
3.5.1	RESS prosesiyle üretilen anyonik lipozomların depolama kararlılıkları.....	55
3.5.2	RESS prosesiyle üretilen katyonik lipozomların depolama kararlılıkları.....	60
3.5.3	RESOLVE prosesiyle üretilen anyonik lipozomların depolama kararlılıkları.....	65
3.5.4	RESOLVE prosesiyle üretilen katyonik lipozomların depolama kararlılıkları.....	69
3.6	Depolama Süreci ile Lipozomal Sistemlerin Yüzey Yüklerinin Değişimi.....	75
3.6.1	RESS prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler.....	75
3.6.2	RESS prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler..	76
3.6.3	RESOLVE prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler.....	77
3.6.4	RESOLVE prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler.....	78
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	79
	KAYNAKLAR	85
	ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1	Saf CO ₂ için basınç-sıcaklık faz diyagramı..... 1
Şekil 1.2	CO ₂ 'nin artan sıcaklık ve basınç ile süperkritik akışkan hali alması..... 4
Şekil 1.3	Lipozomun genel yapısı..... 6
Şekil 1.4	Fosfolipitlerin su varlığında kendiliğinden lipozom oluşturması. 7
Şekil 1.5	Fosfolipit yapısı..... 8
Şekil 1.6	Fosfatidilkolin genel yapısı..... 9
Şekil 1.7	Kolesterolün kimyasal yapısı..... 10
Şekil 1.8	Çift tabaka sayısına göre lipozomların şematik gösterimi: (a) MLV yapısı ve (b) SUV ya da LUV yapıları..... 11
Şekil 2.1	Modifiye RESS ve RESOLVE proseslerinin akım şeması (BPV: Geri basınç azalması kontrol vanası, CU: Kontrol ünitesi HE: Isı değitirici, HPR: Yüksek basınçlı reaktör, HP-SP: Yüksek basınç şırınga pompası, PS: Basınç sensörü, TS: Sıcaklık sensörü, V: İğne uçlu vana) 29
Şekil 2.2	Malvern Zetasizer Nano ZS partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm cihazı..... 34
Şekil 2.3	Negatif yüklü partikül ile yığın arasındaki iyon dağılımı..... 35
Şekil 3.1	RESS prosesi ile anyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi: (a) C _{DPPG} =1.25 mg/mL, (b) C _{DPPG} =2.5 mg/mL c) C _{DPPG} =5 mg/mL..... 40
Şekil 3.2	RESS prosesi ile katyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi: (a) C _{DDAB} =1.25 mg/mL, (b) C _{DDAB} =2.5 mg/mL (c) C _{DDAB} =5 mg/mL..... 42
Şekil 3.3	RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi: (a) C _{DPPG} =1.25 mg/mL, (b) C _{DPPG} =2.5 mg/mL (c) C _{DPPG} =5 mg/mL..... 44
Şekil 3.4	RESOLVE prosesi ile katyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi: (a) C _{DDAB} =1.25 mg/mL, (b) C _{DDAB} =2.5 mg/mL (c) C _{DDAB} =5 mg/mL..... 46
Şekil 3.5	RESS prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DPPG derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa..... 48
Şekil 3.6	RESOLVE prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DPPG derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa..... 50
Şekil 3.7	RESS prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DDAB derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa..... 52
Şekil 3.8	RESOLVE prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DDAB derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa..... 54
Şekil 3.9	RESS prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) C _{DPPG} =1.25 mg/mL, (b) C _{DPPG} =2.5 mg/mL, (c) C _{DPPG} =5 mg/mL..... 56

Şekil 3.10	RESS prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.....	58
Şekil 3.11	RESS prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.....	59
Şekil 3.12	RESS prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.....	61
Şekil 3.13	RESS prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.....	62
Şekil 3.14	RESS prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL..	64
Şekil 3.15	RESOLVE prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.....	66
Şekil 3.16	RESOLVE prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.....	67
Şekil 3.17	RESOLVE prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.....	68
Şekil 3.18	RESOLVE prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.....	71
Şekil 3.19	RESOLVE prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.....	72
Şekil 3.20	RESOLVE prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 Gaz, SCF ve sıvıların bazı taşınım karakteristikleri.....	2
Çizelge 1.2 Bazı süperkritik akışkanların kritik sıcaklık, basınç ve yoğunlukları.....	3
Çizelge 1.3 Boyutlarına göre lipozomların sınıflandırılması.....	11
Çizelge 1.4 Lipozomların kullanılan lipitlerin yüklerine göre sınıflandırılması.....	12
Çizelge 1.5 Lipozomal sistemlerin SCCO ₂ ortamında üretim prosesleri.....	20
Çizelge 2.1 RESS ve RESOLVE prosesi işletme parametreleri ve koşulları	31
Çizelge 2.2 RESS prosesi ile anyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi.....	32
Çizelge 2.3 RESS prosesi ile anyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi.....	32
Çizelge 2.4 RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi.....	33
Çizelge 2.5 RESOLVE prosesi ile katyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi.....	33
Çizelge 3.1 RESS prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler.....	75
Çizelge 3.2 RESS prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler.....	76
Çizelge 3.3 RESOLVE prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler.....	77
Çizelge 3.4 RESOLVE prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler.....	78

SİMGELER DİZİNİ

C_i	İyon derişimi, kmol/m ³
C_{DPPG}	1,2-Dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfo-rac- (1-gliserol) sodyum tuzu kütle derişimi, kg/m ³
C_{DDAB}	Dimetildioktadesilamonyum bromür kütle derişimi, kg/m ³
D	Difüzyon katsayısı, m ² /s
$d(H)$	Hidrodinamik yarıçap ya da boyut, m
D_H	Lipozomal sistemlerin hidrodinamik çapı, m
e	Elektronik yük, 1.6022x10 ⁻¹⁹ C
$f(\kappa a)$	Henry fonksiyonu
I	İyonik gerilim, kmol/m ³
k_B	Boltzmann sabiti, 1.38x10 ⁻²³ J/ K
M_w	Molekül kütlesi, kg/kmol
N	Avogadro sayısı, 6.02x10 ²³
T	Mutlak sıcaklık, K
T_c	Kritik sıcaklık, K
P	Mutlak basınç, K
P_c	Kritik basınç, Pa
$V_{\text{kloroform}}$	Kloroform hacmi, m ³
V_{metanol}	Metanol hacmi, m ³
V_{PBS}	Tampon hacmi, m ³
z_i	İyonun yük değeri
ϵ	Ortamın dielektrik sabiti, 78.5
ϵ_0	Boşluğun geçirgenliği, 8.854x10 ⁻¹² C/Vm
ϵ_r	Sıvının bağıl geçirgenliği veya dielektrik sabiti, 78.5
η	Viskozite, Pas
μ_E	Elektroforetik hareketlilik, 8.854x10 ⁻¹² F/m ¹
ρ	Yoğunluk, kg/m ³
ρ_c	Kritik yoğunluk, kg/m ³
ζ	Zeta potansiyeli, V

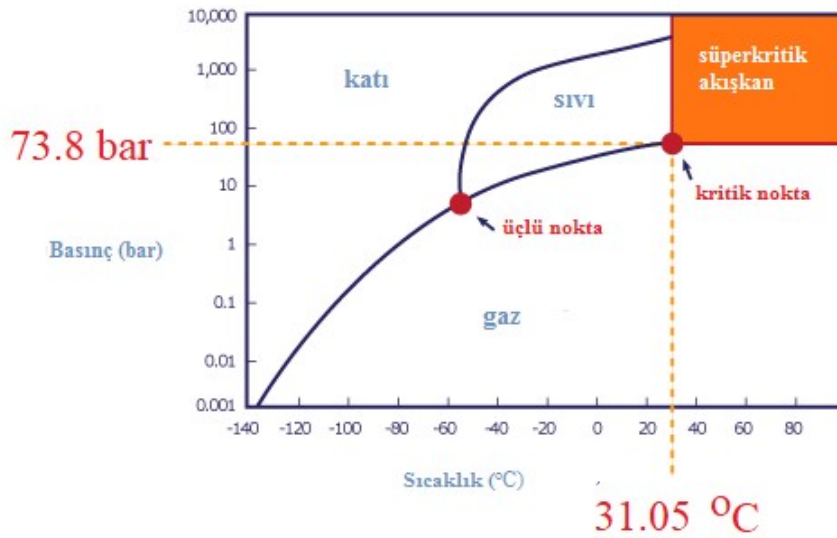
KISALTMALAR DİZİNİ

ASES	: Aerosol Çözücü Ekstraksiyon Sistemi Prosesi
BPV	: Geri Basınç Azalması Kontrol Vanası
CAS	: Sürekli Antiçözücü Prosesi
CHOL	: Kloroform
CU	: Kontrol Ünitesi
DDAB	: Dimetildioktadesilamoniyum bromür
DESAM	: Sulu Ortam İçinde Genleştirilmiş Çözeltinin Basıncın İndirgenmesi Prosesi
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DOPC	: Dioleoilfosfatidilkolin
DPPC	: Dipalmitoilfosfatidilkolin
DPPG	: 1,2-Dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfo-rac- (1-gliserol)sodyum tuzu
HE	: Isı Değiştirici
HPR	: Yüksek Basınç Tank Reaktör
HP-SP	: Yüksek Basınç Şırınga Pompası
HSPC	: Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin
GAS	: Gaz Anti-Çözücü Prosesi
LUV	: Büyük Tek Tabakalı Lipozom
MLV	: Çok Tabakalı Lipozom
PALS	: Faz Analizi Işık Saçılımı
PBS	: Sodyum Fosfat Tamponu
PC	: Fosfatidilkolin
PE	: Fosfatidiletanolamin
PEG	: Polietilen Glikol
PS	: Basınç Sensörü
RESS	: Süperkritik Çözeltilerin Ani Genleşmesi Prosesi
RESOLVE	: Sıvı Çözücü İçinde Süperkritik Akışkanın Ani Genleşmesi Prosesi
SAS	: Süperkritik Anti-Çözücü Prosesi
SCF	: Süperkritik Akışkan
SCCO₂	: Süperkritik CO ₂
SCRPE	: Süperkritik Ters Faz Evaporasyon Prosesi
SEDS	: Süperkritik Akışkanlarla Dağılımı Yükseltilmiş Çözelti Prosesi
SFE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
SUV	: Küçük Tek Tabakalı Lipozomlar
TS	: Sıcaklık Sensörü
V	: İğne Uçlu Vana

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Süperkritik Akışkan Teknolojisi

Bir maddenin basınç-sıcaklık faz diyagramında gaz-sıvı denge eğrisinin sağ tarafında kalan bölgede, sıcaklık ve basınç değerlerinin artması sonucu ısıl genleşmeler ile sıvının yoğunluğu azalırken gazın yoğunluğu basıncın artması ile artar. Ancak her akışkana özgü belli bir sıcaklık ve basınç koşulunda bu denge eğrisinin sonunda gaz-sıvı özellikleri arasındaki farklılıklar ortadan kalkar ve süperkritik akışkan (SCF) olarak adlandırılan yeni bir hal ile karşılaşılır. Akışkanların sıcaklık ve basınç değerleri; kritik sıcaklık (T_c) ve kritik basınç (P_c) koşullarında ya da daha üzerindeki koşullarda ise akışkan bu bölgede SCF özelliklerini gösterir. Şekil 1.1’de potansiyel süperkritik akışkan teknolojileri içerisinde en yaygın kullanıma sahip çözücü ya da anti-çözücü olan CO_2 için basınç-sıcaklık faz diyagramı gösterilmiştir. Görüldüğü gibi CO_2 31.05 °C ve 73.8 bar koşullarında ve belirtilen değerlerin üzerinde SCF özellik kazanır ve bu koşullarda süperkritik CO_2 (SCCO₂) olarak adlandırılır.



Şekil 1.1 Saf CO_2 için basınç-sıcaklık faz diyagramı.

1.1.1 Süperkritik akışkanların taşınım özellikleri

SCF'ların taşınım özellikleri gaz ve sıvı özellikleri arasında yer alır. SCF'ların yoğunlukları sıvılara, momentum ve kütle difüzyon katsayıları ise gazlara benzer. Gaz, sıvı ve SCF'ların bu karakteristikleri arasındaki ilişki Çizelge 1.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1 Gaz, SCF ve sıvıların bazı taşınım karakteristikleri

Akışkan	Koşullar P (MPa)/T (°C)	ρ (kg/m ³)	η (Pa s)	D (m ² /s)
Gaz	1/25	0.6-2	(10-30) $\times 10^{-6}$	(0.1-0.4) $\times 10^{-7}$
SCF	P_c/T_c	200-500	(10-30) $\times 10^{-6}$	0.7×10^{-7}
	$4P_c/T_c$	400-900	(30-90) $\times 10^{-6}$	0.2×10^{-7}
Sıvı	1/25	200-900	(200-3000) $\times 10^{-6}$	(0.2-2) $\times 10^{-9}$

Gaz özellikleri ile kıyaslandığında, SCF'ların yoğunluklarındaki artış sayesinde akışkan daha yüksek çözme gücü potansiyeli kazanır. Çünkü çözme gücü sıcaklık ve basıncın bir fonksiyonudur. Mutlak sıcaklık ve mutlak basınç gibi termodinamik değişkenlerdeki küçük değişimler ile akışkanın çözme gücü önemli ölçüde modifiye edilebilir. Düşük yüzey gerilimine sahip olan SCF'ların gözenekli katı dokular içine penetrasyon yeteneği gazlara benzer. Bu özellik sayesinde ise gözenekli yapılardan istenilen ürünlerin ayırma işlemlerinin yanı sıra gözenekli katı katalizörlerde ve katı-akışkan katalitik tepkimelerde de tepkiyenin kolaylıkla katı matris içine penetrasyonu sağlanarak hem ayırma işlemlerinde hem de reaksiyon mühendisliği uygulamalarında önemli avantajlar sağlar. Sıvılar ile kıyaslandığında da SCF'ların moleküler düzeydeki kütle aktarım katsayısının artması ve ayrıca viskozitesinin azalması ise SCF'nın katı yapılardaki gözeneklere daha kolay penetrasyonunu sağlamaktadır.

1.1.2 Süperkritik akışkan seçimi

SCF seçimi yapılırken; akışkanın T_c ve P_c 'si kullanılacak prosese uygun olması, insan sağlığı ve çevreye zararlı olmaması, çözücü gücü ve akışkanı süperkritik duruma getirmek için sisteme verilecek enerjinin optimizasyonu gibi kriterler göz önünde

bulundurulur. Yaygın olarak kullanılan bazı SCF'ların kritik değerleri Çizelge 1.2'de gösterilmiştir. Su, toluen, aseton, etanol ve metanol gibi yaygın kullanılan bazı akışkanların yüksek T_c ve P_c koşullarına sahip olduğu görülmektedir. Yüksek T_c 'ye sahip akışkanlar ile çalışmak bazı dezavantajlara neden olabilir. Biyolojik malzemeler, gıda ve farmasötik endüstrilerindeki ısıya duyarlı maddelerin bu koşullarda SCF ortamlarında kullanımı malzeme ya da maddeye zarar vereceğinden tercih edilmez. Sıcaklığının yanında, özellikle su ve metanol gibi yüksek kritik basınca sahip SCF için ise akışkanı süperkritik hale getirmek için sisteme verilmesi gereken enerji girişi fazladır, bu proseste enerji tasarrufu yapmamızı kısıtlayan bir durumdur. Diğer akışkanlar ise insan sağlığı, çevreye karşı daha zararlı olması ve kritik yoğunluğunun düşük olmasından dolayı tercih edilmesinde önemli darboğazları da beraberinde getirir. CO_2 'in kritik sıcaklığı ve kritik basıncı, yoğunluğu, molekül kütlesi ve kimyasal açıdan inert oluşu göz önüne alındığında en uygun SCF arasında yer alır.

Çizelge 1.2 Bazı süperkritik akışkanların kritik sıcaklık, basınç ve yoğunlukları

SCF	T_c (°C)	P_c (bar)	ρ_c (kg/m ³)	M_w (kg/kmol)
Etilen	9.25	50.4	218	28.05
Karbondioksit	31.05	73.8	468	44.01
Su	374.15	220.0	322	18.02
Propan	96.65	42.4	217	44.09
Amonyak	132.45	113	235	17.03
Etan	32.25	48.8	203	30.07
Etanol	243.05	63.8	276	46.07
Toluen	315.55	41.1	292	92.14
Metanol	239.45	80.9	272	32.04
Aseton	234.95	47.0	278	58.08

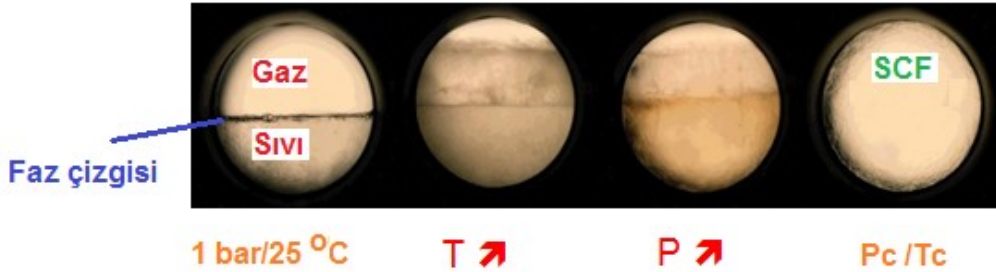
1.1.3 Süperkritik CO₂ ve özellikleri

SCCO₂'in düşük kritik sıcaklığına (31.05 °C) ve nisbeten düşük kritik basınca (73.8 bar) sahip olması diğer akışkanlara göre avantajlıdır. SCCO₂ için basınç-sıcaklık faz diyagramı Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Aynı zamanda SCCO₂ yüksek kritik yoğunluğa sahip olmasından dolayı iyi bir çözme gücüne sahiptir.

Genel olarak SCCO₂'in diğer akışkanlara göre avantaj sağlayan bazı özellikleri;

- Düşük kritik sıcaklık ve basınç
- Yüksek kritik yoğunluk ve iyi çözme gücü
- Düşük molekül kütlesi ve yoğun fazlar arasında daha kolay yayınabilmesi
- Yanıcı ve parlayıcı özellik göstermez. Toksik değildir. Ucuz ve kolay temin edilir. Bu nedenle işletme maliyetinin düşürülmesi açısından önemlidir.
- "Green solvent" özelliğinden dolayı ekolojik sistemle uyumludur. Tek kademede bile atmosferik koşullara indirildiğinde sistemden kendiliğinden kolaylıkla uzaklaşır ve bu nedenle ek bir ayırma süreci gereksinimi duyulmaz. Özellikle sistemde çözücü kalıntısı/atığı bırakmaz.

CO₂'in artan sıcaklık ve basınç koşulları ile süperkritik hale geçişi Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Şekilde gösterilen CO₂'in SCF haline geçişi sırasında önce gaz ve sıvı halde bir faz geçiş çizgisi görülmektedir. Sıcaklık arttırıldığında yavaş yavaş faz çizgisi kaybolur. Daha sonra kritik altı bölgede (sub-critical region) sıcaklığın daha fazla artmasıyla gaz ve sıvının yoğunlukları birbirine daha yakın hale gelir yani fazlar çizgisi ortadan kalkmaya başlar. En son olarak da SCF olarak adlandırılan gaz ve sıvı fazlardan farklı olarak ayrı ve yeni bir faz ortaya çıkar. Bu süreçte faz çizgisi artık gözükmez. Burada artık homojen bir faz oluşumu söz konusudur.



Şekil 1.2 CO₂'nin artan sıcaklık ve basınç ile süperkritik akışkan hali alması.

1.1.4 Süperkritik CO₂ teknolojisi uygulamaları

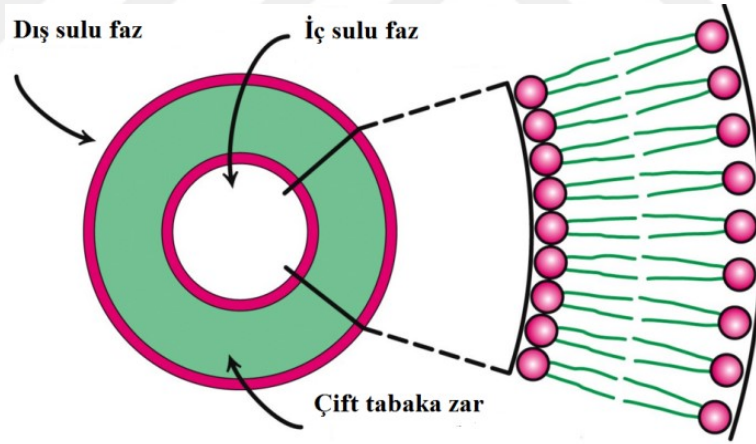
SCCO₂ gelişen teknolojiyle birlikte günümüzde geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Bunlar genel olarak;

- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE)
 - *Bitkisel materyallerden ilaç etken maddelerinin geri kazanımı*
 - *Yağlı tohumlardan yağ asitlerinin ekstraksiyonu*
 - *Geliştirilen biyopolimer yapı dokularından (scaffold) organik çözücü sistemlerin giderilmesi/minimizasyonu*
 - *Bitkisel materyallerden koku verici ya da renk verici maddelerin geri kazanımı*
- Süperkritik akışkanların yer aldığı spektrofotometrik ve kromatografik sistemlerin geliştirilmesi
- Nano/mikro tanecik tasarımında çözücü/anti-çözücü olarak kullanılması
 - *RESS prosesi*
 - *GAS prosesi*
 - *SAS prosesi*
 - *ASES prosesi*
 - *Ters misel uygulamaları*
- Reaksiyon ortamında çözücü/anti-çözücü olarak kullanılması
 - *Homojen/heterojen katalizler kullanılarak gerçekleştirilen tepkimeler (izomerizasyon, hidrojenasyon, enzim katalizli tepkimeler ve Fischer-Tropsch sentezi gibi)*
 - *Polimerizasyon*
 - *Kiral bileşiklerin sentezi*
- Biyomedikal uygulamalar

1.2 Lipozomlar

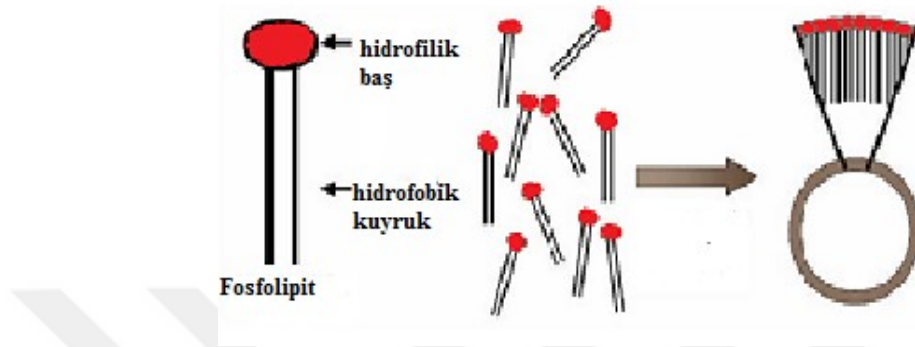
Lipozom (liposome) Yunanca lipos (yağ) ve soma (vücut) kelimelerinden türetilmiş bir kelimedir. İlk olarak lipozomarı inceleyen Alec D. Bangham bunu 1964 yılında yumurtadaki lesitinden biyolojik zar modelleri yapmaya çalışırken gerçekleştirmiştir. Lipozomlar genellikle soya fasulyesi ve yumurtadan elde edilen fosfolipitlerin saflaştırılarak elde edilmesiyle üretilirler. Lipozomlar tek veya çok katmanlı fosfolipit tabakalarından oluşmuş küresel yapıdaki veziküllerdir. Katsuke ve ark (2001) lipozomları şu şekilde tanımlamaktadır: Lipozomlar, bimoleküler lipid tabakalarından oluşan kapalı veziküllerdir, bir hücre yapısına ve yapay biomembranlara bir model olarak kullanılmıştır çünkü doğal bir yapıya sahiptir ve biyomembranlarınkine benzer şekilde işlev görürler. Biyolojik membranara benzer şekilde biyoparçalanabilen ve biyogeçirimsizliğe sahip lipidlerden oluşan lipozomlar yapısında fosfolipit tek veya çok tabakalı bir membran ve orta kısmında sulu bir faz içerir. Şekil 1.3'te genel olarak bir lipozom yapısı sunulmuştur.



Şekil 1.3 Lipozomun genel yapısı.

Doğal bir yüzey aktif madde olan fosfolipitler su ile temas ettiğinde hidrofilik kısımları suya doğru hidrofobik kısımları da sudan kaçarak kendiliğinden bir misel formu oluşturur. Lipozomun hidrofobik kısmı hidrokarbon zincirlerinden, hidrofilik kısmı ise fosfat ve kolin gruplarından oluşmaktadır. Eğer bu oluşum bir çift tabaka (bilayer)

oluşumu ise lipozom adını alır. Şekil 1.4'te lipozomun su varlığında kendiliğinden oluşumu şematize edilmiştir.



Şekil 1.4 Fosfolipitlerin su varlığında kendiliğinden lipozom oluşturması.

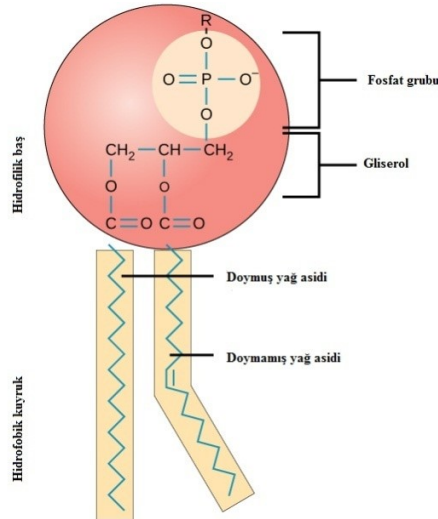
1.2.1 Lipitler

Biyomoleküllerin önemli bir sınıfını oluşturan lipitler suda çözünmezler ve hücrenin diğer bileşenlerinden, organik çözücülerde (eter, kloroform, benzen, aseton gibi) çözünerek ayrılırlar. Lipitler, hücre zarının yapı taşlarını oluştururlar ve metabolizmada enerji üreten maddelerin depolanması görevini yaparlar. Lipitlerin temel yapı taşları yağ asitleridir. Yapılarında C, H ve O gibi elementler bulunur. Ayrıca bazı lipitlerin yapısına N, P ve S gibi elementler de girebilir. Lipitler kendiliğinden misel, vezikül ve sulu solüsyonlarda tabaka oluşturabilirler. Genel olarak lipitleri yapılarına göre sınıflandıracak olursak; basit lipitler (yağlar ve mumlar gibi), bileşik lipitler (fosfolipitler, glikolipitler ve lipoproteinler gibi) ve türevsel lipitler (steroitler gibi) olarak sınıflandırabiliriz. Basit lipitler, yalnızca C, H ve O'dan meydana gelmiş olup, yağ asitlerinin çeşitli alkollerle oluşturdukları esterlerdir. Trigliseritler veya triaçilgliseroller olarak da adlandırılan yağlar, serbest olarak asidik veya bazik gruplar içermediği için bunlara nötral yağlar da denir. Doğada lipitlerin en çok bulunan şeklidir. Gliserol ve yağ asitlerinin dehidrasyon tepkimeleriyle bir araya gelmesiyle oluşur. Mumlar ise yağ asitlerinin uzun zincirli doymuş mono alkoller ile yaptıkları esterlerdir. Mumlar suda erimez, organik çözücülerde erir. Lipitler gibi kolay hidrolize olmaz ve sabunlaşmazlar. Mumlar biyolojik yönden önemlidir. Birçok bitkinin yaprakları ve

meyveleri mumsu örtüyle kaplıdır. Bu örtü onların su kaybetmesini engeller ve küçük otçul hayvanların zararından korur. Kuşların tüyleri ve bazı hayvanların kürkleri de mumsu örtü içerir bu da onları su geçirmez yapar.

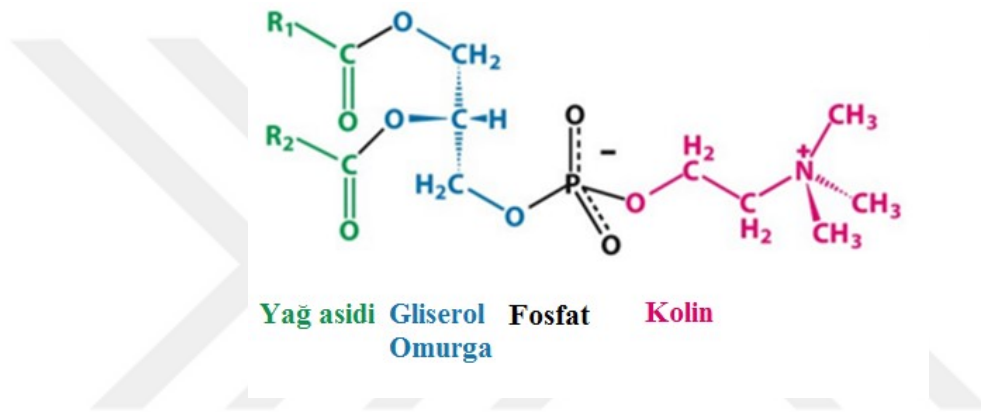
Bileşik lipitler ise yağ asitleri ve gliserole ek olarak başka gruplarda içeren lipitlerdir. Bu gruplar fosforik asit, karbonhidrat ve protein gibi moleküllerdir.

Fosfolipitler, lipitlerin yağlardan sonraki en önemli grubu olan fosfolipitler fosforik asidin (H_3PO_4) diesteridirler. Bağlı olan alkol grubu gliseroldür ve gliseroledeki üçüncü hidroksil grubu negatif yüklü bir fosfat grubuna bağlıdır. Fosfolipitler doğal yüzey aktif maddelerdir ve amfifilik (hem hidrofilik hem hidrofobik davranma eğilimi) yapıya sahiptirler. Kuyruk kısmı olarak adlandırılan hidrokarbonlardan oluşan kısmı hidrofobik, fosfat grubu ve ona bağlı kısımları içeren baş kısmı ise hidrofiliktir. Fosfolipitler suya eklendiğinde kendiliğinden hidrofilik kısımları dışa hidrofobik kısımları da içe dönerek bir misel formu oluştururlar. Fosfolipitler hücre zarının temel bileşeni olup hücre zarında çift katlı tabakalar şeklinde dizilirler. Hücre zarında; fosfolipitlerin hidrofilik başları çift tabakanın dışında hücrenin su ile temas eden bölümünde iken hidrofobik kuyrukları zarın iç kısmındadır. Şekil 1.5’de bir fosfolipit yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.5 Fosfolipit yapısı.

Fosfolipitlerin en önemlisi ise lesitin yani fosfatidilkolindir. Lesitinde iki hidroksil grubunun biri doymuş diğeri ise doymamış yağ asidi olmak üzere iki yağ asidi ile esterleşmiştir. Üçüncü hidroksil grubunda kolinle birleşmiş olan fosforik asit ile esterleşmiştir. Şekil 1.6'da fosfatidilkolinin genel yapısı sunulmuştur. Glikolipitler, karbonhidrat içeren lipidlerdir. Yapı olarak sfingomiyelinlere benzer, ancak fosfat grubu yoktur. Fosfat grubu yerine monosakkarit veya oligosakkarit içerir. Lipoproteinler ise proteinlerin lipidlerle yaptıkları bileşiklerdir. Kandaki taşıyıcı moleküllerdir. Lipoprotein parçacıkları 10-1000 nm arasında büyüklüğe sahiptir.



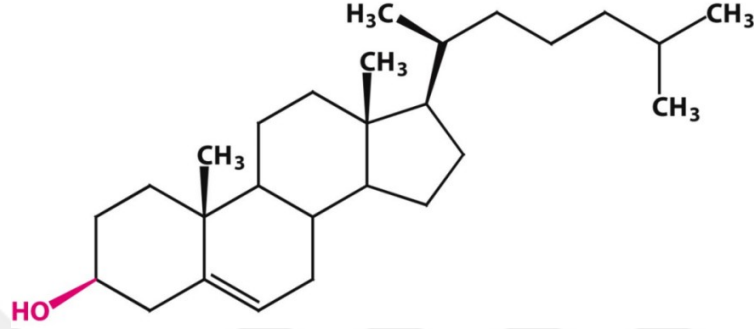
Şekil 1.6 Fosfatidilkolin genel yapısı.

Türev lipidler; steroidler, karotenoitler, A, D, E ve K vitaminleri, basit ve bileşik lipidlerin hidrolizi sonucu oluşan alkoller (gliserol ve sfingozin), yağ asitleri, mono ve digliseritler, aldehitler ve ketonlar türev lipidler sınıfına dahil edilir.

Steroidler, birbirleriyle kaynaşmış dört adet halka (biri 5 diğeri ise üçü 6 karbonlu) içeren karbon iskeletine sahip lipidlerdir. Halkalardan oluşan yapıya farklı fonksiyonel grupların bağlanması, farklı steroidlerin oluşmasına neden olur. Steroidlerin fizyolojik önemi çok büyüktür. Kolesterol, cinsiyet hormonları, adrenalin ve kortizon gibi hormonlar, safra asitleri, bazı alkaloidler, D vitaminleri, bitkilerde kauçuk, reçine, haşhaş sütü steroid grubundaki bileşiklerdir.

Kolesterolün hücre zarının yapısı ve bakımında önemli görevi vardır. Kolesterol içeren membranlar daha geniş sıcaklık aralıklarında bile akışkan özelliklerini koruyabilirler.

Kolestrol suda çözünebilir ve yağda çözünebilir bölgelere sahip olduğundan amfifilik yapıdadır. Suda taşınmayan kolestrollerin taşınması lipoproteinler aracılığıyla olur (Url-1). Şekil 1.7’de kolestrolün genel yapısı gösterilmiştir.

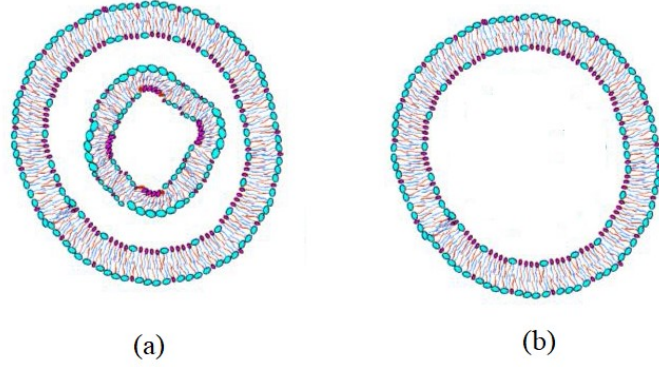


Şekil 1.7 Kolestrolün kimyasal yapısı.

1.2.2 Lipozomların sınıflandırılması

Lipozomlar genel olarak hazırlanmalarında kullanılan lipidlerin yapısına, içerdikleri tabaka sayısı ve büyüklüklerine göre şu şekilde sınıflandırılabilir. Tabaka sayısı ve büyüklüklerine göre lipozomlar;

- Birçok lipid çift tabakadan oluşmuş ve Şekil 1.8a’da gösterilen çok tabakalı lipozom (MLV, Multilamellar Vesicle)
- Tek bir lipid çift tabakadan ve Şekil 1.8b’de gösterilen küçük tek tabakalı lipozomlar (SUV, Small Unilamellar Vesicles)
- Boyut olarak SUV’lardan daha büyük yapıda fakat sadece tek bir lipid tabakadan oluşmuş olan büyük tek tabakalı lipozomlar (LUV, Large Unilamellar Vesicles) şeklinde sınıflandırılabilirler.



Şekil 1.8 Çift tabaka sayısına göre lipozomların şematik gösterimi
(a) MLV yapısı ve (b) SUV ya da LUV yapıları.

Lipozomlar içerikleri tabaka sayısı ve boyutlarına göre sınıflandırılması daha ayrıntılı olarak Çizelge 1.3’de sunulmuştur (Gulati ve ark, 1998; Gürsoy, 2002).

Çizelge 1.3 Boyutlarına göre lipozomların sınıflandırılması

Lipozom sınıfı	Boyut
MLV	Çapları $> 0.5 \mu\text{m}$
UV	Her boyutta olabilir
SUV	20-100 nm
MUV	Orta büyüklükte tek tabakalı lipozomlar
LUV	Çapları $> 100 \text{ nm}$
GUV	Çapları $> 1 \mu\text{m}$
MVV	Çapları $> 1 \mu\text{m}$

Kullanılan lipitin yapısına göre lipozomlar sınıflandırılmasında ise lipozomlar hazırlanmasında kullanılan lipitlerin net yüklerine göre nötral, anyonik ve katyonik olarak ayrılmaktadır. Anyonik ve katyonik lipozomlar hazırlanırken anyonik ve katyonik lipitler ile nötral lipitlerin belli oranlarda kullanılmasıyla hazırlanmaktadır. Anyonik, katyonik ve nötral lipozomların hazırlanmasında kullanılan lipitler Çizelge 1.4’te özetlenmiştir.

Çizelge 1.4 Lipozomların kullanılan lipitlerin yüklerine göre sınıflandırılması

Yükü	Lipitler
Nötral	Fosfatidilkolin Dioleil-fosfatidilkolin 1,2- dimiristoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin 1,2- dimiristoil –sn- glisero-fosfatidiletanolamin 1,2- dimiristoil-sn-glisero-fosfatidilkolin 1-palmitoil-2-oleil-sn-glisero-3-fosfokolin
Anyonik	Dioleil fosfatidik asit Dioleil fosfatidilgliserol kardiolipin Dioleil fosfatidilserin Fosfatidik asit Pirofosfatidik asit Fosfatidilgliserol
Katyonik	Dioleil-Trimetilamonyum-propan N-Metil-4(dioleil)-metilpiridinyumkrorid N-Metil-4(stearil)-metilpiridinyumklorid Dioleil-fosfatidil-etanolamin <i>N</i> -(1-(2,3-dioleiloksi)propil)- <i>N,N,N</i> ,-trimetilamonyum klorid 1,2-bis(oleiloksi)-3-(trimetilamonyum)propan 3b(<i>N</i> -(<i>N,N</i> ,-dimetilaminoetan)-karbamoil) kolesterol 1,2-dimyristoyl-P-O-etilfosfatidilkolin Dioktadesil-amido-glisil-spermin 2,3-dioleksi-N-[2(spermin)etil]- <i>N,N</i> -dimetil-1-propanaminyum trifloroasetat

1.2.3 Lipozomların hazırlanma yöntemleri

Lipozomların hazırlanmasında kullanılan yöntemler lipozomların büyüklüğü ve içerdiği tabaka sayısına etki edeceğinden kullanılacak yöntem amaca uygun olarak seçilmelidir. Geleneksel lipozom hazırlama yöntemleri 3 ana başlık altında toplanabilir.

- a. Mekanik hazırlama yöntemleri
- b. Çözücü dispersiyonu yöntemi
- c. Deterjan ile çözündürme yöntemi

1.2.3.1 Lipozomların mekanik hazırlama yöntemleri

Mekanik hazırlama yöntemlerinde lipitler katı bir destek üzerinde kurutulmuş bir lipit filmi edilir. Ortama sulu faz eklenmesi ve çalkalama ile lipit filmi disperse (dağıtma) edilir.

- Elle çalkalama ile lipozomların dağıtılması yöntemi: *Lipitler bir balon jöje içerisinde organik çözücü içerisinde çözülür daha sonra organik çözücünün uzaklaştırılması ile balon jöjenin alt kısmında ince bir film tabakası elde edilir. Ortama sulu faz eklenmesi ile film tabakası tekrar süspansiyon edilir. Bu yöntem en çok kullanılan yöntemlerden birisidir.*
- Çalkalama yapılmadan hazırlanan lipozomlar: *Bangham ve ark. (1965) bu yöntemde hidrasyon ve yıkama işlemi olarak iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak olan hidrasyon basamağında lipit filmi hazırlanır ve çalkalama yapılmadan sulu ortam ile lipit filmi yıkanır daha sonra hidrasyon işlemi azot ile doyurulmuş su buharı ile yapılır. Yıkama işleminde çalkalama yapılmadan sulu ortam ile yapılır.*
- Dondurarak kurutma ile lipozomların hazırlanması: *New (1990) dondurarak kurutma yönteminde dondurulmuş-kurutulmuş lipit uygun bir organik çözücü içinde çözülerek sulu ortama eklenir. Kullanılacak çözücünün seçimi donma noktasına göre seçilir. Lipitin kuru halde elde edilmesinin ardından köpük benzer yapının şişmesi beklenir. Faz geçiş sıcaklığı üzerinde hızlı bir şekilde karıştırma yapılarak MLV'ler elde edilir.*
- Fiziksel yollarla hidrate lipitlerin işlenmesi: *New (1990) kuru lipit filmin hidrasyonu ile çok tabakalı lipozomlar hazırlandıktan sonra lipozomların büyüklük veya diğer*

özelliklerini değiştirmek için çeşitli işlemler uygulanabilir. MLV'ler büyük ve heterojen yapıda olurlar. Bundan dolayı çeşitli yöntemler kullanılarak lipozomlar küçük veziküller haline dönüştürülmektedir. Bu yöntemler mikro-emülsifikasyon, ekstrüzyon, ultrasonifikasyon ve Fransız basınç hücresi yöntemleridir. Hidrate edilen lipidlerin tutulma hacimlerini arttırmak veya veziküllerin tabaka sayısını azaltmak için dondurarak kurutma, dondurarak çözme, iyon ve pH değişikliği gibi yöntemler geliştirilmiştir.

- Sonikasyon yöntemi: New (1990) Hidrate edilen lipidlerden küçük ve tek tabakalı veziküller elde edebilmek için lipozom dispersiyonuna yüksek düzeyde enerji uygulayabilecek bir yöntemin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan yöntem ultrasonikasyon uygulanmasıdır. Sonikasyon ile lipozomların hazırlanmasında iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar çubuk sonikasyonu ve banyo sonikasyonudur. Çubuk sonikasyonu, küçük hacimlerde yüksek miktarda enerji gerektiren dispersiyonlara uygulanır. MLV'lerden daha küçük boyutta partiküllerin oluşması sağlanır. Ancak bu yöntemle lipidlerin bozunması, çubuğun ucundan zamanla aşınmaya bağlı olarak metal partiküllerin kopması gibi problemler oluşabilir. Banyo sonikasyonu, seyreltik fosfolipitlerin büyük hacimleri için uygulanan bir yöntemdir.
- Fransız basınç hücresi ile hazırlama yöntemi: New (1990) bu yöntemi aşağıdaki gibi tanımlamaktadır. "Fransız basınç hücresi yönteminde uygulanan basınç büyüklüğüne göre 30-80 nm boyutunda tek veya birkaç tabakalı homojen lipozom preparatlarının hazırlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle hazırlanan lipozom preparatları sonikasyonla hazırlananlara göre daha stabildir". MLV dispersiyonlarının boyutları yüksek basınçlı Fransız basınç ekstrüzyonu ile azaltılabilir.
- Membrandan ekstrüzyon yöntemi: New (1990) bu yöntemi aşağıdaki gibi tanımlamaktadır. "Lipozomların partikül büyüklüğünü azaltmak için kullanılan yöntemlerden biridir. Gözenek büyüklüğü belli olan membran filtrelerden lipozomlar geçirilerek partikül büyüklüğü azaltılır".
- Kurutulup tekrar oluşturulan veziküller: Arıca (1992) bu yöntemi şu şekilde açıklamaktadır: SUV dispersiyonları dondurulur ve liyofilize edilir. Böylece organik

çözücüden kurtularak hazırlanan Lipozomların aksine, SUV yapıda kurutulmuş lipitlere sulu fazın eklenmesiyle tekrar hidrasyon sağlanır.

- *Dondurarak çözme sonikasyon yöntemi: Oku ve ark. (1983) bu yöntemde farklı derişimlerdeki tuz çözeltileri ile SUV'lar karıştırılır ve birçok kez dondurma çözme işlemi uygulanır. Uygulanan diyaliz işlemi sırasında ise dondurarak çözme ile yıkama ve osmotik parçalanmayla oluşan kopma LUV'leri meydana getirir.*
- *pH değiştirilerek yapılan vezikülasyon işlemi: Sadece pH değiştirilerek sonikasyon veya basınç uygulanmadan MLV'ler tek tabakalı veziküllere dönüştürülebilir. pH'da ki geçici değişim ile lipit tabakanın yüzeyindeki yük yoğunluğundaki artışa bağlı olarak kendiliğinden veziküllerin oluşması sağlanır.*
- *Kalsiyumla indüklenen füzyon yöntemi: Papahadjopoulos ve ark. (1978) tarafından bulunan bu yöntem asit özellikteki fosfolipitlerden LUV'lerin hazırlanmasında olanak tanır. SUV'ler de füzyonu indüklemek için ortama kalsiyum eklenir ve büyük silindirik, kıvrımlı, spiral dizinde çok tabakalı yapılar oluşur. Bu yöntemle elde edilen veziküllerin partikül büyüklüğü dağılım heterojen olup büyüklükleri 0.2-1.0 µm arasında değişmektedir. Bu yöntem makromolekülleri %10 oranında LUV'ler içinde enkapsüle edilebildiğinden avantajlıdır. Sonuçta oluşan veziküller homojen büyüklükte, büyük tek tabakalı yapılardır. Dezavantajı ise asidik fosfolipit veya fosfolipit karışımlarından yapılabilmesi nedeniyle formülasyonlarının sınırlı olmasıdır.*
- *Mikroemülsifikasyon yöntemi: Lipozomların belirli büyüklükte hazırlanması için çeşitli laboratuvar ölçekte bazı teknikler geliştirilmiştir. Ancak bunların büyük bir bölümü yüksek hacimde üretim için uygun değildir. Talsma ve ark. (1991) doymuş ve doymamış fosfatidilkolin içeren lipozomları mikrofluidizasyon, sonikasyon ve basınçla süzme teknikleri ile elde ettikleri çalışmalarında 40 µmoL fosfolipit/mL lipozom dispersiyonlarında sonikasyon ve yüksek basınç homojenizasyonunun aynı ortalama partikül boyutlarını ulaşabildiğini vurgulamış ve ayrıca lipozomların hazırlanmasında etkili bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Basınçlı süzme ise daha büyük partikül vermiştir. Mikrofluidizer ile 0.05-0.25 µm aralığında ortalama partikül büyüklüğü ve dar bir büyüklük dağılımı 200 µm fosfolipit/mL dispersiyon*

konsantrasyonuna kadar elde edilmiştir. Ancak miktarı 50 mL'yi aşan serilerde belirgin bir lipit kaybı ve dispersiyon içindeki ufak metal partikülleri görülmüştür.

1.2.3.2 Lipozomların çözücü dispersiyon yöntemleriyle hazırlanması

Lipozomların çözücü dispersiyon yöntemleri ile hazırlanmasında kullanılacak lipitler organik çözücüde, etken madde sulu fazda çözülerek, sulu ve organik fazın teması sağlanır. Organik ve sulu faz ara yüzeyinde tek tabaka oluşturan fosfolipitler çift tabakalı yapıları meydana getirecek şekilde düzenlenir.

- Etanol enjeksiyon yöntemi: *Batzri ve ark. (1973) bu yöntemi şu şekilde açıklamaktadır: 30-110 nm çapında tek tabakalı veziküllerin hazırlanmasını sağlayan bu yöntemde etanolde çözünen lipitler tampon çözeltiye enjekte edildiği sırada SUV'ler oluşur. SUV'lerin oluşabilmesi için etanol derişimi hacimce %10'u aşmamalıdır. Elde edilen veziküllerin büyüklüğü ve homojenliği etanol ve tampon karışım oranına ve karıştırma hızına bağlı olarak kontrol edilebilir. Yöntem basit ve hızlıdır. Ancak bu yöntem ile enkapsülasyon etkinliği düşük, seyreltik lipozomların oluşması dezavantajlıdır. Veziküllerin ultrafiltrasyon ile konsantre hale getirilebilir. Yöntemin diğer bir dezavantajı ise ortamdan etanolün uzaklaştırılması zorluğudur. Etanol ortamdaki su ile azeotropik karışım oluşturur ve bunun distilasyon veya vakumla uzaklaştırılması çok zordur.*
- Eter enjeksiyonu yöntemi: *Deamer ve ark. (1976) tarafından ilk defa uygulanan bu yöntemde fosfolipitler dietileter veya dimetileter/metanol karışımında çözülür. Düşük basınç altında 30 °C'de veya 55-65 °C'de enkapsüle edilecek materyale enjekte edilirler. Organik çözücünün uçurulmasından sonra LUV'ler oluşur. Veziküller 1.2 µm gözenek çapına sahip filtreden geçirilerek ortalama partikül 150-200 nm arasında değişen veziküller elde edilir. Schieren ve ark. (1978) bu yöntemi şöyle açıklamaktadırlar: Etanol enjeksiyonu tekniğinden farklı olarak bu yöntemde organik çözücüdeki lipit konsantrasyonu lipozom büyüklüğü üzerinde etkin değildir. Bu yöntem petrol eteri kullanılarak modifiye edilmiştir. Enjeksiyon tekniği birçok lipit karışımına uygulanarak LUV'ler hazırlanabilir. Bu yöntemde organik çözücü kullanımı ve yüksek sıcaklık uygulanması ısıya duyarlı maddeler için dezavantajlıdır.*

Enjeksiyon tekniği ile hazırlanan lipozomların büyüklük dağılımı heterojen olup, enkapsülasyon etkinliği ise düşüktür.

- *Organik fazda sulu emülsiyon yöntemi: New (1990) bu yöntemi şu şekilde açıklamaktadır: lipozom iki basamakta hazırlanır. Birinci basamakta lipit çift tabakanın iç kısmı, ikinci basamakta ise dıştaki kısmı oluşturulur. Yöntemin çeşitli uygulamaları olmakla birlikte genel yol yağ içinde su emülsiyonu oluşturulması şeklindedir. İç fazda enkapsüle edilen materyali içeren küçük hacimdeki sulu ortam, büyük hacimdeki su ile karışmayan organik çözücü içindeki lipitler ile temas çözülür. Daha sonra mekanik karıştırma ile sulu faz mikroskobik su damlacıkları haline getirilir. Sulu kompartman, fosfolipitlerden oluşan tek tabaka ile kuşatıldıktan sonra sonuçtaki lipozomun merkez çekirdeği şekillenir. Bu yöntemle yapılan uygulamalara örnek olarak ters faz buharlaşma tekniği verilebilir.*
- *Ters faz buharlaşma tekniği: Szoka (1978), bu yöntemi şu şekilde açıklamaktadırlar: Fosfolipitler organik çözücüde veya organik çözücü karışımlarında çözülür. Sulu ortam fosfolipit çözücü karışımına eklenir. Homojen bir emülsiyon oluşumu için bir süre karıştırılır, alçak basınçta çözücülerin uzaklaştırılması sağlanır. Böylece viskoz, jel kıvamında sonradan alçak basınca döner buharlaştırıcı yardımıyla kendiliğinden dispersiyon oluşturacak faz oluşur. Sonuçta elde edilen vezikül büyüklüğü fosfolipit karışımındaki kolestrol oranına göre değişir. Kolestrol/fosfolipit oranın 1:1 olan veziküllerin çapı 0.16-0.9 µm arasında değişir. Ancak kolestrol içermeyen benzer fosfolipitlerde bu büyüklük ortalama 0.16µm'dir. ve 0.08-0.24 µm arasında değişir.*

1.2.3.3 Lipozomların hazırlanmasında deterjan ile çözündürme yöntemi

Bu yöntem deterjan fosfolipit karışımından deterjanların uzaklaştırılması esasına dayanır.

1.3 Lipozomal Sistemlerin Süperkritik Akışkan Teknolojisiyle Üretim Prosesleri

Konuya ilişkin süreli yayın veri tabanı incelendiğinde ilk çalışmalara 1994 ve 1996 yıllarında yayımlanan patentlerde rastlanılmaktadır. İlk patent çalışması süperkritik koşullardaki CO₂+etanol (yardımcı çözücü) karışımında çözünen fosfatidilkolin (PC)+fosfatidiletanolamin (PE) ikili lipit karışımının sulu faz içine nozzle sisteminden

geçirilerek enjeksiyonunu içermektedir (Castor, 1994). İkinci patent çalışması ise sulu fazı ile PC+PE lipit karışımı, CO₂ ve etanol öncelikle birbiriyle karıştırılmış ve daha sonra basınç altındaki bu karışım bir nozzle sisteminde geçirilerek yani sprey edilerek çok hızlı şekilde basıncın indirgenmesi sağlanmıştır (Castor ve Chu, 1996). Her iki süreç sonunda üretilen lipozomal sistemlerin boyutları 200 nm–4 µm aralığında değişmiştir. Lipozomal sistemlerin SCCO₂ teknolojisi ile sentezlenebilirliği ve çalışmaların endüstriyel boyuta aktarılabilme potansiyeli SCCO₂ ortamı içeren alternatif üretim proseslerinin geliştirilmesine ivme kazandırmıştır. SCCO₂ ortamı içeren prosesler ilişkin literatür bilgisi Çizelge 1.5'de ve aşağıda özetlenmiştir.

Çok miktarda organik çözücü kullanımı gerektiren konvansiyonel lipozom üretim yöntemlerine alternatif olarak suda çözünebilir bileşiklerin SCCO₂ ortamı kullanarak enkapsülasyonu sağlayabilen lipozomal sistemleri üretebilmek amacıyla Frederiksen ve ark. (1997) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Polaritesi etanol ile artırılmış 25 MPa ve 60 °C koşullarındaki SCCO₂ ortamında fosfolipit (PC+PS) ve kolesterol (CHOL) sistemlerinden oluşan homojen bir lipit çözeltisi 0.5 mm çaplı ve 5 cm uzunluğundaki kapiler boru sistemden geçirilerek sulu sistem içinde genişletilmesiyle basıncın indirgenmesi gerçekleştirilmiştir. Yöntem ile bimodal boyut dağılımlı yaklaşık 200 nm ortalama boyuta sahip lipozomal sistemler üretilmiştir. Çalışmada konvansiyonel yöntem (Bangham yöntemi) ile üretilen lipozomal sistemler ile benzer enkapsülasyon etkinliğine ulaşılmıştır.

Süperkritik çözeltilerin ani genişmesi (RESS) prosesi, SCCO₂ ortamında hazırlanan doygun fosfolipit çözeltisi düşük basınçtaki genişleme ünitesine sıcaklık kontrollü nozzle sistemden süpersonik hızda geçirilmesiyle oluşturulan yüksek kesme gerilimleri ve SCF'ın ani genişmesi sonucu fosfolipit kompleksi (katı formda fosfolipit partikülleri) üretimini geçekleştiren bir prosestir. Aslında RESS prosesi ile doğrudan lipozomal sistemlerin üretimi gerçekleştirilemez. Çünkü lipozomal sistemlerin oluşumu için su ortamına gereksinim duyulur. Ancak Wen ve ark. (2010) RESS prosesini modifiye ederek lipozomal sistemleri sentezleyebilmişlerdir. PC, CHOL ve uçucu yağ öncelikle SCCO₂/etanol sisteminde çözülmüş ve daha sonra yüksek basınç koşullarındaki çözelti eş eksenli nozzle sisteminden geçiren potasyum fosfat tamponu ile birlikte ani genişleme

ünitesine enjekte edilmiştir. Bu çalışmada, 30 MPa ve 65 °C koşullarında küresel morfolojiye sahip, 173 nm'de sıkı boyut dağılıma sahip ve yüksek enkapsilasyon etkinliği lipozomal sistemler sentezlenmiştir.



Çizelge 1.5 Lipozomal sistemlerin SCCO₂ ortamında üretim prosesleri

Yöntem	Fosfolipit bileşimi	Aktif Bileşen	Boyut	Kaynaklar
Süperkritik lipozom yöntemi	Fosfatidilkolin, fosfatidilserin ve kolesterol	FITC-dekstran ve TSZnPc	~200 nm	(Frederiksen ve ark.,1997)
Süperkritik çözeltilerin ani genişmesi (RESS) prosesi	Fosfatidilkolin ve kolesterol	<i>A. macrocephala</i> uçucu yağı	~173 nm	(Wen ve ark., 2010)
Sulu ortam içinde geniştirilmiş çözeltinin basıncın indirgenmesi (DESAM) prosesi	Diastearoylphosphatidylcholine ve kolesterol	–	50–100 nm	(Meure ve ark., 2009)
Süperkritik akışkanlarla dağılımı yükseltilmiş çözelti (SEDS) prosesi	Soya fosfolipitleri	Puerarin	1 µm	(Li ve ark., 2008) (Li ve ark., 2008)
Gaz anti-çözücü (GAS) prosesi	Soya fosfolipitleri Fosfatidilkolin ve kolesterol	– Amfoterisin B	– 0.5–3µm	(Li ve ark., 2008) Kadimi ve ark., 2007)
Aerosol çözücü ekstraksiyon sistemi (ASES) prosesi	Fosfatidilkolin ve kolesterol	Mikonazol	–	(Kunastitchai ve ark., 2006)

Çizelge 1.5 Lipozomal sistemlerin SCCO₂ ortamında üretim prosesleri (Devam)

Yöntem	Fosfolipit bileşimi	Aktif Bileşen	Boyut	Kaynaklar
Süperkritik anti-çözücü (SAS) prosesi	Lesitin S20, S75 ve S100	–	1–40 µm	(Badens ve ark., 2001)
	Lesitin S75	–	1–40 µm	(Magnan ve ark., 2000)
	Lesitin S75	Floresan belirteçler	0.1–100 µm	(Lesoin ve ark., 2011)
	Hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolin, soya fosfatidilkolin ve kolesterol	Doketaksel	200–300 nm	Naik ve ark., 2010)
	Hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolin	Vitamin D ₃	1 µm	(Xia ve ark., 2011)
	Hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolin	Lutein	200–500 nm	(Xia ve ark., 2012)
Sürekli antiçözücü (CAS) prosesi	Soya lesitini	–	0.1–100 µm	(Lesoin ve ark., 2010) (Lesoin ve ark., 2011)
Süperkritik ters faz evaporasyon (SCRPE) prosesi	Dipalmitoilfosfatidilkolin	Glukoz ve kolesterol	0.1–1.2 µm	(Otake ve ark., 2001)
	Fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidik asit,	Glukoz ve kolesterol		(Imura ve ark., 2002)
	Fosfatidilkolin ve dioleoilfosfatidilkolin	Glukoz		(Imura ve ark., 2003)
Geliştirilmiş süperkritik ters faz evaporasyon (SCRPE) prosesi	Dipalmitoilfosfatidilkolin	Glukoz	1.5 µm	(Otake ve ark., 2006) (Otake ve ark., 2006)

Sulu ortam içinde genişletilmiş çözeltinin basıncın indirgenmesi prosesi (DESAM) prosesi, Meure ve ark. (2009) tarafından geliştirilmiş hızlı ve basit bir yöntemle lipozom oluşumunun sağlandığı bir prosedir. Proseste lipozom üretiminde yer alan organik çözücülerin büyük ölçüde ayrılması ılımlı sıcaklık koşullarında ve 6 MPa altındaki basınç koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde etanol+kloroform içinde çözünen fosfolipit çözeltisi içine CO₂ enjekte edilerek genişletilmiş bir lipit çözeltisi hazırlanır. Daha sonra bu çözelti ısıtılmış sulu ortama bir nozzle sisteminden (0.9 cm uzunluk ve 177.8 µm iç çaplı/1.5 cm uzunluk 254 µm iç çaplı) geçirilerek püskürtülür. Böylece lipitleri çözmek için kullanılan organik çözücülerin uzaklaşması sağlanır. Deneysel bulgularda lipozomal sistemlerde organik çözücü kalıntısının süperkritik lipozom yöntemine kıyasla yaklaşık 4 kat daha az olduğunu vurgulamıştır. Bu yöntemde 50–200 nm boyut dağılımına sahip lipozomal sistemler üretilmiştir.

Süperkritik akışkanlarla dağılımı yükseltmiş çözelti (SEDS) prosesi, Li ve ark. (2008) tarafında lipozomal sistemlerde ilaç etken maddesi puerarin enkapsülasyonu gerçekleştirmek amacıyla uygulamaya koyduğu yarı-sürekli işletim konfigürasyonlu bir prosestir. Proses katı formda ilaç etken maddesi içeren fosfolipit komplekslerinin oluşumu için tasarlanmıştır. Organik çözücüde çözünen puerarin ve soya fosfolipitleri ikili sistemi eş anlı olarak CO₂ ile birlikte ön karıştırma ünitesine beslenmekte ve burada akımlar birbiriyle moleküler düzeyde disperse edilerek SCF'da dağılımı yükseltmiş bir çözeltinin fiziksel oluşumu sağlanmıştır. Daha sonra bu çözelti eş eksenli nozzle sisteminden geçirilerek daha düşük basınç koşullarında SCF'la basınçlandırılmış olan partikül oluşum ünitesine enjekte edilerek püskürtülmüştür. Oluşan jet akımları sayesinde organik çözücü, SCF fazından oluşan yığın ortamında dağıtılarak (ekstraksiyon) çözelti sisteminden uzaklaştırılmış ve böylece 1 µm boyutlarında kuru formda ilaç etken maddesi içeren fosfolipit kompleksleri sentezlenmiştir. İşletme koşullarının iyi optimize edilememesi nedeniyle bazı fosfolipit komplekslerinin iç içe geçerek yaklaşık 6 µm'lık aglomeratlar oluşmuştur. Ancak lipozomal sistemlerin oluşumu için hidrasyonu aşamasına gereksinim duyulmaktadır.

Gaz anti-çözücü (GAS) prosesinde, prosesin başarısı sıvının kontrollü biçimde buharlaşmasını sağlayabilecek olan işletme koşullarına bağlıdır. Bu koşullar arasında gazın sıvıyı çözebilme potansiyeli en önemli kriterdir. İlaç etken maddesi içeren sıvı çözücü sistemiyle basınçlandırılmış gazın kademeli olarak teması sağlandıktan sonra sıvı çözelti sisteminden kontrolü biçimde uzaklaştırılan sıvı çözücü, aktif ilaç etken maddesinin sıvı içindeki çözünürlük dengesini azaltarak partiküllerin oluşumu sağlar. Ancak bu süreçten sonra sentezlenen partiküllerin kurutulması için başka bir proses basamağına daha gereksinim duyulur. Puerarin içerikli fosfolipit kompleksinin oluşturulması için Li ve ark. (2008) GAS prosesini de kullanmışlardır. Yarı sürekli işletim konfigürasyonuna sahip SEDS prosesinin aksine GAS prosesi kesikli işletim konfigürasyonuna sahiptir. Araştırmacılar, ilaç etken maddesi ve fosfolipitleri etanol+kloroform bileşimindeki çözücü sisteminde çözdükten sonra atmosferik koşullardaki başlangıç anında partikül oluşum ünitesine yerleştirmişlerdir. SCCO₂ (10 MPa ve 38 °C) ile kademeli olarak basınçlandırılan ortam, belli bir kalma süresi sonunda çözeltideki organik çözücülerini uzaklaştırılabilmek amacıyla ortama düşük akış hızında taze SCCO₂ beslemesi sağlanmış ve daha sonra ortam basıncı çok yavaş ve kontrollü biçimde düşürülmüştür. Araştırmacılar fosfolipit komplekslerinin oluşumu için GAS prosesinin uygun olmadığını bildirmişlerdir. Bu süreçte akışkan ortamına herhangi bir karıştırma işlemi uygulanmamıştır. Başka bir araştırmada ise Kadimi ve ark. (2007) lipozomal sistemlerde hidrofobik özellikteki ilacın amfoterisin B'nin enkapsülasyonu oluşturulan çift tabaka arasında homojen biçimde dağıtarak gerçekleştirmişlerdir. Başlangıçta atmosfer koşulları altında fosfolipitler, metanol ve kloroform yüksek basınç ünitesine yerleştirilmiş ve daha sonra 15 MPa ve 60 °C koşullarındaki SCCO₂ yüksek basınç ünitesine beslenerek ortamın basınçlandırılması sağlanmıştır. Sıcaklık ve basınç koşulları dengeye geldiğinde lipozomal sistemlerin oluşumu için gerekli sulu tampon çözeltisi basınç altındaki ortama beslenmiş ve daha sonra yüksek basınç ünitesinin basıncı yavaş bir şekilde düşürülmüştür. Bangham yöntemi ile elde edilen ürünler ile karşılaştırıldığında, GAS proses ile morfolojik açıdan daha iyi, daha küçük boyutlarda ve dar boyut dağılımlı lipozomal sistemlerin sentezlendiği bildirilmektedir.

Kunastitchai ve ark. (2006) imidazol antifungal ajan olan mikonazol içeriğine sahip lipozomal formülasyonu gerçekleştirmek için aerosol çözücü ekstraksiyon sistemi (ASES) prosesini kullanmışlardır. İki proses basamağı sonunda lipozomal sistemlerin sentezlenebildiği bu proseste; önce ilaç etken madesi ve fosfodilkolin+kolesterol, metanol+diklormetan ikili sisteminde çözülmüş (iyonik olmayan bir sürfaktan kullanarak ya da kullanmayarak) ve daha sonra bu sıvı karışım 0.4 mm çaplı nozzle sisteminden geçirilerek önceden SCCO₂ (8 MPa ve 35 °C) ile basınçlandırılmış olan yüksek basınç ünitesine püskürtülerek aerosol şeklinde dağılması sağlanmıştır. Aerosoldeki organik çözümler SCCO₂ fazına geçmesi sağlanarak kuru fosfolipit komplekslerinin oluşumu gerçekleştirilir. Organik çözücü kalıntıları giderilebilmek için fosfolipit komplekslerinden SCCO₂ geçirilerek kurutulmuştur. Lipozomal sistemlerin oluşumu için gerekli olan hidrasyon basamağında sentezlenen komplekslere sulu tampon sistemi eklenmiştir. Bu süreçte sıvı ortama düşük bir hızda karıştırılma işlemi uygulanmıştır.

Süperkritik anti-çözücü (SAS) prosesi sürekli işletim konfigürasyona adaptasyonunun sağlanabilmesinin yanı sıra partikül boyut ve dağılımının kontrol edilebilmesi nedeniyle en popüler lipozomal sistemlerinin üretimin gerçekleştirilebileceği bir prosesidir. Sıvı çözücüde çözünen bileşen süperkritik koşullardaki akışkanın yer aldığı yüksek basınç ünitesine bir nozzle sisteminden geçirilerek püskürtülür. SCF ortamı sıvı çözücü ortamı için iyi bir çözücü olmasına karşın partikül oluşumu gerçekleştirilmek istenen maddeler için bir antiçözücü ortamı olarak kullanılır. Sıvı çözücü sistemi SAS prosesine girdiği anda SCF ile aşırı doygunluğa ulaşır. Çözücüsünün çözme gücünden kurtulan bileşen ise hızlı bir çekirdeklenme süreci ile karşı karşıya kalır ve küçük partiküllerin oluşumu gerçekleşir. Badens ve ark. (2001) ve Magnan ve ark. (2000) üç farklı lesitin (PC, PE ve fosfatidilinositol bileşimleri farklı) kullanarak SAS prosesinde lipozomal sistemleri üretmişlerdir. Araştırmacılar 1–40 µm boyut aralığında küresel formda lipozomal sistemler sentezlediklerini ve bunların kısmen aglomere olduğu ve çözücü kalıntısı içermediğini bildirmişlerdir. Lesoin ve ark. (2011) ise 0.1–100 µm boyut aralığında bimodal boyut dağılımlı küresel forma sahip lipozomal sistemleri sentezlediklerini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, konvansiyonel yöntemle kıyasla tekrarlanabilirliği açısından SAS prosesinin daha avantajlı olduğunu vurgulamışlardır.

Naik ve ark. (2010) kanser tedavilerinde yaygın kullanıma sahip kemoterapötik ajan dosetakselin enkapsülasyonu yüzeyleri polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş lipozomal sistemler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada doymuş hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolin (HSPC) ve doymamış (soya PC) fosfolipitleri ile CHOL önce kloroform+metanol ikili sisteminde çözülmüş ve daha sonra lipit çözeltisi bir nozzle sisteminden geçirilerek yüksek basınç ünitesindeki SCCO₂ ortamı içine püskürtülmüştür. SCCO₂'nin sürekli biçimde beslendiği SAS prosesinde öncelikle katı formda fosfolipit kompleksleri sentezlenmiştir. Nozzle sistemi, yüksek basınç ünitesinin geometrik özellikleri gibi proses özelliklerinin tanımlanmadığı bu çalışmada lipozom boyutuna etki eden bazı proses parametreleri (presipitasyon ünitesinin sıcaklık ve basınç koşulları ile sisteme beslenen akışkanların hacimsel akış hızı gibi) ve dar bir aralıkta tanımlanan lipozom bileşimlerinin etkisi incelenmiştir. 200–300 nm boyut aralığında sentezledikleri belirtilen SUV özeliğindeki lipozomal sistemlerin sentezini 22 MPa ve 40 °C koşullarında SCF ortamında sentezlemişlerdir. Ancak belirtilen boyut aralığı LUV özeliğindeki lipozomal sistemlerin tanıma uymaktadır. Araştırmacılar ~%80 enkapsülasyon verimine ulaştıkları lipozomal sistemlerin in vivo çalışmalarda 48 saat süre boyunca ve 4 ay depolama karalılığına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Xia ve ark. (2011) ve Xia ve ark. (2012) sadece HSPC'den yola çıkarak vitamin D₃ ve luteinin SAS prosesinde fosfolipit kompleksini oluşturmuşlardır. Bunun için organik çözücü sisteminde (diklormetan+etanol) çözeltisi hazırlanan fosfolipit, vitamin D₃/luteinin karışımını, 8–10 MPa ve 35–55 °C aralığında belli bir işletme koşulda CO₂ ile basınçlandırılmış yüksek basınç ünitesine eş eksenli bir nozzle sisteminden geçirilerek (iç borunun çapı=0.2 mm ve dış borunun iç çapı=1 mm) püskürtülmüştür. Basınçlı ünite içinde oluşturulan sıvı fazdaki damlacık bileşimindeki organik çözücüler CO₂ fazı ile hızlı biçimde doygunluğa ulaşmasıyla ortalama 200 nm ve dar boyut dağılımına sahip katı ön lipozomal sistemler üretilmiştir. Hidratasyon basamağında ise %90 enkapsülasyon etkinliğine sahip olan lutein için ~500 nm ve Vitamin D₃ için yaklaşık 1 µm boyutlarında lipozomal sistemlerin sentezlenebildiği bildirilmektedir.

Lesoin ve ark. (2010) ve CAS1 (proses tek çıkış akımına sahip) ve Lesoin ve ark. (2011) CAS2 (proses 2 çıkış akımına sahip olarak tanımladıkları tek basamakta lipozom üretimine yönelik sürekli antiçözücü prosesi (CAS) olarak adlandırılan 2 farklı proses geliştirmiştir. CAS1 prosesinde prosese lipozomal sistemlerin üretimi için elzem olan sulu fazın bir kısmı başlangıçta yüksek basınç ünitesine doldurulmakta ve bu süreci CO₂ enjeksiyonu izlemektedir. Organik çözücüde hazırlanan soya lesitin içeren çözelti yüksek basınç ünitesine nozzle siteminden geçirilerek püskürtülmektedir. Bu süreçte sulu faz karıştırılmaktadır. Fazlar dengeye ulaştığında yüksek basınç ünitesinin altındaki çıkış vanası açılarak CO₂ ile birlikte lipozom süspansiyonunun prosten çıkışı gerçekleştirilir. Başlangıçtaki sulu çözeltisinin miktarını korumak amacıyla sisteme sürekli olarak su beslemesi yapılır. CAS2 prosesinin farkı, fazlar dengeye ulaştığında yüksek basınç ünitesi üzerinde yer alan ikinci çıkış hattının açılmasıyla CO₂+organik çözücünün bu hattan ayrılması sağlanırken alt akım çıkışından sentezlenen lipozomal sistemin süspansiyonunun çıkışı sağlanır. CAS prosesleri ile sentezlenen lipozomların ortalama çapları 0.1–1.2 µm arasında değişmektedir.

Süperkritik ters faz evaporasyon (SCRPE) prosesinin başarısı işletme sıcaklığına bağlı olduğundan işletme sıcaklığı SCCO₂ ortamında tamamen çözünmesi hedeflenen lipidlerin faz geçiş sıcaklıklarından daha yüksek olmalıdır. SCRPE prosesi ile lipozomal sistemlerin üretimine yönelik ilk çalışma Otake ve ark. (2001) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar değişken hacimli yüksek basınç sistemini önce CO₂ ile basınçlandırmış ve daha sonra etanol içinde çözünmüş dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) çözeltisi eklenmiştir. Proseste istenen basınç ve sıcaklık koşulları sağlandıktan sonra sulu glukoz çözeltisinin tamamen yüksek basınç sistemine beslenir. Bu süreç sonunda değişken hacimli yüksek basınç sisteminin hacmi değiştirilerek ortam basıncının azalması sağlanır. Bu süreçle birlikte lipozomal sistemler sentezlenir. Bu yöntem ile %25 enkapsülasyon verimine ulaşan araştırmacılar 100–200 nm boyutlu lipozomal sistemler sentezlemişlerdir. Lipofilik özellikteki kolesterol ile gerçekleştirdikleri çalışmalarda ise % 63 enkapsülasyonu verimliliğine ulaşılmıştır. Imura ve ark. (2002) aynı proses ile lipozomal sistemleri fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidik asit içeren farklı soya lesitinleri kullanarak sentezlemiştir. Proses işletme koşulları 20 MPa/60 °C olup belirtilen değerleri

Otake ve ark. (2001) tarafından belirlenmiş optimum koşullardır. Kullanılan lesitin bileşiminin farklı olması ve bunların SCCO₂ ortamındaki değişen çözünürlükleri nedeniyle şekil (küresel ya da elips şekline sahip) ve boyutları (0.1–1.2 µm) farklı özellikte olan lipozomal sistemlerin sentezine yol açmıştır. Konuya ilişkin önceki araştırma bulgularına bağlı olarak, Imura ve ark. (2003) sentezledikleri lipozomal sistemler stabilitesini geliştirmek ve glukozun enkapsülasyon verimini artırmak için farklı derişimlerde dioleoilfosfatidilkolin (DOPC) ve DSPC bileşimine sahip lipidlerden yola çıkarak lipozomal sistemlerin sentezini 60 °C'de 130–30 MPa basınç aralığında gerçekleştirmişler ve önceki çalışmalarına kıyasla enkapsülasyon verimini 2 kat arttırmışlardır. Otake ve ark. (2006a) ve Otake ve ark. (2006b) SCRPE prosesi ile sentezledikleri lipozomal sistemlerdeki enkapsülasyon verimini arttırmak için prosesi geliştirmişlerdir. Geliştirilmiş SCRPE prosesinde lipozomal sistemler yine gözlem pencerele değişken hacimli yüksek basınç ünitesinde üretilmiştir. Ancak organik çözücünün yer almadığı bu süreçte, homojen olmayan fosfolipit karışımı ve glukoz çözültisi başlangıçta değişken hacimli yüksek basınç ünitesinde yerleştirilmiştir. Hücre içindeki ortam manyetik bir karıştırma etkisinde olup yukarıda belirtilen basınç ve sıcaklık koşullarındaki SCCO₂ ile basınçlandırılmıştır. Yüksek basınç sisteminin hacmi kontrollü bir şekilde arttırılarak ortam basıncı yavaş yavaş azaltılmıştır. Bu süreçle birlikte ortalama 1.5 µm çaplı lipozomal sistemler sentezlenmiştir.

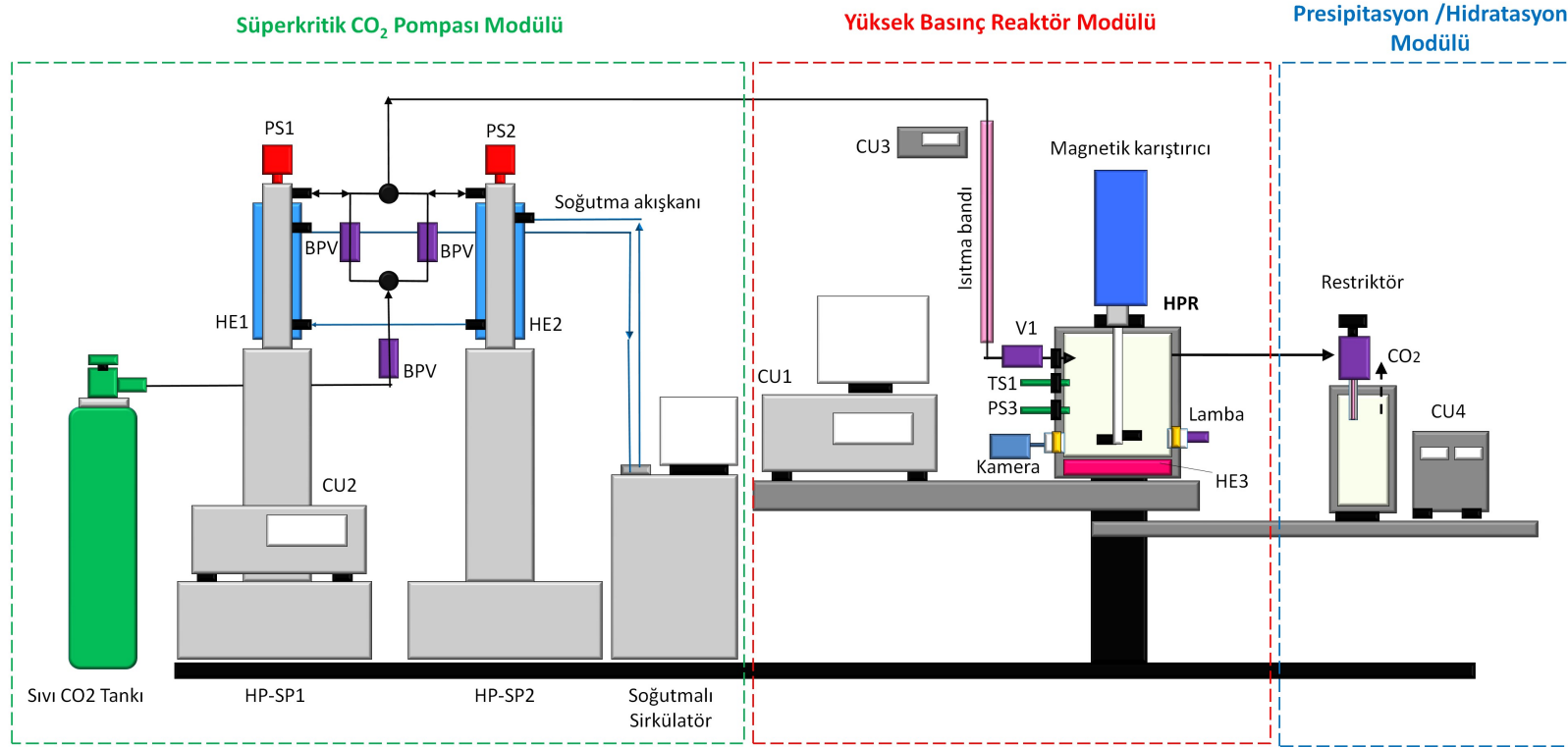
2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Yüksek lisans tez projesi kapsamında lipozomal bileşiklerin üretiminde L- α -fosfatidilkolin (Sigma 44924) kullanılmıştır. Anyonik yüzey aktif madde olarak 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfo-rac-(1-glisero) sodyum tuzu (DPPG, Sigma 50984), kationik yüzey aktif madde olarak dimetildioktadesilamonyum bromür (DDAB, Sigma D2779) kullanılmıştır. Lipozomal bileşiklerin stabilitesini korumak amacıyla kolesterol (Sigma C8667, Saflık %99) kullanılmıştır. Lipozomal bileşiklerin ölçümünde kullanılan lipitlerin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla kloroform (Sigma 288306 Saflık %99) ve metanol (Merck 288306 maksimum %0.003 H₂O) kullanılmıştır. Süperkritik koşullardaki akışkan ortamının oluşturulmasında saflık derecesi %99 olan 55 bar basınç koşullarında sıvı CO₂ (Günaylar Sınai ve Tıbbi Gaz Dolum ve Üretim Tesisi, Sivas) kullanılmıştır. Tüm sulu çözeltilerin hazırlanmasında iletkenlik değeri 18.2 M Ω cm-1 olan Milli-Q su (Milli-Q Gradient Model, Millipore, ABD) kullanılmıştır.

2.2 Lipozomal Sistemlerin Üretimi

Süperkritik çözeltilerin ani genişmesi (RESS, Rapid Expansion of Supercritical Solutions) prosesi ve bir sıvı çözücü içinde süperkritik akışkanın ani genişmesi (RESOLVE, rapid expansion of supercritical solution into a liquid solvent) prosesleri kullanılarak lipozomal sistemlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. RESS ve RESOLVE prosesleri için akım şeması Şekil 2.1'de gösterilen bir süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemi (ISCO Marka SFX220 Model ISCO Inc., ABD) ve bir de yüksek basınç reaktör sisteminin (RW100 Model, Thar Process Inc., ABD) modifiye edilmesiyle tasarlanan sistemler kullanılmıştır. RESS ve RESOLVE prosesleri temel olarak proste çözücü olarak kullanılacak olan SCCO₂'in üretimin yer aldığı *süperkritik CO₂ pompası modülü*, lipitsel materyallerin SCCO₂ ortamında doygun çözeltisinin sağlandığı *yüksek basınç reaktör reaktörü modülü* ve SCCO₂'de lipitsel materyallerin doygun çözeltisinin ani genişmesi sonucu oluşturulan ön lipozomal formların üretimi ya da genişlemenin doğrudan tampon ortamında gerçekleştirildiği süreçleri içeren *presipitasyon ya da hidrasyon modülünden* oluşmaktadır.



Şekil 2.1 Modifiye RESS ve RESOLVE proseslerinin akım şeması (BPV: Geri basınç azalması kontrol vanası, CU: Kontrol ünitesi HE: Isı değitirici, HPR: Yüksek basınçlı reaktör, HP-SP: Yüksek basınç şırınga pompası, PS: Basınç sensörü, TS: Sıcaklık sensörü, V: İğne uçlu vana).

Süperkritik CO₂ pompası modülü: Sıvı CO₂ tankındaki akışkanın basınçlandırılarak yüksek basınç tank reaktör (HPR) sistemine aktarımı her biri 103.12 mL hacimli ve paralel işletim konfigürasyonuna sahip 2 adet yüksek basınç şırınga pompası (ISCO 100DX Model, ISCO Inc., ABD) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Pompa silindirlerin (HP-SP1 ve HP-SP2) dış yüzeyleri ceket tipi ısı değiştiriciler (HE1 ve HE2) ile donatılmıştır. CO₂'in basınçlandırılması aşamasında, silindirlerdeki hacimsel verimi artırmak amacıyla 4 °C sıcaklığındaki soğutma akışkanı (%50 propilen glikol ve %50 deiyonize su karışımı) bir sıcaklık kontrolü sirkülatör (HAAKE Phoenix II P2-C25P Model circulator, Thermo Elektron Co., İngiltere) yardımıyla sürekli olarak ısı değiştiricilerden geçirilir. Şırınga pompalardaki basınç sensörlerinden (PS1 ve PS2) alınan bilgiler doğrultusunda silindirlerdeki akışkanın basıncı pompa kontrol (CU1) ünitesinden ±1 bar hassasiyetle 680 bar'a kadar ayarlanabilmektedir. Aynı zamanda, pompa kontrol ünitesinden, basınçlandırılmış CO₂'in HPR'ye kontrolü biçimde transferini de ±0.001 mL/dk hassasiyetle gerçekleştirebilmektedir. HP-SP1 ve HP-SP2 yardımıyla incelenecek basınç koşuluna basınçlandırılmış olan 4 °C'deki CO₂'in HPR sistemine transferi kontrol ünitesi CU1 yardımıyla gerçekleştirilir.

Yüksek basınç reaktör modülü: Basınçlandırılmış CO₂'in HPR sistemine transferi işlemi 10 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Basınçlandırılmış soğuk CO₂'in incelenecek sıcaklık koşuluna ulaşabilmesi için yüksek basınç şırınga pompa sistemlerinin çıkış konumu ile HPR ünitesinin giriş konumları arasındaki transfer hattı ısıtma bandı ve bir K-tipi termoçift ile donatılmıştır. Termoçiftten alınan bilgi doğrultusunda ±1 °C hassasiyetle transfer hattından geçirilen 4 °C'deki basınçlandırılmış CO₂'nin istenilen çalışma sıcaklığına ulaşması sıcaklık kontrol ünitesi (CU2) (Brisk-Heat Corporation, SDC240KC-A Model, OH, ABD) yardımıyla sağlanmıştır. Paslanmaz çelikten (316 SS) imal edilmiş olan yüksek basınç reaktörün gövdesinde aralarında 90° açı bulunan iki safir cam pencere bulunmaktadır. Pencerelere monte edilmiş aydınlatmalı kamera sistemi yardımıyla reaktör içindeki değişimler *on-line* olarak monitörden gözlemlenebilmektedir. HPR sisteminin ortam sıcaklığının kontrolü kontrol ünitesi yardımıyla (CU3) sağlanmaktadır. Reaktör gövdesinin tabanına yer alan elektrikli ısı değiştirici ve reaktör iç bölümüne monte edilmiş J-tipi termoçiftten alınan bilgiler doğrultusunda ortam sıcaklığını ±1 °C hassasiyetle 100 °C'a kadar ayarlanabilmektedir.

HPR sistemi 4-bıçaklı ve 45° açılı eğik türbin tipi mekanik karıştırıcı içeren manyetik karıştırıcı (CROSCHOFF, PM6015 Model, ABD) ile donatılmış olup CU3 sistemin kontrol paneli üzerindeki potansiyometre yardımıyla karıştırma hızı 0–2400 rpm aralığında istenilen değere ayarlanabilmektedir.

Presipitasyon / hidrasyon modülü: Araştırma kapsamında lipozomal sistemlerin sentezi öncesi lipitlerin SCCO₂ ortamındaki doygun çözeltisi HPR ünitesinde Çizelge 2.1'de belirtilen CO₂'in belli bir işletme basıncı ve işletme sıcaklığı koşulunda hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1 RESS ve RESOLVE prosesi işletme parametreleri ve koşulları

Parametre	İşletme koşulları
İşletme basıncı	10, 20, 30 MPa
İşletme sıcaklığı	50°C
SCCO ₂ akış hızı	0.5 mL/dakika
Restriktör sıcaklığı	60 °C
Genleşme ortamı sıcaklığı	15 °C

2.2.1 RESS prosesi ile lipozomal sistemlerin üretimi

Bu yöntemde lipozomal sistemler üretilirken sistemin fosfolipit tabakası oluşturan yani PC+kolesterol bileşimi anyonik lipozomal sistemlerin üretiminde Çizelge 2.2'de ve katyanoik lipozomal sistemlerin üretiminde ise Çizelge 2.3'de belirtilen değerlerde sabit tutulmuştur. İncelenen her bir iyonik lipozomal sistem için öncelikle belirtilen miktarlardaki PC+kolesterol HPR sistemine eklenmiştir. Lipitlerin SCCO₂ içinde çözünürlüğü düşük olduğundan; anyonik lipozomal sistemlerin üretimlerinde kloroform/metanol oranı 5/1 olacak şekilde ve katyonik lipozomal sistemlerin üretimlerinde kloroform/metanol yardımcı çözücü oranı ise 2/1 olacak şekilde 3 mL yardımcı çözücü HPR sistemine eklenmiştir. Deneylerde geri soğutucu sıcaklığı 4 °C'ye, HPR ünitesinin sıcaklığı 50 °C'ye ve restriktör sisteminin sıcaklığı ise 60 °C'a ayarlanmıştır. Kontrol ünitesine Çizelge 2.1'de belirtilen işletme basıncının değeri girildikten sonra HP-SP1 ve HP-SP2'deki CO₂'in basınç koşulları istenilen değere getirilmesi sağlanmıştır. Basınç ve sıcaklık değerleri dengeye geldikten sonra HPR içinde lipit+organik çözücünden oluşan karışımın 2 saat süreyle 200 rpm koşullarında

karıştırılarak SCF içinde doymun lipit çözeltisi hazırlanmıştır. 60 °C koşullarındaki sıcaklık ve akış hızı kontrollü restriktörün 50 µm çapa sahip nozzle içinden doymun lipit çözeltisinin 0.5 mL SCF/min akış hızında geçişine izin verilmiştir. Bu süreçte süperkritik koşullardaki doymun lipit çözeltisinin atmosferik koşullarda ani olarak 5 mL hacimdeki 100 mM pH=7.2 PBS tamponu içinde genişmesi sağlanmıştır. Yüksek lisans tez projesi kapsamında, fosfolipit çift tabaka dış yüzey modifikasyonunu için yüzeyin iyonik özelliğine bağlı olarak farklı derişimlerde iyonik madde derişiminin etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda, Çizelge 2.2'de derişimleri belirtilen anyonik özellikteki DPPG'nin PBS ortamında ve Çizelge 2.3'de belirtilen derişimlerdeki katyonik özellikteki DDAB gibi yüzey aktif maddelerin bulunduğu tampon ortamlarında lipozomal sistemleri hidrasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Süperkritik akışkan enjeksiyon yöntemi olarak da adlandırılan bu süreç RESS prosesi olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 2.2 RESS prosesi ile anyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi

PC (mg)	Kolesterol (mg)	DPPG (mg)	Yardımcı çözücü (V _{kloroform} /V _{metanol})	V _{PBS} (mL)	C _{DPPG} (mg/mL)
32.5	5	6.25	5/1	5	1.25
32.5	5	12.5	5/1	5	2.5
32.5	5	25	5/1	5	5

Çizelge 2.3 RESS prosesi ile anyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi

PC (mg)	Kolesterol (mg)	DDAB (mg)	Yardımcı çözücü (V _{kloroform} /V _{metanol})	V _{PBS} (mL)	C _{DDAB} (mg/mL)
32.5	5	6.25	2/1	5	1.25
32.5	5	12.5	2/1	5	2.5
32.5	5	25	2/1	5	5

2.2.2 RESOLVE prosesi ile lipozomal sistemlerin üretimi

RESOLVE prosesi ile lipozomal sistemler üretilirken sistemin fosfolipit tabakasını oluşturacak olan PC+kolesterol bileşimlerinin yanı sıra anyonik lipozomal sistemlerin üretiminde Çizelge 2.4'de ya da katyanoik lipozomal sistemlerin üretiminde ise Çizelge 2.5'de belirtilen değerlerdeki yüzey aktif maddesinin belirtilen derişiminde eş anlı olarak HPR sistemine eklenmiştir.

Çizelge 2.4 RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi.

PC (mg)	Kolesterol (mg)	DPPG (mg)	Yardımcı çözücü (V _{kloroform} /V _{metanol})	V _{PBS} (mL)	C _{DPPG} (mg/mL)
32.5	5	6.25	5/1	5	1.25
32.5	5	12.5	5/1	5	2.5
32.5	5	25	5/1	5	5

Çizelge 2.5 RESOLVE prosesi ile katyonik lipozomların hazırlanmasında kullanılan ortam bileşimi.

PC (mg)	Kolesterol (mg)	DDAB (mg)	Yardımcı çözücü (V _{kloroform} /V _{metanol})	V _{PBS} (mL)	C _{DDAB} (mg/mL)
32.5	5	6.25	2/1	5	1.25
32.5	5	12.5	2/1	5	2.5
32.5	5	25	2/1	5	5

Anyonik lipozomal sistemlerin üretimlerinde kloroform/metanol oranı 5/1 olacak şekilde ve katyonik lipozomal sistemlerin üretimlerinde kloroform/metanol yardımcı çözücü oranı ise 2/1 olacak şekilde 3 mL yardımcı çözücü HPR sistemine eklenmiştir. Deneyleerde geri soğutucu sıcaklığı 4 °C'ye, HPR ünitesinin sıcaklığı 50 °C'ye ve restriktör sisteminin sıcaklığı ise 60 °C'a ayarlanmıştır. Kontrol ünitesine Çizelge 2.1'de belirtilen işletme basıncının değeri girildikten sonra HP-SP1 ve HP-SP2'deki CO₂'in basınç koşulları istenilen değere getirilmesi sağlanmıştır. HPR sistemine SCCO₂ girişi kesildikten sonra istenilen işletme basıncı ve sıcaklık değerlerlerinde ortamdaki maddelerin denge çözünürlüğüne gelmesi için HPR içinde lipit+organik çözücü+yüzey

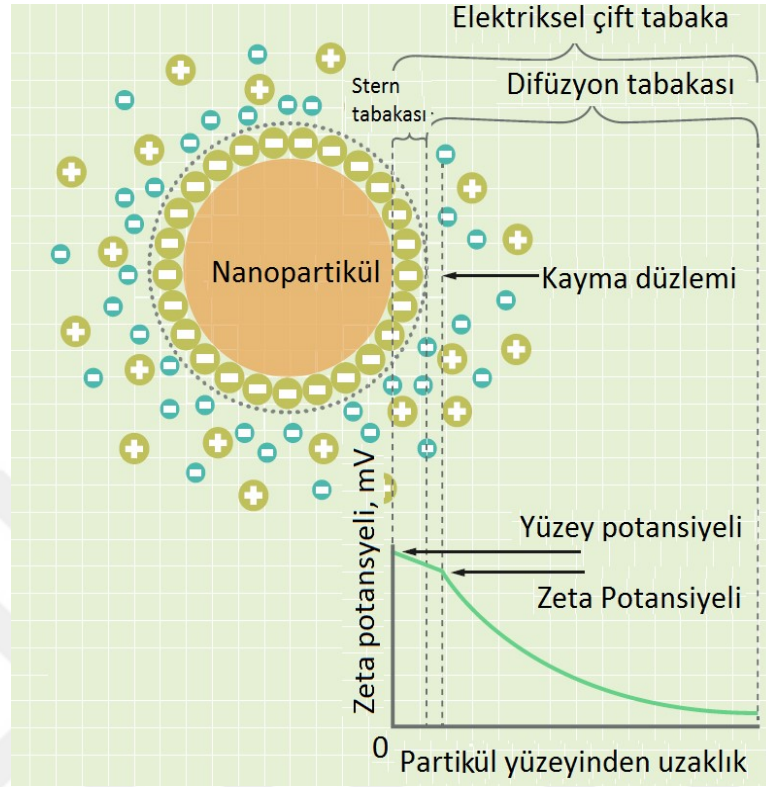
aktif maddelerinden oluşan karışımın 2 saat süreyle 200 rpm koşullarında karıştırılarak SCF içinde doygun lipid çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, 60 °C koşullarındaki sıcaklık ve akış hızı kontrollü restriktörün 50 µm çapa sahip nozzle içinden sadece SCCO₂+organik çözücünün 0.5 mL/min akış hızında geçişine izin verilerek HPR ortam basıncının atmosferik koşullara indirgenmesi sağlanmıştır. Atmosferik koşullar altında, HPR ortamına 5 mL hacimde 100 mM pH=7.2 PBS tamponu eklenerek ön lipozomal formların hidrasyon süreçleri başlatılmıştır. Bu süreçte HPR ortamı basıncı 5.5 MPa koşulundaki CO₂ ortam ile basınçlandırıldıktan sonra tüm bileşenler 1 dakika süreyle 700 rpm koşullarında karıştırılmıştır. Basıncın atmosferik koşullara indirgenmesinin ardından üretilen lipozomlar reaktör ortamından örnek toplama kaplarına alınmıştır.

2.3 Lipozomal Sistemlerin Boyut Dağılımı ve Zeta Potansiyellerinin Analizi

Lipozomların ortalama hidrodinamik boyut dağılımları ve zeta potansiyelleri Şekil 2.2'de gösterilen Zetasizer Nano ZS cihazında (Malvern Instruments Ltd., Zetasizer Nano ZS Model, İngiltere) analizlenmiştir.



Şekil 2.2 Malvern Zetasizer Nano ZS partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm cihazı.



Şekil 2.3 Negatif yüklü partikül ile yığın arasındaki iyon dağılımı.

Denklem (2.1)'deki iyonik gerilim değeri elektroliti oluşturan iyonların derişim ve yük değerlikleri ile ilgili olup Denklem (2.2)'den hesaplanır.

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2000 e^2 I N}} \quad (2.1)$$

Burada;

- ϵ_0 : Boşluğun geçirgenliği (8.854×10^{-12} C/Vm)
- ϵ_r : Sıvının bağıl geçirgenliği (veya dielektrik sabiti, 78.5)
- k_B : Boltzmann sabiti (1.38×10^{-23} J K⁻¹)
- T : Mutlak sıcaklık (K)
- e : Elektronik yük (1.6022×10^{-19} C),
- I : İyonik gerilim (mol/L)
- N : Avogadro sayısındır. (6.02×10^{23})

$$I = \frac{\sum z_i^2 C_i}{2} \quad (2.2)$$

Burada;

- z_i : İyonun yük değeri
 C_i : İyon derişimidir (mol/L)

Katı yüzey ile yığın arasında oluşan potansiyel fark, Stern tabakasında partikül yüzeyinden uzaklaştıkça doğrusal bir şekilde azalırken, difüz tabakada bu azalma üstel olarak devam eder ve bu şekilde bir potansiyel eğrisi oluşur. Partikül sıvı içinde hareket ettiğinde Stern tabakası kayar ve bir kayma düzlemi oluşur. Kayma düzleminin potansiyel eğrisini kestiği nokta zeta potansiyelini verir ve bu değer partikülün elektriksel özelliklerini belirlemek için kullanılır. Zeta potansiyeli ölçümünde hareket sebebiyle ya da hareket sonucunda oluşan elektrik alanda yüklü yüzeyin ve onu çevreleyen sıvının hareketini içerecek şekilde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Tampon çözelti içindeki lipozomlara bir elektriksel alan uygulanarak lipitsel nanopartiküller oluşturulan elektriksel alanda zeta potansiyelleriyle ilişkili bir hızda taşınırlar.

Lazer doppler mikroeletroforez (Laser Doppler Micro-electrophoresis) zeta potansiyeli ölçümünde kullanılmaktadır. Faz analizi ışık saçılımı (PALS, Phase Analysis Light Scattering) olarak adlandırılan lazer interferometrik tekniği kullanılarak bu hız ölçülür. Bu elektroforetik hareket zeta potansiyelinin belirlenmesinde kullanılır. Bu analizler polikarbonat ve altın kaplı elektrodu bulunan disposable (tek kullanımlık) zeta potansiyeli ölçüm hücresinde 25 °C sıcaklık koşullarında gerçekleştirilmiştir. Zetasizer NanoZS cihazında zeta potansiyeli ölçümü PALS yöntemine göre yapılmaktadır. Partiküllerin zeta potansiyeli değerleri, ölçülen elektroforetik hareketlilik yardımı ile Denklem (2.3)'de tanımlanan Henry denklemi kullanılarak hesaplanır. Laouini ve ark., (2012) zeta potansiyeli +30 mV değerinden daha yüksek veya -30 mV değerinden daha düşük olan parçacıklarının bulunduğu çözelti ortamında kararlı olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir.

$$\mu_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (2.3)$$

Denklemden;

- μ_E : Elektroforetik hareketlilik ($8.854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$)
 ε : Ortamın dielektrik sabiti (78.5),
 ζ : Zeta potansiyeli (mV)
 η : Ortamın viskozitesi (0.8872 cP)
 $f(\kappa a)$: Henry fonksiyonudur.

κ ; elektriksel çift tabaka kalınlığının/Debye uzunluğunun tersi, a ; partikül yarıçapıdır. Çift tabaka kalınlığının partikül boyutundan daha küçük olduğu varsayımını kullanan Smoluchowski yaklaşımı ile $f(\kappa a)=1.5$ değeri alınarak zeta potansiyeli değeri polar çözücüler için hesaplanabilmektedir (Bahadır, 2012).

Zetasizer NanoZS cihazında dinamik ışık saçılımı (DLS, Dynamic Light Scattering) tekniği ile lipozomal sistemlerin boyutsal özellikler analizlenmiştir. Hidrodinamik boyut dağılımı analizleri 100 mM pH=7.2 koşullarındaki sodyum fosfat tamponu içerisinde oluşan lipozomların 12.6° ve 173° gibi iki farklı açıdan ışın gönderilmesi ile belirlenmiştir. Analiz tekniğinde He-Ne lazer ışın kaynağından sağlanan monokromatik bir ışın demetinin 25°C 'da sulu ortamda disperse olmuş çözelti üzerine gönderilmesi ve çözeltideki Brownian hareketi yapan partiküllere çarparak 633 nm dalga boyunda 4 mW'luk ışında bir doppler kaymasına neden olması sonucunda gelen ışının dalga boyundaki değişimin ölçümü prensibine dayanmaktadır. Partikül boyut dağılımı ya da zeta potansiyelinin belirlenmesinde Non-Invasive Back Scatter (NIBS) tekniği kullanılmıştır. Analizlerde ortamın viskozite değeri 0.8872 cP ve kırılma indisi 1.33 olarak alınmıştır. Partiküllerin hidrodinamik boyutu Denklem (2.4) ile verilen Stokes-Einstein denkleminden hesaplanmaktadır. DLS tekniği ile belirtilen boyutsal özellikler analizlenmiştir.

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (2.4)$$

Burada;

$d(H)$: Hidrodinamik yarıçap/boyut (nm),

k_B : Boltzmann sabiti ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

T : Mutlak sıcaklık (K)

η : Viskozite (cp)

D : Difüzyon katsayısıdır (cm^2/s)

Analizlenen örneğin zeta potansiyeli, partikül boyut dağılımı ve ortalama hidrodinamik çapı (D_H) bilgisayar yazılımından (Malvern Instruments Ltd., Zetasizer Software 6.20) otomatik olarak belirlenmiştir.

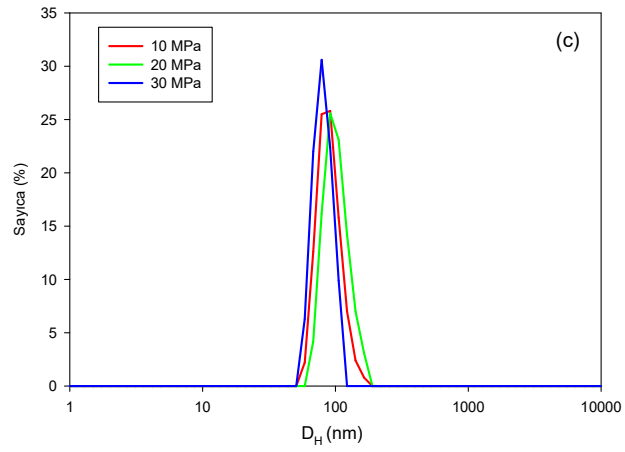
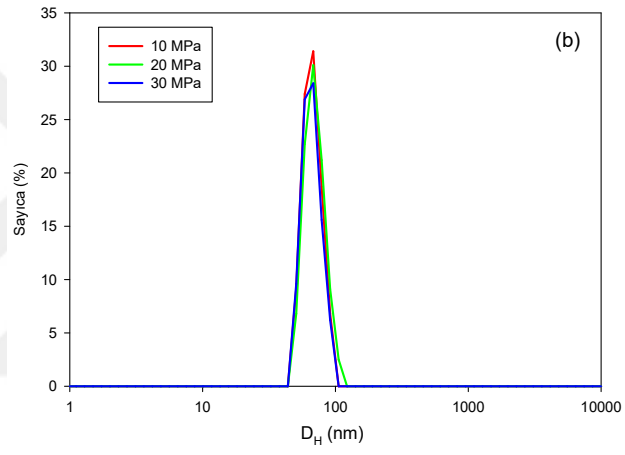
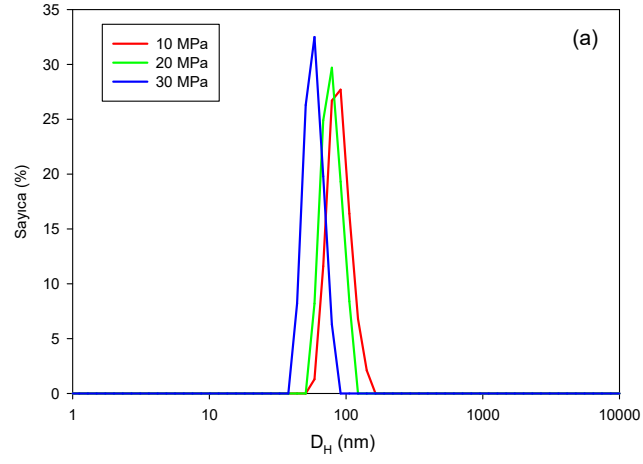
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

3.1 RESS Prosesiyle Anyonik ve Katyonik Lipozomların Tasarımında Boyut Dağılımına İşletme Basıncının Etkisi

3.1.1 Anyonik lipozomal sistemler

RESS prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin tasarımında lipozomların boyut dağılımlarına işletme basıncının etkisi (10-30 MPa), anyonik yüzey aktif madde DPPG derişiminin; $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu koşullarda incelenmiştir. Elde edilen ön lipozomal formların 5 mL 100 mM PBS tamponunda gerçekleştirilen hidrasyonu sonunda elde edilen lipozomların boyut dağılım analizleri Şekil 3.1(a-c)'de gösterilmiştir.

$C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda, işletme basıncının artması ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyut dağılımın daha küçük hidrodinamik çapa (D_H) sahip lipozomların tasarlanabileceğini göstermektedir. Boyut dağılım analizleri incelendiğinde, tasarlanan lipozomların boyutlarının; 10 MPa için 59-142 nm, 20 MPa için 59-106 nm ve 30 MPa için 44-79 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise işletme basıncının tasarlanan lipozomların boyut dağılımında önemli bir etkisinin olmadığı ve genel olarak sık boyut dağılımına sahip lipozomların tasarlanabildiği görülmektedir. Ancak lipozomların boyut dağılım analizleri incelendiğinde; 10 MPa'da 51-91 nm, 20 MPa'da 51-106 nm ve 30 MPa'da 10-91 nm arasında bir boyut dağılım aralığına sahip lipozomal sistemlerin elde edildiği saptanmıştır. $C_{DPPG}=5$ mg/mL koşulunda da işletme basıncının tasarlanan lipozomların boyut dağılımında hemen hemen önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Ancak lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde boyut dağılımlarının; 10 MPa için 59-164 nm, 20 MPa için 68-164 nm ve 30 MPa için 59-106 nm arasında değiştiği saptanmıştır.

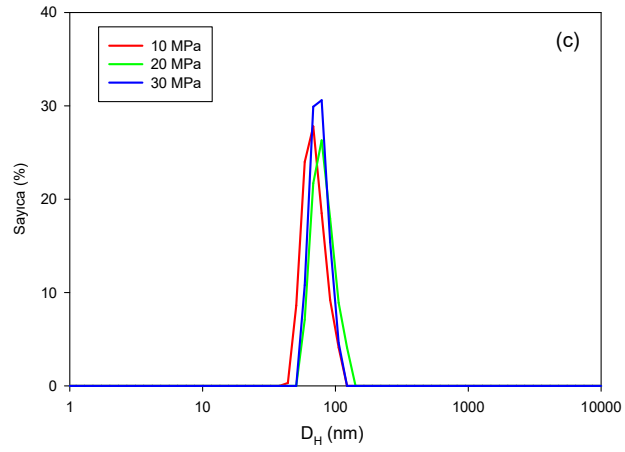
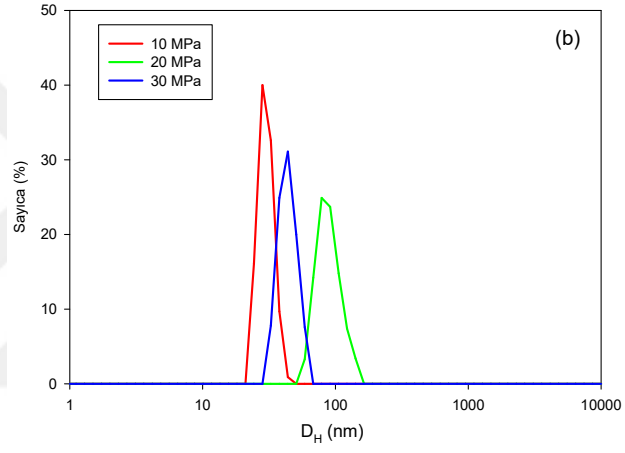
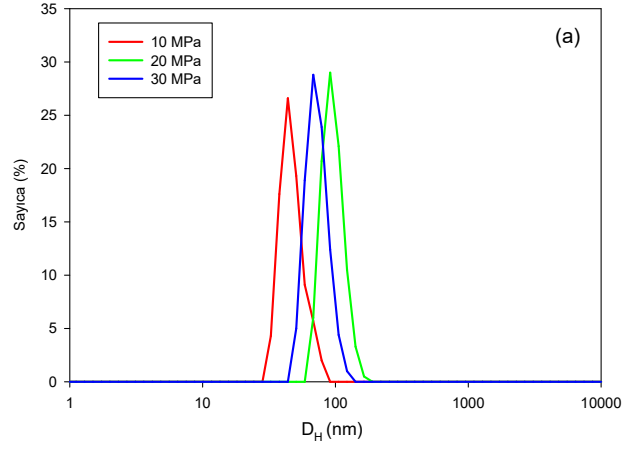


Şekil 3.1 RESS prosesi ile anyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi:
(a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.

3.1.2 Katyonik lipozomal sistemler

RESS prosesi ile katyonik lipozomal sistemlerin tasarımında lipozomların boyut dağılımlarına işletme basıncının etkisi (10-30 MPa), katyonik yüzey aktif madde DDAB derişiminin; $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL ve $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşullarda incelenmiştir. Elde edilen ön lipozomal formların 5 mL 100 mM PBS tampon ortamında gerçekleştirilen hidrasyonu sonucu elde edilen lipozomların hidrodinamik boyut dağılım analizleri Şekil 3.2(a-c)'de gösterilmiştir.

$C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda, işletme basıncının artması sonucu tasarlanan lipozomların hidrodinamik boyutlarının önce arttığı daha sonra sonra azaldığı görülmektedir. Bu koşullarda lipozomal sistemlerin boyut dağılım analizleri incelendiğinde, lipozom boyutlarının 10 MPa'da 33-68 nm, 20 MPa'da 79-164 nm ve 30 MPa'da 59-106 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda da işletme basıncının artması ile tasarlanan lipozomların hidrodinamik boyutu önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Bu koşullarda elde edilen lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde; 10 MPa için 24-44 nm, 20 MPa için 59-142 nm ve 30 MPa için 33-59 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Düşük ve yüksek basınç koşullarında sık boyut dağılıma sahip lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilirken, orta basınç koşulunda daha geniş bir boyut dağılımına sahip lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. $C_{DDAB}=5$ mg/mL koşulda ise işletme basıncının tasarlanan lipozomların boyutunda hemen hemen önemli bir değişimin olmadığı görülmektedir. Bu değişim lipozomların boyut dağılımı analizleri ile de doğrulanmaktadır. Boyut dağılım analizleri incelendiğinde lipozomal sistemlerin 10 MPa'da 44-122 nm, 20 MPa ve 30 MPa'da 59-122 nm arasında değiştiği saptanmıştır.



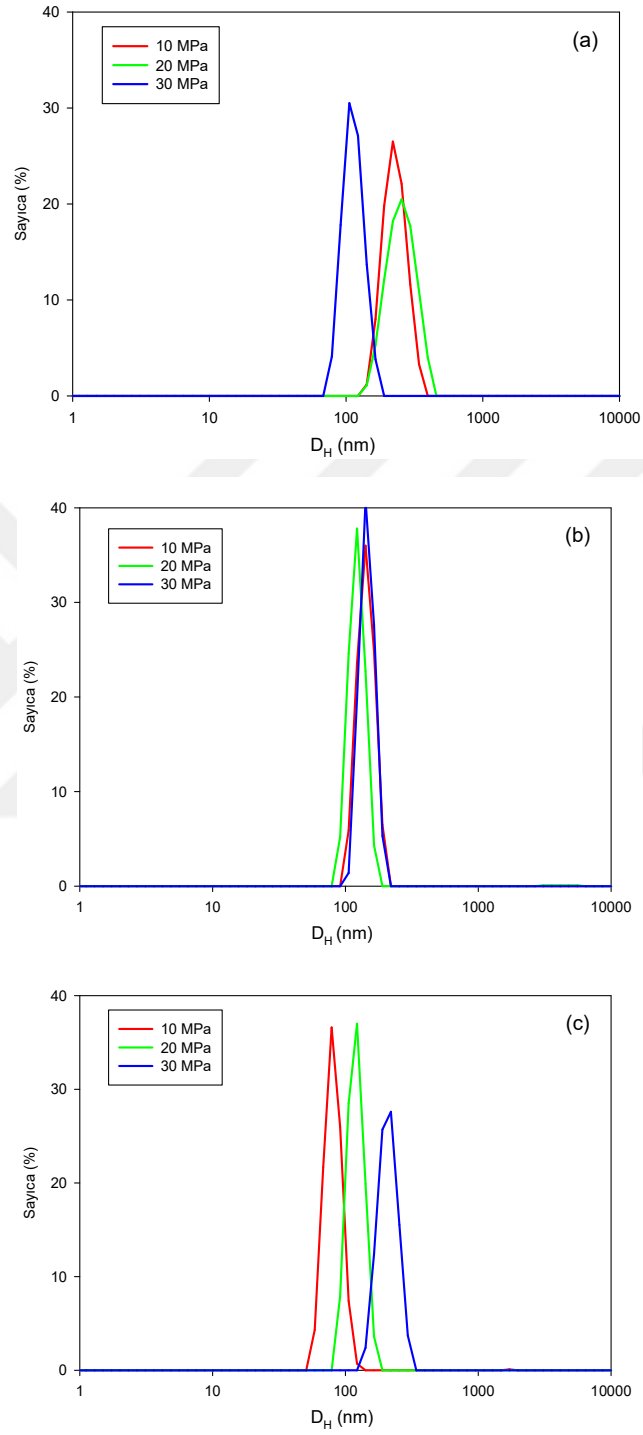
Şekil 3.2 RESS prosesi ile katyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi:
 (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.

3.2 RESOLVE Prosesiyle Anyonik ve Katyonik Lipozomaların Tasarımında Boyut Dağılıma İşletme Basıncının Etkisi

3.2.1 Anyonik lipozomal sistemler

RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin tasarımında lipozomların boyut dağılımlarına işletme basıncı (10-30 MPa) etkisi, anyonik yüzey aktif madde DPPG derişiminin; $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu koşullarında incelenmiştir. Elde edilen ön lipozomal formların 5 mL 100 mM PBS tamponunda gerçekleştirilen hidrasyonu sonunda elde edilen lipozomların boyut dağılım analizleri Şekil 3.3(a-c)'de gösterilmiştir.

$C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda, işletme basıncının artması sonucu hidrodinamik boyut dağılımın 10 MPa ve 20 MPa koşullarında hemen hemen benzer olduğu ancak 20 MPa üzerindeki koşullarda ise tasarlanan lipozomların hidrodinamik boyutlarının azaldığı görülmektedir. Boyut dağılım analizleri incelendiğinde, tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutlarının 10 MPa için 142-342 nm, 20 MPa için 142-342 nm ve 30 MPa için 79-164 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Bu koşullarda boyut dağılımlarının geniş bir aralıkta olduğu görülmektedir. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL koşullarında ise işletme basıncının tasarlanan lipozomların boyut dağılımında önemli bir etkisinin olmadığı ve genel olarak sık boyut dağılımına sahip lipozomal sistemlerin tasarlanabildiği görülmektedir. Ancak lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde; 10 MPa için 106-190 nm, 20 MPa için 91-164 nm ve 30 MPa için 106-190 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DPPG}=5$ mg/mL koşullarında ise işletme basıncının artması sonucu lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarında artış görülmektedir. Boyut dağılım analizleri incelendiğinde, tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutlarının 10 MPa için 59-122 nm, 20 MPa için 91-164 nm ve 30 MPa için 142-295 nm arasında değiştiği saptanmıştır.

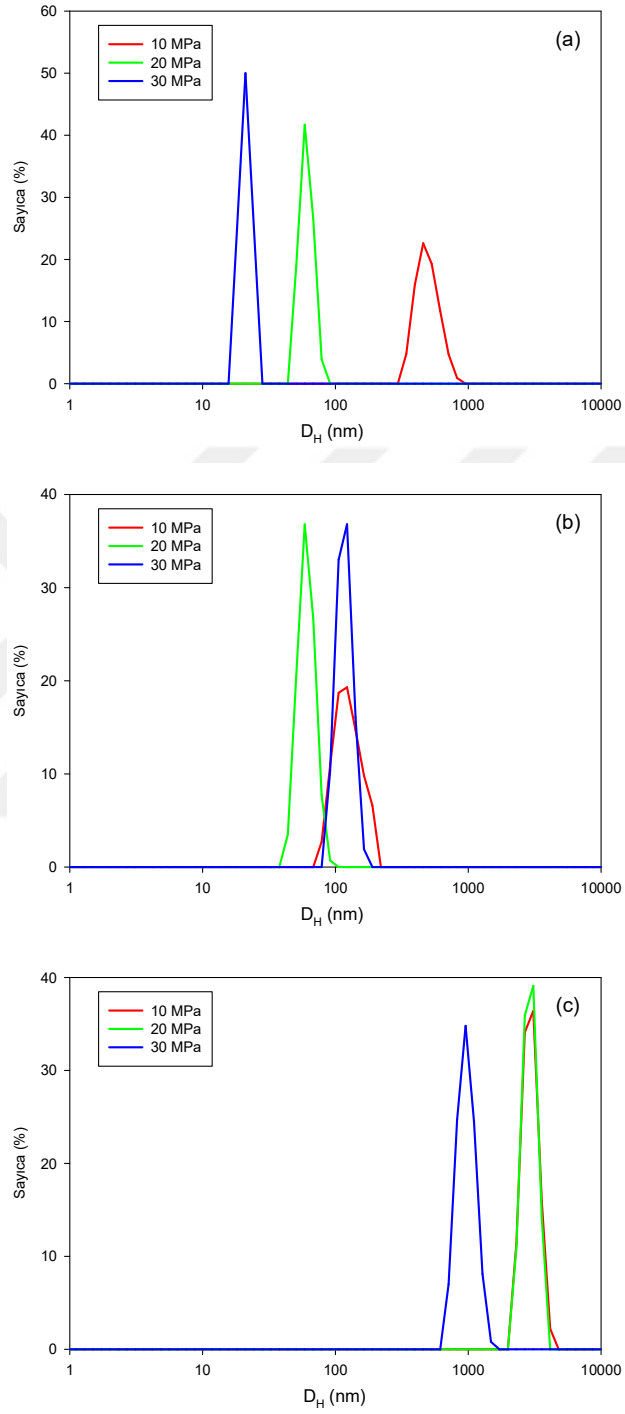


Şekil 3.3 RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi:
 (a) $C_{DPPG} = 1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG} = 2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG} = 5$ mg/mL.

3.2.2 Katyonik lipozomal sistemler

RESOLVE prosesi ile katyonik lipozomal sistemlerin tasarımı lipozomların boyut dağılımlarına işletme basıncı (10-30 MPa) etkisi, anyonik yüzey aktif madde DDAB derişiminin; $C_{DDAB}=6.25$ mg/mL, $C_{DDAB}=12.5$ mg/mL ve $C_{DDAB}=25$ mg/mL olduğu koşullarında incelenmiştir. Elde edilen ön lipozomal formların 5 mL 100 mM PBS tamponunda gerçekleştirilen hidrasyonu sonunda elde edilen lipozomların boyut dağılım analizleri Şekil 3.4(a-c)'de gösterilmiştir.

$C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda, işletme basıncının artması sonucu tasarlanan lipozom boyutları önemli ölçüde azalmaktadır. Düşük basınçta daha geniş boyut dağılımına sahip lipozomal sistemler elde edilmesine karşın, orta ve yüksek basınç koşullarında daha sık boyut dağılıma sahip lipozomal sistemler elde edilmiştir. Boyut dağılım analizleri incelendiğinde, tasarlanan lipozom boyutlarının 10 MPa için 342-825 nm, 20 MPa için 51-79 nm ve 30 MPa için 18-25 nm arasındadır. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda, işletme basıncının artmasıyla tasarlanan lipozomların hidrodinamik boyutları önce azalmakta daha sonra artmaktadır. $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşuldaki gibi düşük basınçta daha geniş boyut dağılımına sahip lipozomal sistemler elde edilmesine karşın, orta ve yüksek basınç koşullarında daha sık boyut dağılıma sahip lipozomal sistemler elde edilmiştir. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL koşulunda elde edilen lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde; 10 MPa için 79-190 nm, 20 MPa için 44-91 nm ve 30 MPa için 91-164 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda ise işletme basıncının 10 MPa ile 20 MPa olduğu koşullarda tasarlanan lipozom boyutların mikro düzeyde ve hemen hemen aynı oldu ancak 30 MPa koşullarında ise işletme basıncının artması ile tasarlanan lipozom boyutların düşük basınç koşullarına kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Ancak yüksek basınç koşullarında da mikron boyutlarında lipozomal sistemler tasarlanmıştır. Lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde; 10 MPa için 2305-4145 nm, 20 MPa için 2305-3580 nm ve 30 MPa için 825-1484 nm arasında değiştiği saptanmıştır.



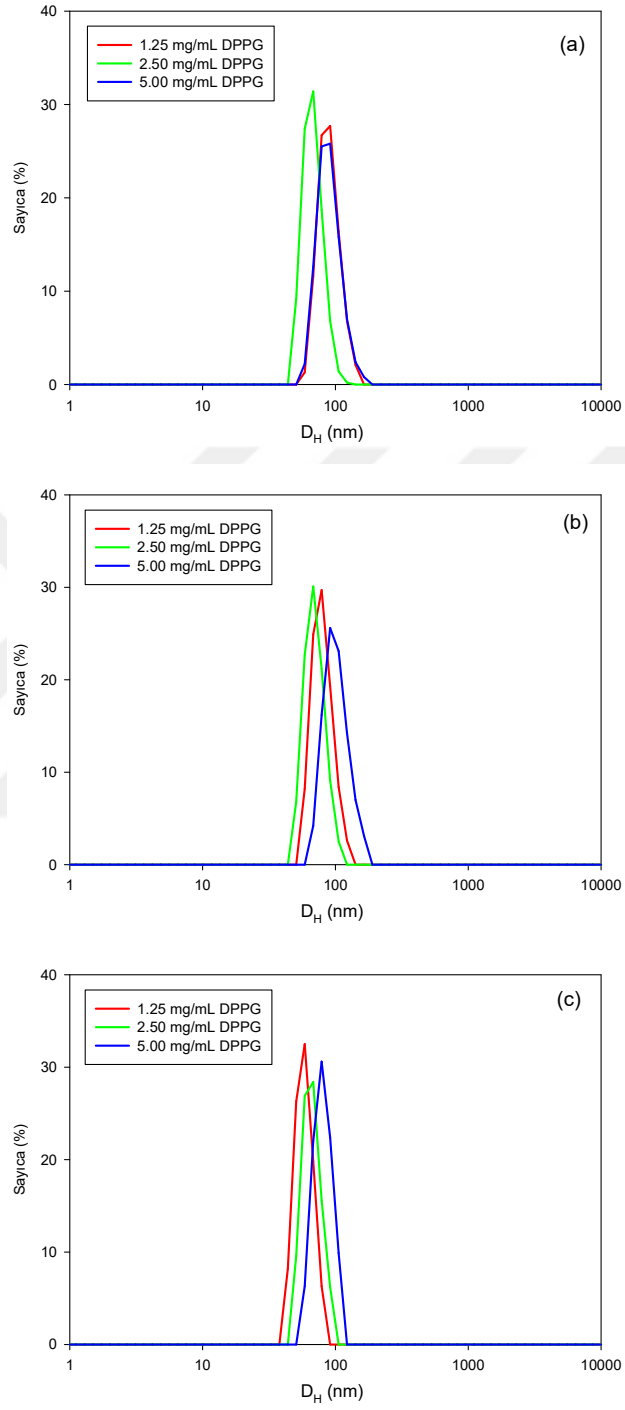
Şekil 3.4 RESOLVE prosesi ile katyonik lipozomların tasarımında işletme basınç etkisi
 (a) $C_{DDAB} = 1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB} = 2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB} = 5$ mg/mL.

3.3 Lipozomaların Tasarımında DPPG Derişiminin Boyut Dağılıma Etkisi

3.3.1 RESS prosesi

RESS prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin tasarımında DPPG derişiminin (1.25-5 mg/mL) lipozomların boyut dağılıma etkisi, işletme basıncının; 10 MPa, 20 MPa ve 30 MPa olduğu koşullarında incelenmiştir. RESS prosesinde elde edilen ön lipozomal formların 5 mL 100 mM PBS tampon ortamında gerçekleştirilen hidrasyon süreçleri sonunda elde edilen lipozomların boyut dağılım analizleri Şekil 3.5(a-c)'de gösterilmiştir.

İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda, DPPG derişiminin artması sonucu tasarlanan lipozom boyutları önce azalmakta sonra artmaktadır. Ancak düşük ve yüksek derişimlerde elde edilen boyut dağılımlarının hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. Bu koşullarda lipozomal sistemlerin boyut dağılım analizleri incelendiğinde; $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL için 91-142 nm, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL için 91-122 nm ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL için 91-142 nm arasında değiştiği saptanmıştır. İşletme basıncın 20 MPa olduğu koşulda ise DPPG derişiminin artması sonucu tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutları DPPG derişiminin artmasıyla lipozomal sistemlerin boyut dağılımlarının önce azaldığı daha sonra arttığı görülmektedir. Ancak bu artış ve azalma çok fazla olmamıştır. Elde edilen lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde; $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL için 59-122 nm, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL için 51-106 nm ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL için 68-122 nm arasındadır. Orta DPPG derişimlerinde daha sık boyut dağılıma sahip lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. İşletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda ise tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutları DPPG derişiminin artmasıyla çok yüksek derecede olmasada arttığı görülmektedir. Elde edilen lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde; $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL için 51-79 nm, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL için 51-106 nm ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL için 59-106 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Boyut dağılımları sık olup düşük DPPG derişimlerinde daha sık olacak şekilde lipozomal sistemlerin üretimi gerçekleşmektedir.

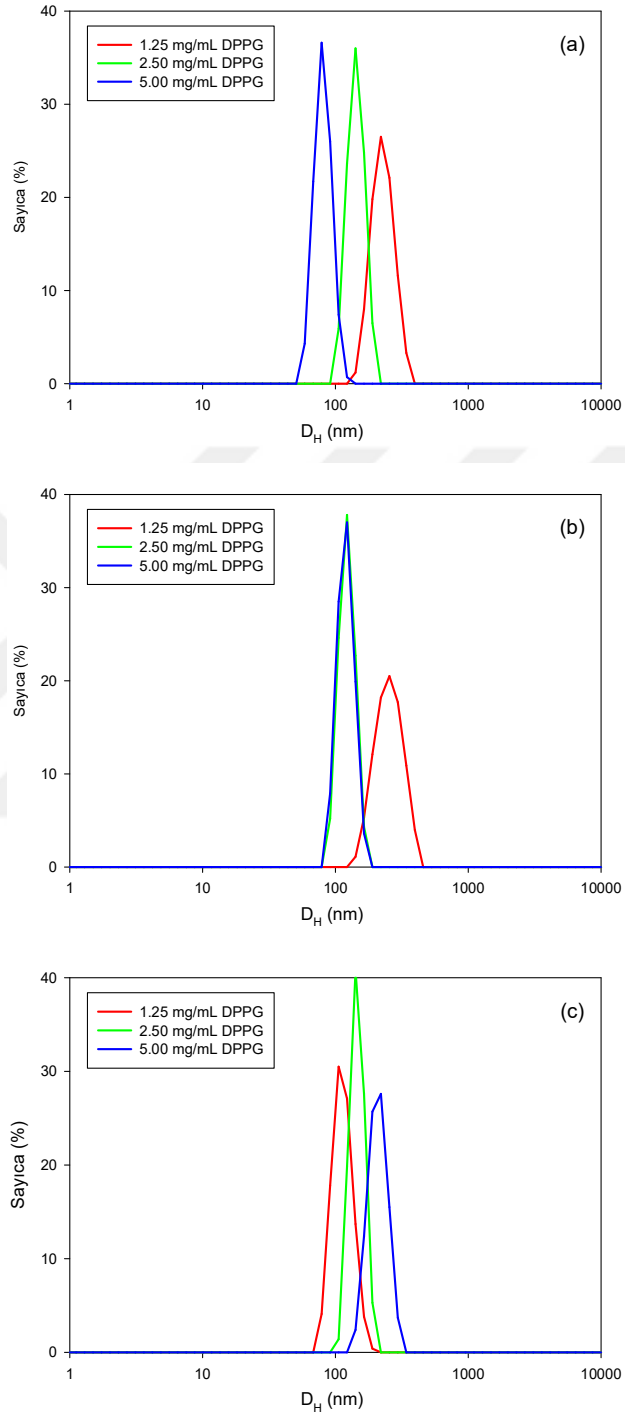


Şekil 3.5 RESS prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DPPG derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa.

3.3.2 RESOLVE prosesi

RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin tasarımı DPPG derişiminin (1.25-5 mg/mL) lipozomların boyut dağılıma etkisi, işletme basıncının; 10 MPa, 20 MPa ve 30 MPa olduğu koşullarında incelenmiştir. RESOLVE prosesinde elde edilen ön lipozomal formların 5 mL 100 mM PBS tampon ortamında gerçekleştirilen hidrasyon basamağı sonunda elde edilen lipozomal sistemlerin boyut dağılım analizleri Şekil 3.6(a-c)'de gösterilmiştir.

İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda, DPPG derişiminin artmasıyla tasarlanan lipozomların boyutlarında azalma görülmektedir. Lipozomların boyut dağılım analizleri incelendiğinde, elde edilen lipozomal sistemler geniş boyut dağılıma sahip olduğu ve $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL'de 142-342 nm, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL'de 106-190 nm ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL'de ise 59-122 nm arasında değiştii saptanmıştır. İşletme basıncının 20 MPa olduğu koşulda, DPPG derişiminin artması ile tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutları önce azalmakta daha sonra değişmediği görülmektedir. Elde edilen lipozomların boyut dağılımı analizleri incelendiğinde; $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL için 142-342 nm, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL için 91-164 nm ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL için 91-164 nm arasında değiştii saptanmıştır. Lipozomlar geniş boyut dağılım aralığına sahip olup düşük DPPG derişiminde bu değişim daha fazladır. İşletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda ise DPPG derişimindeki artış daha büyük boyut dağılıma sahip lipozomal sistemlerin tasarımına yol açmıştır. Lipozomların boyut dağılımı analizlerinden $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL için 79-190 nm, $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL için 106-190 nm ve $C_{DPPG}=5$ mg/mL için 142-295 nm arasında değişen bir dağılım saptanmıştır.



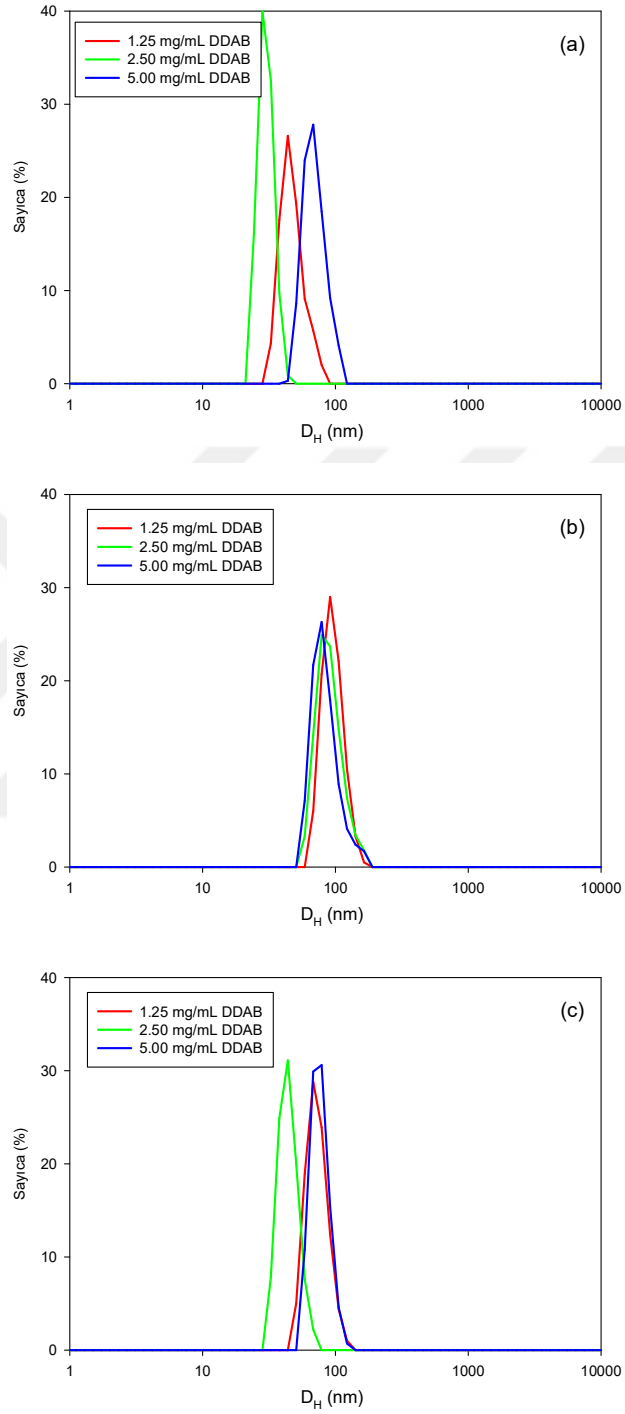
Şekil 3.6 RESOLVE prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DPPG derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa.

3.4 Lipozomaların Tasarımında DDAB Derişiminin Boyut Dağılıma Etkisi

3.4.1 RESS prosesi

RESS prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin tasarımında DDAB derişiminin (1.25-5 mg/mL) lipozomların boyut dağılıma etkisi, işletme basıncının; 10 MPa, 20 MPa ve 30 MPa olduğu koşullarında incelenmiştir. RESS prosesinde elde edilen ön lipozomal formlar 5 mL 100 mM PBS tampon ortamında hidrasyon süreçleri gerçekleştirilmiş ve bu süreç sonunda elde edilen lipozomların boyut dağılım analizleri Şekil 3.7(a-c)'de gösterilmiştir.

İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda, DDAB derişiminin artmasıyla tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutları önce azalmakta daha sonra artmaktadır. Boyut dağılım analizleri incelendiğinde elde edilen lipozomal sistemlerin sık boyut dağılımlı olduğu görülmektedir. Boyut dağılımları; $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL için 33-68 nm, $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL için 24-44 nm ve $C_{DDAB}=5$ mg/mL için 44-106 nm arasındadır. İşletme basıncının 20 MPa olduğu koşulda ise DDAB derişiminin tasarlanan lipozomal sistemlerin boyut dağılımında önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu koşullarda elde edilen lipozomların boyut dağılımları; $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL için 79-164 nm, $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL için 59-164 nm ve $C_{DDAB}=5$ mg/mL için 59-164 nm arasındadır. İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşullar ile karşılaştırıldığında daha geniş boyut dağılımına sahip lipozomal sistemler elde edilmiştir. İşletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda ise tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutları DDAB derişiminin artmasıyla önce azalmakta sonra artmaktadır. Bu koşullarda elde edilen lipozomların boyut dağılım analizleri incelendiğinde; $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL için 59-124 nm, $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL için 33-68 nm ve $C_{DDAB}=5$ mg/mL için 59-124 nm arasında değiştiği saptanmıştır.

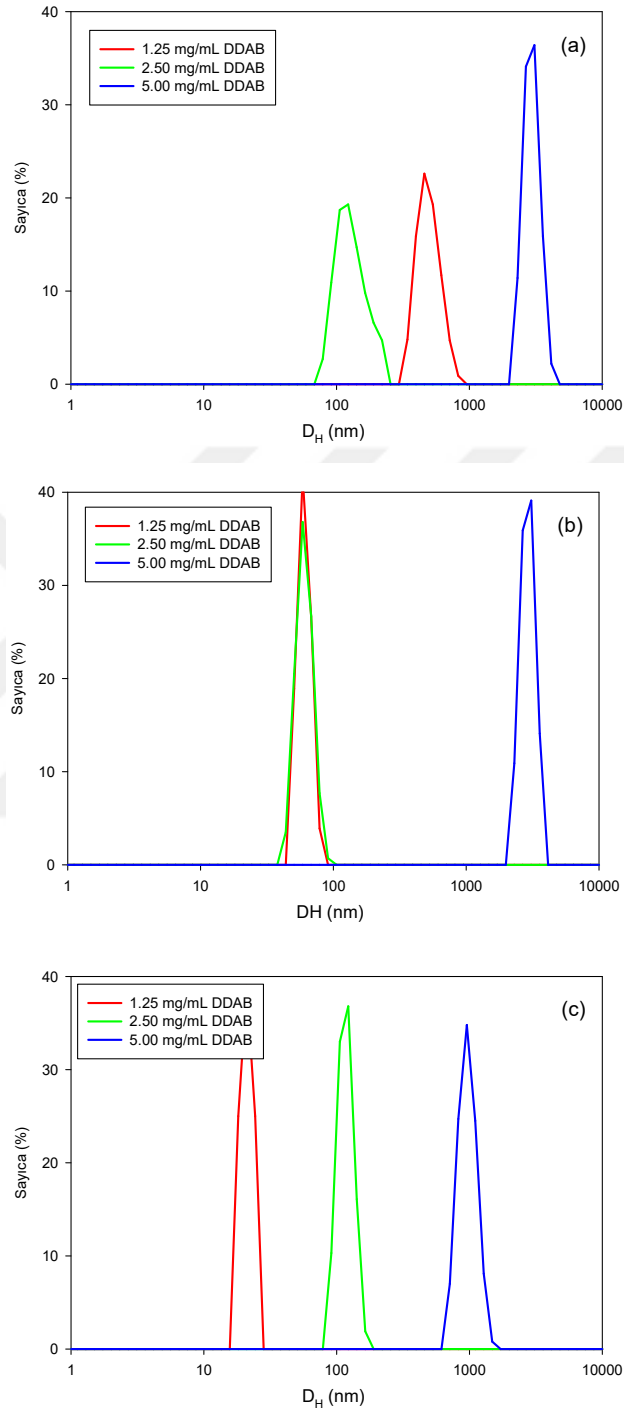


Şekil 3.7 RESS prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DDAB derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa.

3.4.2 RESOLVE prosesi

RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin tasarımı DDAB derişiminin (1.25-5 mg/mL) oluşturulan lipozomların boyutuna etkisi, işletme basıncının; 10 MPa, 20 MPa ve 30 MPa olduğu koşullarında incelenmiştir. RESOLVE prosesinde elde edilen ön lipozomal formların 5 mL 100 mM PBS tampon ortamında gerçekleştirilen hidrasyon işlemi sonunda oluşan lipozomların boyut dağılım analizleri Şekil 3.8(a-c)'de gösterilmiştir.

İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda, DDAB derişiminin artması sonucu tasarlanan lipozom boyutları önce azalmakta sonra artmaktadır. Bu artış ve azalma oldukça belirgin olup oldukça geniş boyut dağılıma sahip lipozomal sistemlerin tasarımı ile sonuçlanmıştır. Boyut dağılım analizleri incelendiğinde, tasarlanan lipozom boyutlarının $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL'de 342-825 nm, $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL'de 79-220 nm ve $C_{DDAB}=5$ mg/mL'de ise 2305-4145 nm arasında değiştiği belirlenmiştir. İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda ise tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutları DDAB derişiminin sadece $C_{DDAB}>2.5$ mg/mL olduğu koşullarda büyük bir artış görülmektedir. Düşük ve orta DDAB derişimlerinde ise sık boyut dağılıma sahip lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilebilmiştir. Bu koşullarda elde edilen lipozomların boyut dağılım analizleri incelendiğinde; $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL için 51-79 nm, $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL için 44-91 nm ve $C_{DDAB}=5$ mg/mL için 2305-3580 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Ancak işletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda, tasarlanan lipozomal sistemlerin boyutlarının DDAB derişiminin artmasıyla arttığı görülmektedir. Yüksek DDAB derişiminin çok geniş boyut dağılımına sahip lipozomal sistemlerin oluşuma etki ettiği görülmektedir. Elde edilen lipozomal sistemlerin boyut dağılım analizleri incelendiğinde; $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL için 18-24 nm, $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL için 91-164 nm ve $C_{DDAB}=5$ mg/mL için 712-1484 nm arasında değiştiği saptanmıştır.



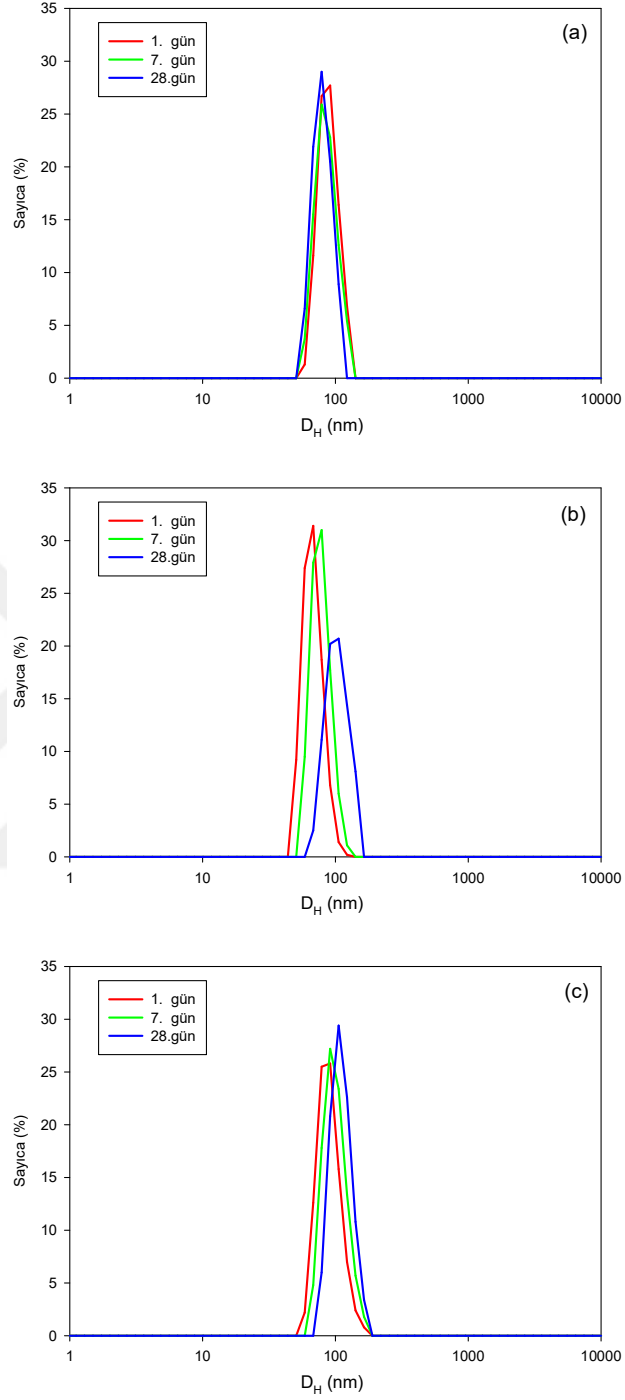
Şekil 3.8 RESOLVE prosesi ile lipozomların tasarımında boyut dağılımına DDAB derişimi etkisi: (a) 10 MPa, (b) 20 MPa, (c) 30 MPa.

3.5 Lipozomal Sistemlerin Depolama Kararlılıkları

Tez projesi kapsamında hem RESS hem de RESOLVE proseslerinden elde edilen anyonik ve katyonik lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyutlarındaki değişimler 28 gün süresince incelenmiştir. Depolama süresinin etkisi gün ışığı görmeyen 15 °C’de atmosferik ortam koşullarında araştırılmıştır.

3.5.1 RESS prosesiyle üretilen anyonik lipozomların depolama kararlılıkları

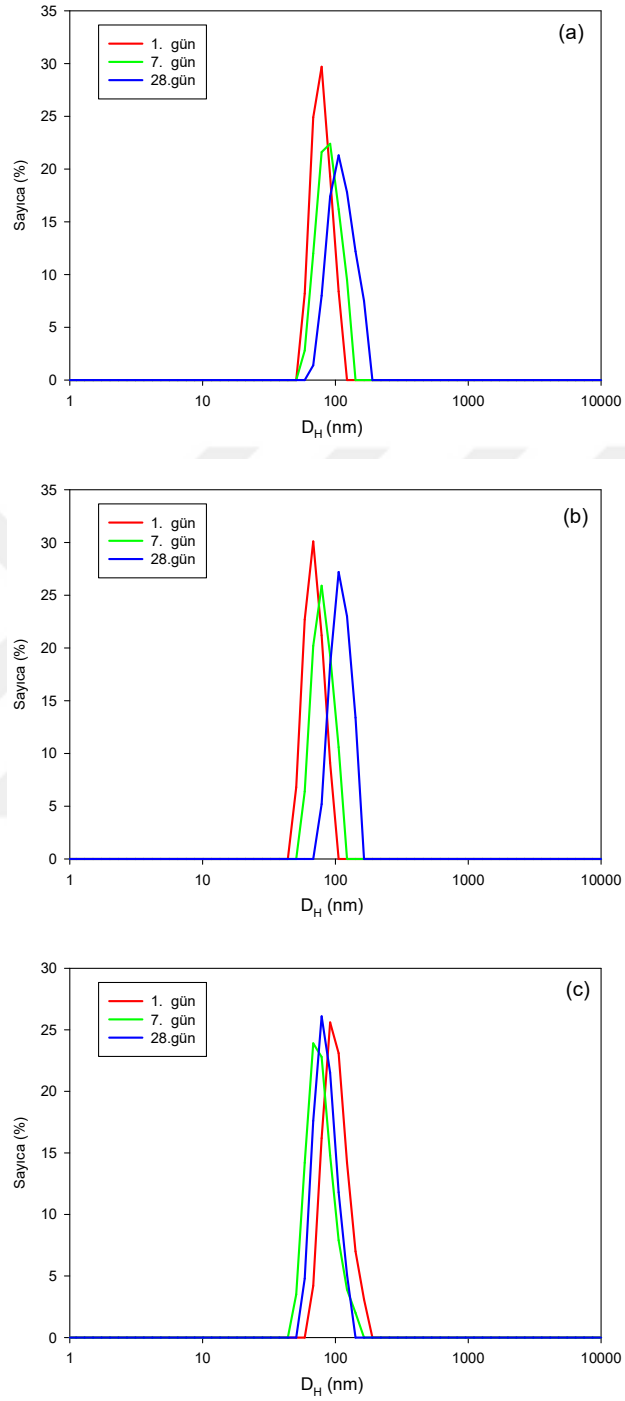
İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda, farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin boyut dağılımlarının depolama süresi ile değişimleri Şekil 3.9(a-c)’de gösterilmiştir. $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda elde edilen lipozomal sistemlerin 28 gün süresince hidrodinamik boyutlarını koruduğu görülmektedir. Başlangıçta üretilen ve hidrodinamik boyut dağılımı 59-122 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. ve 28. günde de 59-122 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda elde edilen lipozomal sistemlerin 28 gün süresince hidrodinamik boyutları ise depolama süresi ile çok az miktarda artmaktadır. Başlangıçta üretilen ve hidrodinamik boyut dağılımı 51-142 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. günde 59-142 nm arasında değişirken, 28. günde ise 68-142 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Ancak depolama süresince lipozomal sistemin hidrodinamik boyutlarının üst sınırında herhangi bir değişimin olmamıştır. $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu koşullarda elde edilen lipozomal sistemlerin de 28 gün süresince hidrodinamik boyutları depolama süresi ile önemli bir değişim göstermediği görülmektedir. Başlangıçta üretilen ve hidrodinamik boyut dağılımı 59-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. günde 68-164 nm arasında değişirken, 28. günde ise 91-164 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Ancak depolama süresince lipozomal sistemin hidrodinamik boyutlarının üst sınırında herhangi bir değişim olmamaktadır.



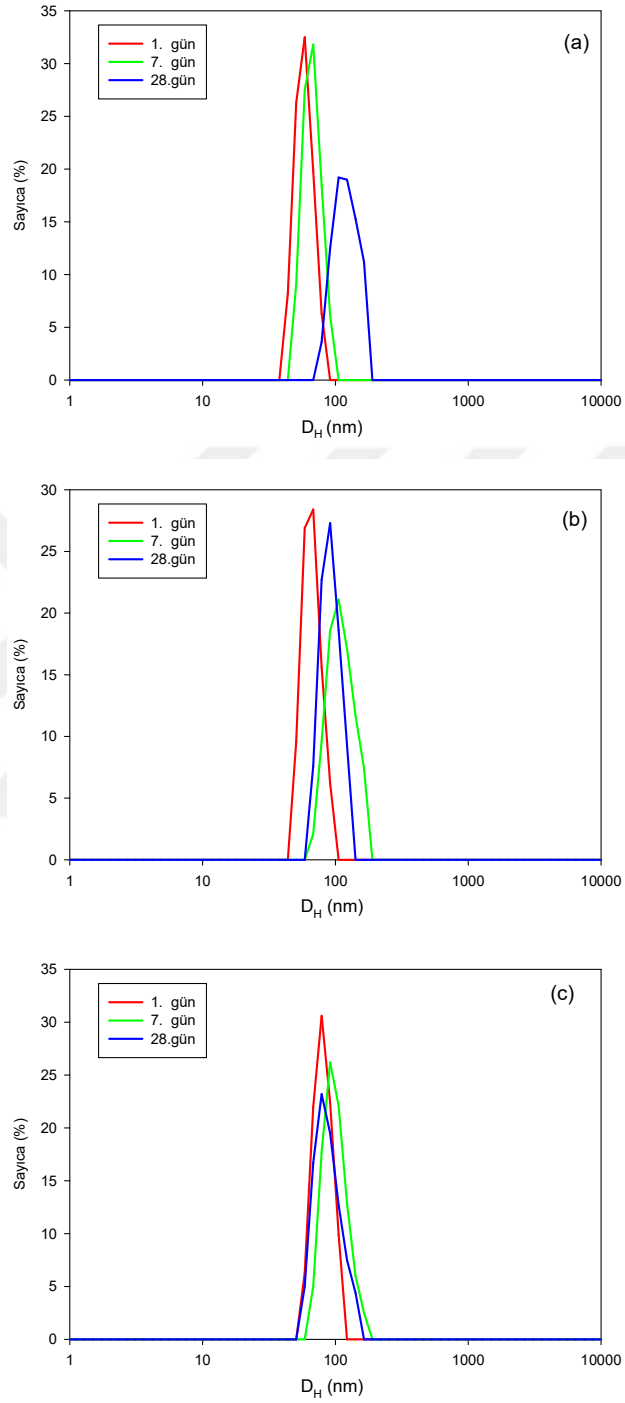
Şekil 3.9 RESS prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.

İşletme basıncının 20 MPa olduğu koşulda, farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin boyut dağılımlarının depolama süresi ile değişimleri Şekil 3.10(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile elde edilen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarında bir artış görölmektedir. Başlangıçta lipozomal sistemlerin 59-106 nm arasında değişen hidrodinamik boyutları 7. günde 59-122 nm arasında ve 28. günde ise 68-164 nm arasında değişmektedir. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları depolama süresinin artması ile çok az da olsa bir artış görölmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 51-91 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde 59-106 nm arasında ve 28. günde ise 79-142 nm arasında değişmektedir. Bu koşullarda lipozomların sık boyut dağılımlarını koruduğu söylenebilir. $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu koşulda ise depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarında önemli değişim olmadığı görölmektedir. Ancak başlangıçta üretilen ve hidrodinamik boyut dağılımı 68-164 nm arasında değişirken, 7. ve 28. günlerde bir değişim 59-122 nm arasındadır.

İşletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda ise farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin boyut dağılımlarının depolama süresi değişimleri Şekil 3.11(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda, lipozomların hidrodinamik boyutları depolama süresi ile artmaktadır. Ancak ilk 1 haftada boyut dağılımı oldukça sıktır. Lipozomların başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 44-79 nm arasında değişirken 7. günde 44-91 nm arasında ve daha sonra 28. günde 79-164 nm arasında değişmektedir. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları depolama süresi ile önce artmakta sonra azalmaktadır. 51-91 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin başlangıçtaki boyut dağılımlarının 7. günde 68-164 nm arasında ve 28. günde ise 68-122 nm arasında değiştığı saptanmıştır. $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu koşulda ise lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyutlarında önemli değişim olmadığı görölmektedir. Ancak üretimin başında 59-106 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. günde 68-164 nm arasında ve 28. günde ise 68-142 nm arasında değiştığı saptanmıştır.



Şekil 3.10 RESS prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG} = 1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG} = 2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG} = 5$ mg/mL.

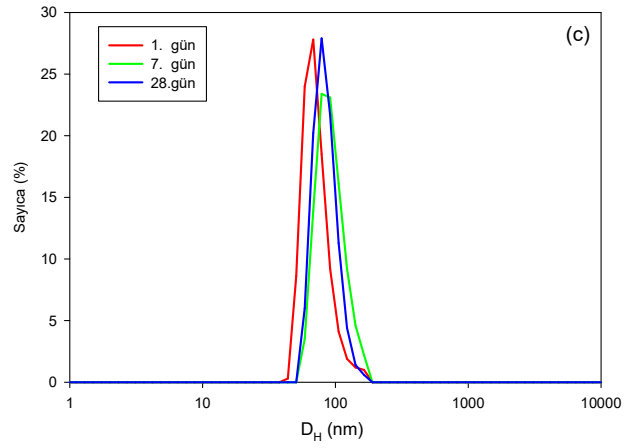
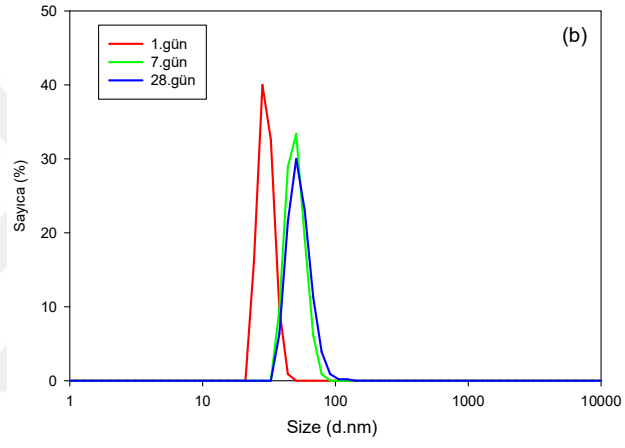
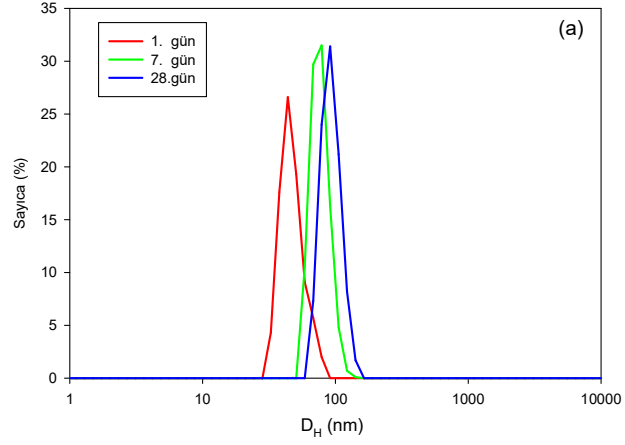


Şekil 3.11 RESS prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) C_{DPPG}=1.25 mg/mL, (b) C_{DPPG}=2.5 mg/mL, (c) C_{DPPG}=5 mg/mL.

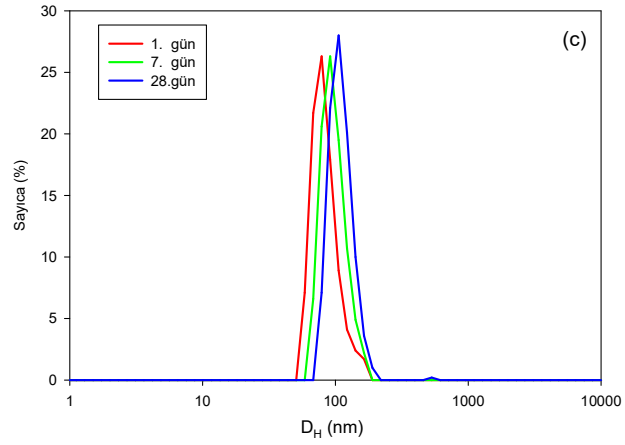
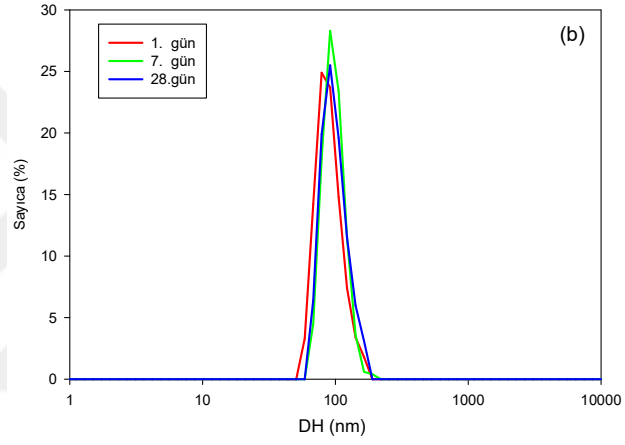
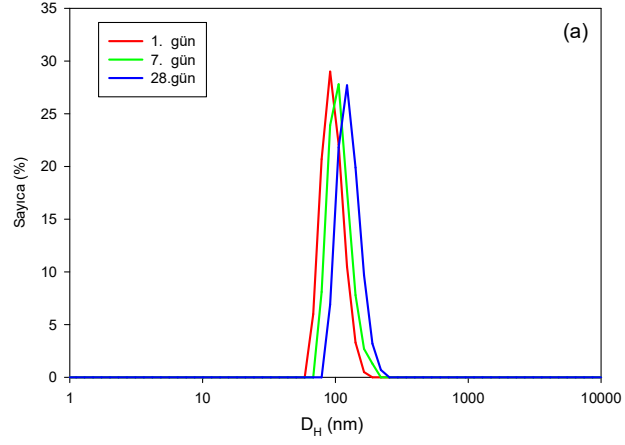
3.5.2 RESS prosesiyle üretilen katyonik lipozomların depolama kararlılıkları

İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda farklı DDAB derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile boyut dağılımlarındaki değişimler Şekil 3.13(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının arttığı görülmektedir. Başlangıçta 33-68 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde 59-142 nm arasında ve 28. günde ise 68-142 nm arasında değişmektedir. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise depolama süresiyle lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları önce artmakta sonra değişmediği görülmektedir. Ancak, başlangıçta üretilen ve hidrodinamik boyut dağılımı 24-44 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. günde 38-79 nm arasında ve 28. günde ise 38-122 nm arasında değiştiiği saptanmıştır. $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda elde edilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyutlarında önemli bir değişim olmadığı görülmektedir. Başlangıçta 44-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde 59-164 nm arasında ve 28. günde ise 68-164 nm arasında değiştiiği saptanmıştır. Depolama süresince lipozomal sistemin hidrodinamik boyutlarının üst sınırında herhangi bir değişim olmadığı görülmektedir.

İşletme basıncının 20 MPa olduğu koşulda farklı DDAB derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile boyut dağılımlarındaki değişimler Şekil 3.13(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları ile çok az da olsa artmaktadır. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 79-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin 7. günde 79-190 nm arasında ve 28. günde ise 91-220 nm arasında değişen bir boyut dağılıma sahip olduğu belirlenmiştir. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise depolama süresi lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarında önemli bir değişim görülmemektedir. Ancak başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 59-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin 7. gün sonunda 68-190 nm arasında ve 28. gün sonunda ise 68-164 nm arasında değiştiiği saptanmıştır.



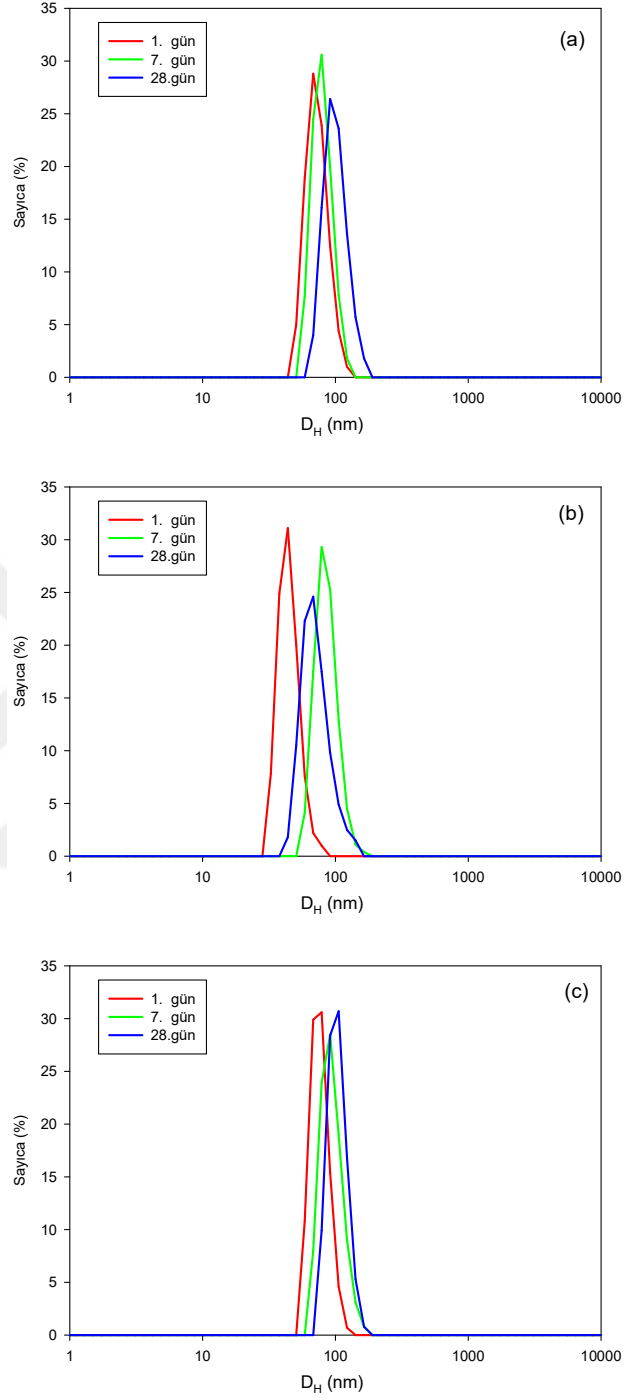
Şekil 3.12 RESS prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.



Şekil 3.13 RESS prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL

$C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları çok az da olsa artmaktadır. Başlangıçta 59-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. gün sonunda 59-190 nm arasında ve 28. günde sonunda 79-190 nm arasında değiştiği belirlenmiştir.

İşletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda farklı DDAB derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile boyut dağılımlarındaki değişimler Şekil 3.14(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının çok az da olsa arttığı görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 51-106 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7 gün sonra 59-122 nm arasında ve 28 gün sonra 68-164 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları önce artmakta sonra azalmaktadır. Ancak bu değişimler çok büyük ölçüde gerçekleşmemektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 33-68 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde 59-164 nm arasında ve 28. günde ise 44-142 nm arasında değişmektedir. $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda da depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarında çok belirgin bir değişim görülmemesine karşın genel olarak hidrodinamik boyutlarında bir artma görülmektedir. 59-122 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin başlangıçtaki hidrodinamik boyutlarının 7 gün sonra 68-164 nm arasında değiştiği ve 28 gün sonunda ise 79-164 nm arasında değiştiği saptanmıştır.

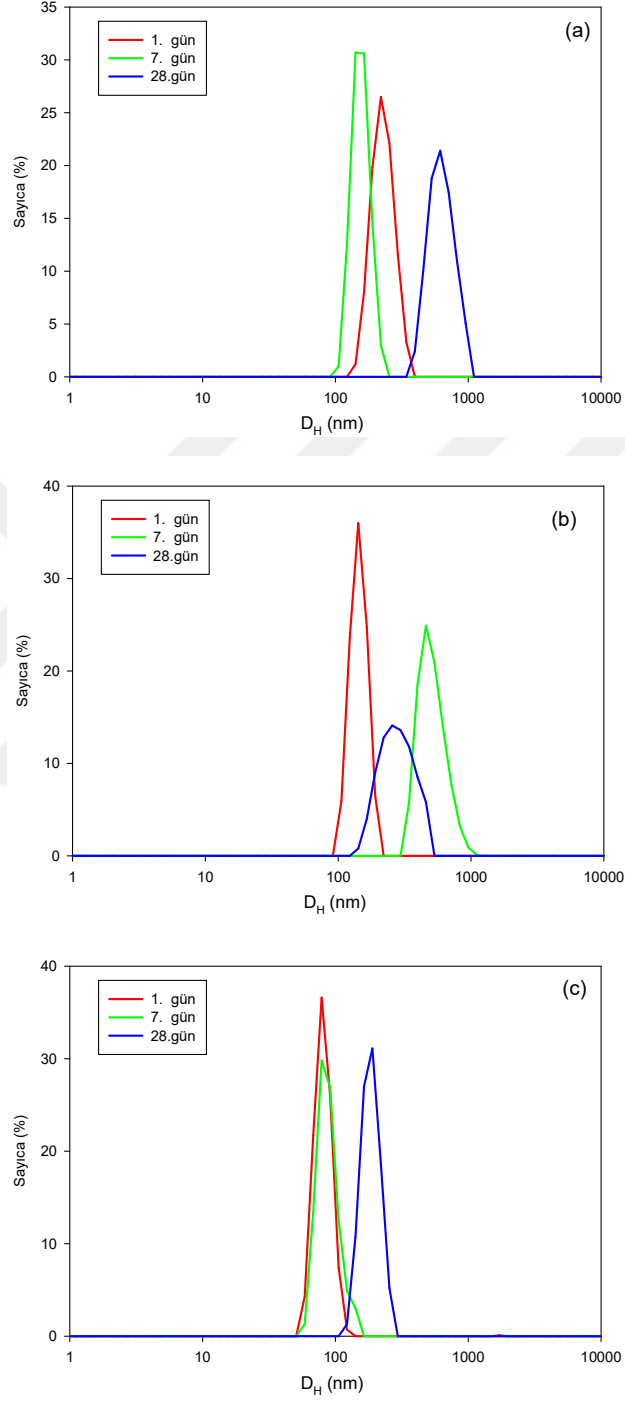


Şekil 3.14 RESS prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL

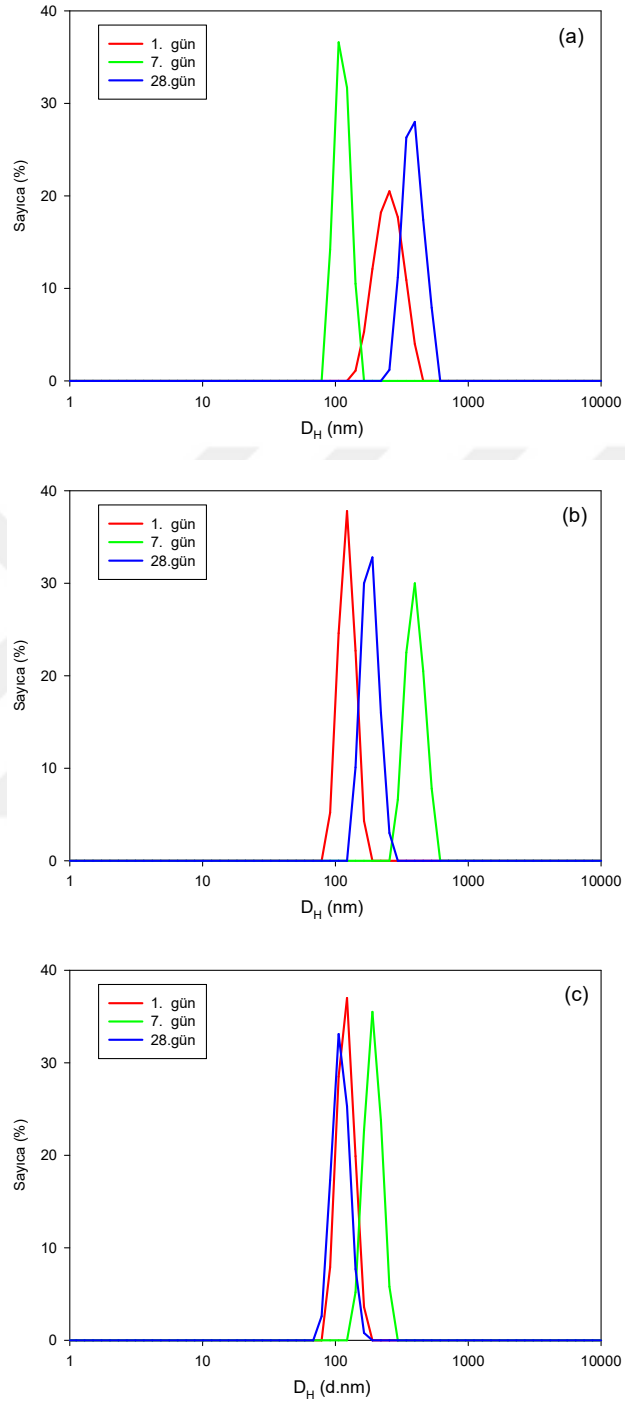
3.5.3 RESOLVE prosesiyle üretilen anyonik lipozomların depolama kararlılıkları

İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyut dağılımlarındaki değişimler Şekil 3.15(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda 28 gün süresince lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının önce azaldığı daha sonra arttığı görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 142-342 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin 7. gün sonunda 106-190 nm arasında ve 28. gün sonunda ise 396-995 nm arasında değiştığı belirlenmiştir. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise depolama süresi ile lipozomların hidrodinamik boyutları önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Ancak 28. günde boyut dağılımının geniş bir aralıkta olduğu görülmektedir. 106-190 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin başlangıçtaki hidrodinamik boyutları 7. günde 342-1106 nm arasında ve 28. günde ise 142-459 nm arasında değişmiştir. $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu koşulda ise lipozomların hidrodinamik boyut aralığının ilk 7 gün süresince değişmediği ancak depolama süresi ile daha sonra arttığı görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 59-122 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde benzerdir. Ancak 28. günde ise lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının artarak 122-255 nm arasında değiştığı saptanmıştır.

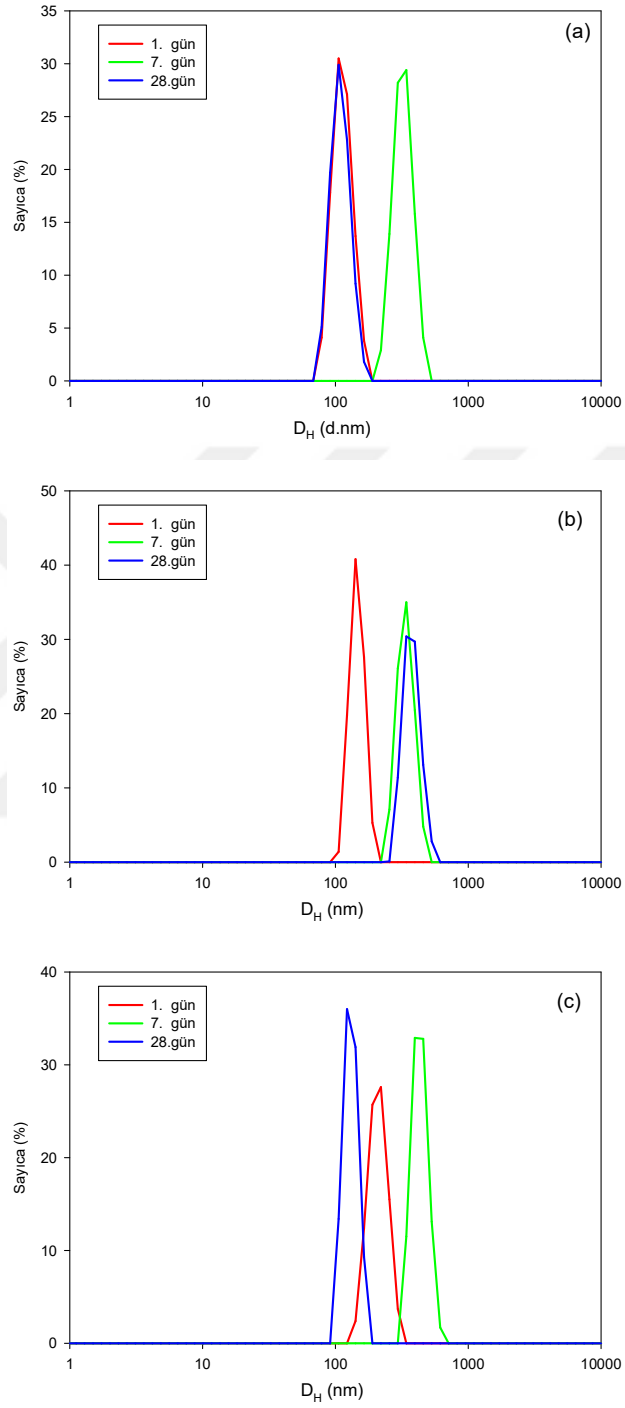
İşletme basıncının 20 MPa olduğu koşulda farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyut dağılımlarındaki değişimler Şekil 3.16(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda elde edilen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 28 gün süresince önce azalmakta daha sonra artmaktadır. Başlangıçta 142-396 nm hidrodinamik boyut dağılımına sahip lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde 91-142 nm arasında ve 28. günde ise 255-531 nm arasında değiştığı saptanmıştır. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 28 gün süresince önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Başlangıçta üretilen ve hidrodinamik boyut dağılımı 91-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. günde 295-531 nm arasında ve 28. günde ise 141-220 nm arasında değiştığı saptanmıştır. $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu



Şekil 3.15 RESOLVE prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.



Şekil 3.16 RESOLVE prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) C_{DPPG}=1.25 mg/mL, (b) C_{DPPG}=2.5 mg/mL, (c) C_{DPPG}=5 mg/mL.



Şekil 3.17 RESOLVE prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen anyonik lipozomların depolama karlılıkları: (a) $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DPPG}=5$ mg/mL.

koşulda ise depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının ilk 7 gün süresince arttığı ancak daha sonra hemen hemen başlangıç değerlerine geri döndüğü görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 91-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde 142-255 nm arasında ve 28. günde ise 79-164 nm arasında değişmektedir.

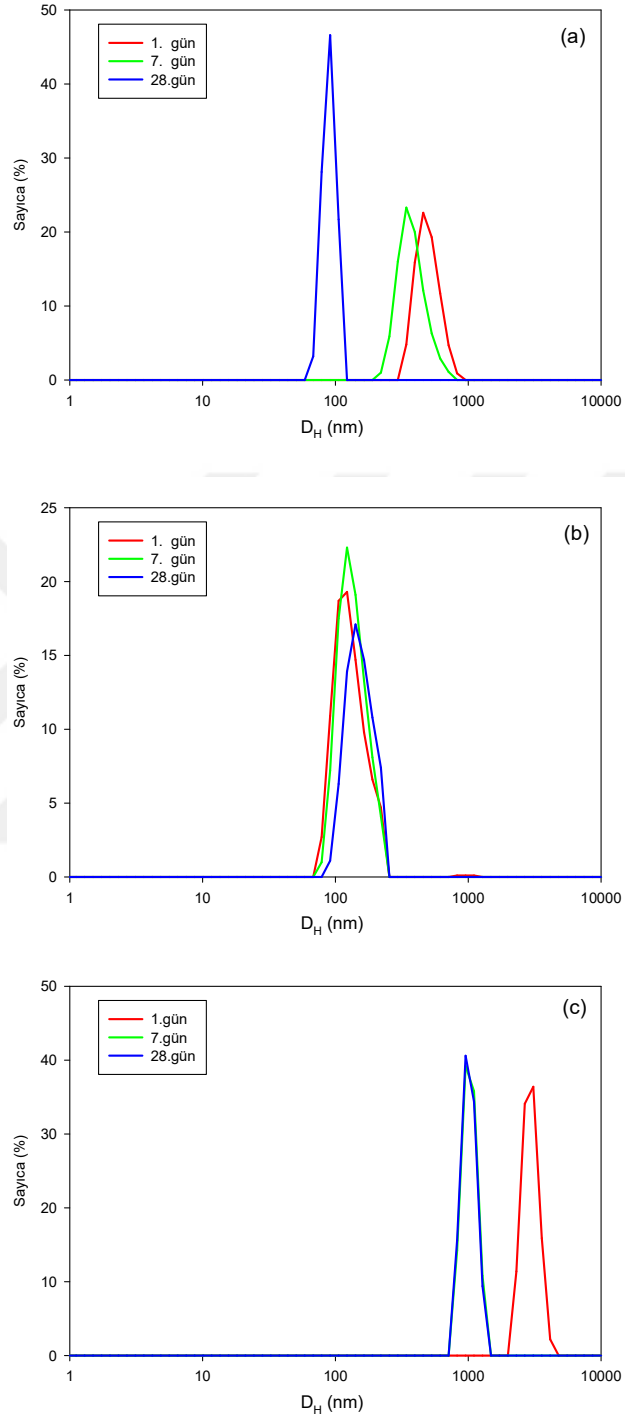
İşletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyut dağılımlarındaki değişimler Şekil 3.17(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DPPG}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları ilk 7 gün süresince arttığı ancak daha sonra hidrodinamik boyutlarının hemen hemen başlangıç değerlerine geri döndüğü görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 79-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. gün sonunda 220-459 nm arasında değişirken 28. gün sonunda başlangıç aralığı olan 79-164 nm arasına ulaştığı belirlenmiştir. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları depolama sürecinin 7. gününde artmakta daha sonra hemen hemen sabit kalmaktadır. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 106-190 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. gün sonunda 255-459 nm arasında değişmesine karşın 28. gün sonunda ise 255-531 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DPPG}=5$ mg/mL olduğu koşulda lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyut dağılım aralıklarının depolama süresi ile önce arttığı daha sonra azaldığı görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 142-295 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. günde 342-615 nm arasında iken 28. günde ise 106-164 nm arasında değişmektedir.

3.5.4 RESOLVE prosesiyle üretilen katyonik lipozomların depolama kararlılıkları

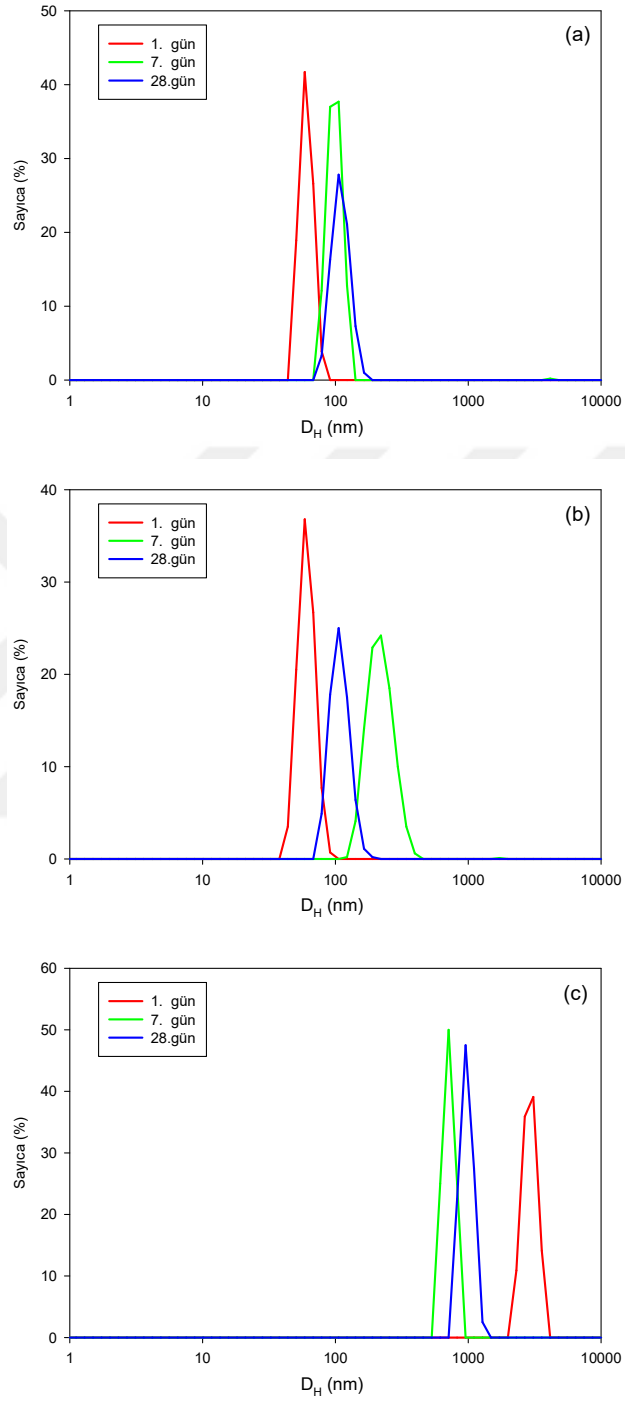
İşletme basıncının 10 MPa olduğu koşulda ve farklı DDAB derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile boyut dağılımındaki değişimler Şekil 3.18(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 28 gün'lük depolama süresince azaldığı

görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 342-825 nm arasında değişim gösteren lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının 7. günde 225-712 nm arasında ve 28. günde ise 68-106 nm arasında değiştiği saptanmıştır. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda ise elde edilen lipozomal sistemlerin 28 gün süresince hidrodinamik boyutlarının 79-220 nm arasında değişen bir boyut dağılıma sahip olup depolama süresi ile önemli bir değişim göstermediği görülmektedir. $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları ise depolama süresini ile azalmakta ve 7. gün'den sonra önemli bir değişim göstermemektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 2305-4145 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. ve 28. günde benzer boyut dağılıma sahip olup lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 825-1281 nm arasında değiştiği belirlenmiştir.

İşletme basıncının 20 MPa olduğu koşulda ve farklı DDAB derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile boyut dağılımındaki değişimler Şekil 3.19(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları depolama süresince arttığı görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 51-79 nm arasında değişim gösteren lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları, 7. gün sonunda 79-122 nm arasında ve 28. gün sonunda ise 79-164 nm arasında bir değişim gösterdiği saptanmıştır. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 44-91 nm arasında değişim gösteren lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları daha geniş bir aralıkta boyut dağılımı sergilemiş ve 7. gün sonunda 122-396 nm arasında değişirken 28. gün sonunda bu değişimin 91-190 nm arasında olduğu saptanmıştır. $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda elde edilen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları oldukça büyük olduğu ve depolama süresini ile önce arttığı daha sonra azaldığı görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 2305-3580 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. gün sonunda 615-825 nm arasında değişirken 28. gün sonunda aratarak 825-1281 nm arasında değiştiği saptanmıştır.

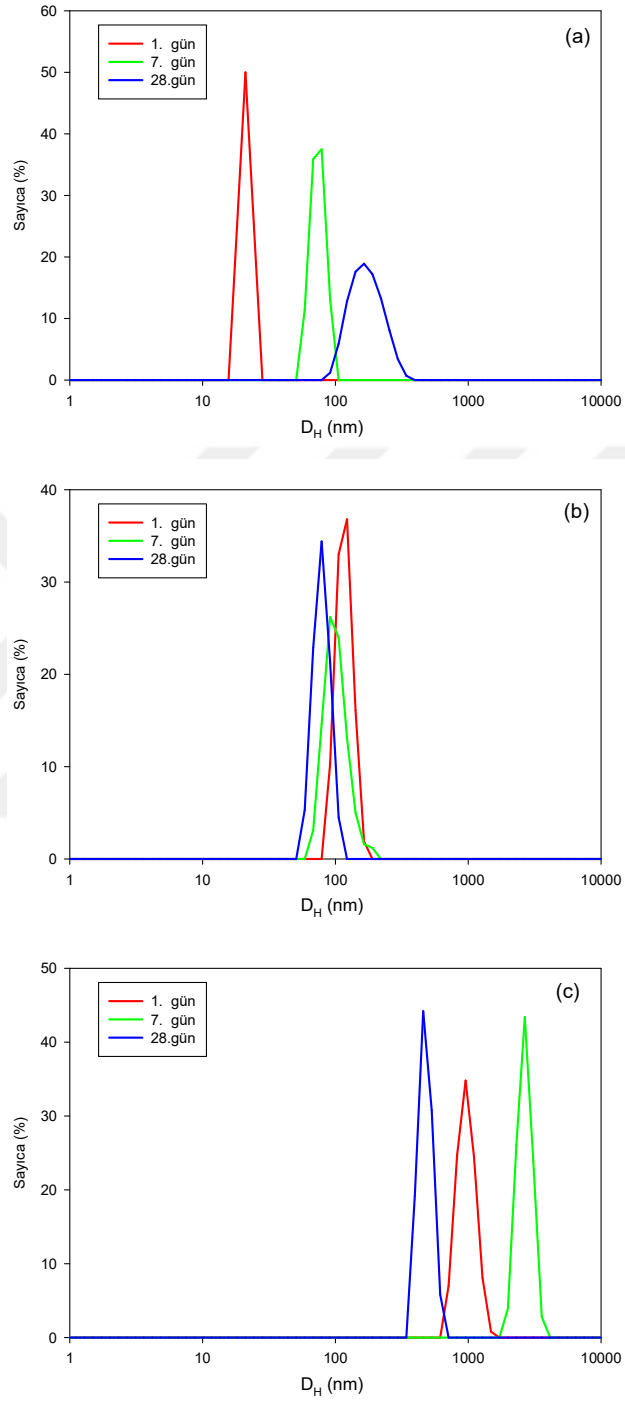


Şekil 3.18 RESOLVE prosesiyle 10 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları; (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL.



Şekil 3.19 RESOLVE prosesiyle 20 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları; (a) $C_{DDAB} = 1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB} = 2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB} = 5$ mg/mL

İşletme basıncının 30 MPa olduğu koşulda ve farklı DDAB derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile boyut dağılımındaki değişimler Şekil 3.20(a-c)'de gösterilmiştir. $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL olduğu koşulda elde edilen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının depolama süresince arttığı görülmektedir. Başlangıçta üretilen ve hidrodinamik boyut dağılımı 18-24 nm arasında değişim gösteren lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının dağılımı 7. gün sonunda 59-91 nm arasında ve 28. günde sonunda ise 91-342 nm arasındadır. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda depolama süresi ile lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarında çok az da olsa bir azalma görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 91-164 nm arasında değişim gösteren lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutları 7. gün sonunda 68-190 nm ve 28. gün sonunda ise 59-106 nm arasında olduğu saptanmıştır. $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda ise elde edilen lipozomal sistemlerin depolama süresini ile hidrodinamik boyutlarında önce artmakta daha sonra azalma görülmektedir. Başlangıçta hidrodinamik boyut dağılımı 825-1484 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyut dağılımları 7. gün sonunda 2305-3580 nm arasında değişirken 28. gün sonunda bu değişimin önemli ölçüde azalarak 396-615 nm arasında değiştığı saptanmıştır.



Şekil 3.20 RESOLVE prosesiyle 30 MPa işletme basıncında üretilen katyonik lipozomların depolama karlılıkları; (a) $C_{DDAB}=1.25$ mg/mL, (b) $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL, (c) $C_{DDAB}=5$ mg/mL

3.6 Depolama Süreci ile Lipozomal Sistemlerin Yüzey Yüklerinin Değişimi

3.6.1 RESS prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

RESS prosesi ile üretilen anyonik lipozomların depolama kararlılıkları, farklı işletme basıncı koşullarında (10-30 MPa) ve farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) incelenmiş olup Bölüm 3.5.1'de üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyut dağılımlarındaki değişimler incelenmiştir. Belirtilen koşullarda üretilen lipozomal sistemlerin hem tasarımın gerçekleştiği anda hem de 7. gün ve 28. gün sonunda lipozomal sistemlerin yüzey yüklerindeki değişimlerde de incelenmiş ve bu değişimler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Laouini ve ark. (2012) zeta potansiyeli +30 mV değerinden daha yüksek veya -30 mV değerinden daha düşük olan parçacıkların bulunduğu çözelti ortamında kararlı olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu bağlamda tasarımı gerçekleştirilen tüm basınç ve DPPG derişimlerinde lipozomal sistemlerin depolama süresince kararlılıklarını koruduğu ve mutlak değerce +30 mV değerinin üzerinde olduğu görülmektedir. Ölçümlerin gerçekleştirildiği lipozomların ortam pH'ları ise 6.95 ile 7.20 arasında değişmektedir.

Çizelge 3.1 RESS prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

		Depolama süresi (gün)		
		1	7	28
P (MPa)	C _{DPPG} (mg/mL)	Zeta potansiyeli (mV)		
10	1.25	-56	-59	-60
	2.5	-53	-44	-54
	5	-58	-60	-60
20	1.25	-43	-38	-51
	2.5	-60	-59	-54
	5	-60	-52	-55
30	1.25	-60	-60	-58
	2.5	-58	-55	-41
	5	-55	-56	-55

3.6.2 RESS prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

RESS prosesi ile üretilen katyonik lipozomların depolama kararlılıkları, farklı işletme basıncı koşullarında (10-30 MPa) ve farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) Bölüm 3.5.2'de incelenmiş olup üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyut dağılımlarındaki değişimler de incelenmiştir. Belirtilen koşullarda üretilen lipozomal sistemlerin hem tasarımın gerçekleştiği anda hem de 7. gün ve 28. gün sonundaki yüzey yüklerindeki değişimlerde incelenmiş ve bu değişimler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Ölçümlerin gerçekleştirildiği lipozomların ortam pH'ları 6.50 ile 7.05 arasında değiştiği saptanmış ve genel olarak yüzey yükleri +30 mV değerinden daha yüksektir. Depolama süresi boyunca katyonik lipozomal sistemler kararlılıklarını korumasına karşın yüzey yüklerini depolama süreci boyunca kaybetmektedir.

Çizelge 3.2 RESS prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

P (MPa)	C _{DDAB} (mg/mL)	Depolama süresi (gün)		
		1	7	28
10	1.25	+48	+46	+43
	2.5	+45	+38	+32
	5	+46	+41	+38
20	1.25	+54	+50	+52
	2.5	+53	+32	+27
	5	+47	+50	+48
30	1.25	+54	+42	+36
	2.5	+54	+53	+41
	5	+53	+52	+48

3.6.3 RESOLVE prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

RESOLVE prosesi ile üretilen anyonik lipozomların depolama kararlılıkları, farklı işletme basıncı koşullarında (10-30 MPa) ve farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) Bölüm 3.5.3'de incelenmiş olup üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyut dağılımlarındaki değişimler incelenmiştir. Belirtilen koşullarda üretilen lipozomal sistemlerin hem tasarımın gerçekleştiği anda hem de 7. gün ve 28. gün sonunda lipozomal sistemlerin yüzey yüklerindeki değişimlerde incelenmiş ve bu değişimler Çizelge 3.3'de gösterilmiştir. RESS prosesi ile kıyaslandığında, üretilen lipozomal sistemlerin yüzey yüklerinin mutlak değerce yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı görülmektedir. Ancak incelenen tüm koşullarda lipozomal sistemlerin yüzey yükleri -30 mV değerinde ya da bu değerden daha küçük olduğu görülmektedir. Yüzey yüklerinin ölçüldüğü ortamlarda lipozomal sistemlerin bulunduğu tampon ortamının pH değerleri 6.95 ile 7.15 arasında değişmektedir. Lipozomal sistemlerin tasarımının gerçekleştirilen tüm basınç ve DPPG derişimlerinde lipozomal sistemlerin depolama süresince kararlılıklarını korumaktadır.

Çizelge 3.3 RESOLVE prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

P (MPa)	C _{DPPG} (mg/mL)	Depolama süresi (gün)		
		1	7	28
10	1.25	-32	-33	-33
	2.5	-30	-27	-32
	5	-35	-34	-36
20	1.25	-32	-31	-32
	2.5	-30	-34	-32
	5	-34	-31	-33
30	1.25	-32	-31	-30
	2.5	-33	-30	-31
	5	-31	-33	-31

3.6.4 RESOLVE prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

RESOLVE prosesi ile üretilen katyonik lipozomların depolama kararlılıkları, Bölüm 3.5.4'de incelenmiş olup farklı işletme basıncı koşullarında (10-30 MPa) ve farklı DPPG derişimlerinde (1.25-5 mg/mL) üretilen lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyut dağılımlarındaki değişimler incelenmiştir. Belirtilen koşullarda üretilen lipozomal sistemlerin hem tasarımın gerçekleştiği anda hem de 7. gün ve 28. gün sonunda lipozomal sistemlerin yüzey yüklerindeki değişimlerde incelenmiş ve bu değişimler Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Katyonik lipozomal sistemlerin yüzey yüklerinin saptandığı tampon ortamının pH koşulları 6.80 ile 7.10 arasında değişmektedir. RESS prosesi ile kıyaslandığında, RESOLVE prosesi ile tasarımı gerçekleştirilen lipozomal sistemlerin yüzey yüklerini işletme koşulları ve DDAB derişimine bağlı olarak +1 mV ile 22 mV arasında değiştiği görülmektedir. Yüzey yükleri incelenen işletme koşulları ve DDAB derişimlerinde +30 mV 'değerinin altında olup kararlı yapıda olmadıkları saptanmıştır.

Çizelge 3.4 RESOLVE prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yüklerindeki değişimler

		Depolama süresi (gün)		
		1	7	28
P (MPa)	C _{DDAB} (mg/mL)	Zeta potansiyeli (mV)		
10	1.25	+15	+11	+9
	2.5	+22	+14	+12
	5	+2	+8	+7
20	1.25	+20	+20	+12
	2.5	+19	+11	+10
	5	+2	+3	+7
30	1.25	+22	+23	+15
	2.5	+15	+16	+11
	5	+1	+2	+10

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipozomlar ikili lipit tabakası ile çevrilmiş ve iç kısmında bir sulu faz içeren küreciklerdir. Hem lipofilik hem de hidrofilik maddeleri yapılarında taşıyabilme özelliği ve hücre membranına benzerliği nedeniyle ileri ve akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde son derece stratejik öneme sahiptir. Farklı tip lipozomların sentezi için değişik hazırlama teknikleri ve lipidik bileşimler kullanılmaktadır. Değişik lipozom formülasyonlarının karakteristik özellikleri hazırlama tekniğine ve lipidik bileşimine bağlıdır. Bu değişkenler, elde edilen lipozomal ürünün yer alacağı prosesteki davranışı üzerinde önemli etkiye sahiptir. Bu bağlamda lipozomal sistemlerin uygulama potansiyeli dikkate alındığında, fiziksel karakterizasyonlarının uygunluğu büyük önem taşımaktadır. Lipozomal sistemlerin ortalama hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri geliştirilecek olan lipozomun klerens kinetiğini etkilemektedir. Lipozomların *in-vivo* davranışını etkileyen, taşıyıcıya ait fiziksel ve kimyasal özellikler çok fazla ayrıntıları ile çalışılmaktadır. Büyük lipozomlar, küçük olanlara göre çok hızlı bir şekilde biyolojik engelleri aşmaktadırlar. Negatif yüklü lipozomlar ise, nötral ve pozitif yüklü olanlara göre yine engelleri daha hızlı aşma yeteneğine sahiptirler. Negatif yüklü lipozomlar yüksüz ve pozitif yüklülerden daha çabuk elimine edilirler. Pozitif yüklü lipozomlar retiküloendotelial sistem korunmalı lipozomların tersine hücre membranına ilgileri çok fazladır ve genellikle genetik maddeleri (ribo nükleik asit, oligonükleotidler gibi) hücre içine taşımak için kullanılırlar. Hücre membranı ile füzyon yaparak birleşirler. Büyüklüğü, yükü, hazırlama koşulları ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri önemli rol oynamaktadır.

Günümüze kadar lipozomların hazırlanmasında birçok yöntem geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemlerde fazla miktarda kloroform, eter, freon, metilen klorür ve metanol gibi organik çözücü kullanılmaktadır. Bu organik çözücüler insan sağlığına ve çevreye karşı zararlıdır. Belirtilen organik çözücü ortamlarında hazırlanan lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerinde organik çözücü kullanımından dolayı karşılaşılan zararlı etkiler vardır. Buna ek olarak, tüm bu yöntemler lipozomların endüstriyel boyutta üretimi için uygun değildir. Bunun nedeni lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerinin üretiminin birçok proses

basamağını içermesidir. Bu basamaklarda ürün kayıpları ve üretim ortamından gelen kirliliklerin zararlı etkisi olduğu bilinmektedir. Lipozomların hazırlanması için birçok geleneksel yöntem bulunmasına karşın Bangham metodu, organik çözücü enjeksiyon metodu ve ters faz buharlaştırma metodu en yaygın kullanılan geleneksel yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerde yüksek miktarda organik çözücü kullanımına gereksinim duyulur. Bu bağlamda, organik çözücü ortamlarında hazırlanan lipozomal formülasyonları yukarıda da belirtildiği gibi hem çevreye hem de insan sağlığına zararlı etkileri bulunmaktadır. Bu noktada günümüzde herhangi bir organik çözücü kullanmaksızın sulu sistemler için yüksek kapsülleme etkinliği sağlayabilen lipozom formülasyonların hazırlanmasında birçok yöntem halen araştırma aşamasındadır. Lipozomların bir ilaç taşıyıcı ve salım sistemi olarak kullanımında preparatların hazırlanmalarında olabildiğince organik çözücü kullanımından kaçınılmalı, kullanımı zorunlu olduğu koşullarda ise üründe organik çözücünün maksimum düzeyde uzaklaştırılması sağlanabilmelidir (Zhong ve Dai, 2011).

Bir maddenin çözünürlüğü çözücünün cinsine, ortamın sıcaklığı ve basıncına bağlıdır. Canlı sistemlerde bu değerler sabit olup değiştirilemez. Bu nedenle çözme gücüne etki eden bir diğer parametre olan partikül boyutunun ilaç uygulanabilirliğine etkisi büyüktür. Boyut ve boyut dağılımı faktörünün incelenmesi için kullanılan klasik yöntemlerden ortaya çıkan en önemli sonuç lipozom nanopartiküllerinin hazırlamasındaki yetersizlik olup nanopartiküllerin hazırlanmasında aşırı miktarda kullanılan çözücünden kaynaklı toksik etki nedeniyle ilaç etken maddelerinin vücut içerisindeki etkinliğinin azalması ve sıcaklığa duyarlı ilaç etken maddelerin denatüre olarak etkinliğini kaybettiği bilinmektedir. Bu darboğazların aşılmasına yönelik yeni nanopartikül hazırlama yöntemleri önem kazanmaktadır. Bu yöntemlerden biri de süperkritik akışkan teknolojisidir. Bu yöntemde organik çözücü miktarı minimize edilerek toksik etkinin azaltılabileceği, daha küçük ve daha homojen partiküller elde edilebileceği ve düşük sıcaklıklarda çalışılmasına olanak sağlayarak ilaçların bozulmasını engelleyebileceği en önemli avantajlarından olduğu bilinmektedir (Aburai ve ark., 2011).

Bu çalışmada, SCCO₂ teknolojileri arasında yer alan RESS ve RESOLVE prosesleri ile farklı iyonik özellikteki lipozomal sistemlerin tasarımları gerçekleştirilmiştir. Hem RESS hem de RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin tasarımında lipozomların boyut dağılımlarına işletme basıncının etkisi 10,20 ve 30 MPa koşullarında anyonik yüzey aktif madde DPPG derişiminin 1.25, 2.5 ve 5 mg/mL olduğu koşullarda ve anyonik lipozomal sistemlerin tasarımında ise katyonik yüzey aktif madde DDAB derişiminin 1.25, 2.5 ve 5 mg/mL olduğu koşullarda araştırılmıştır.

- RESS prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin üretiminde genel olarak incelenen belli bir DPPG derişiminde işletme basıncı ile monodispers boyut dağılıma sahip ve boyut dağılımları 44-164 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte basıncın boyut dağılımı üzerinde önemli bir etki saptanmamıştır.
- RESS prosesi ile katyonik lipozomal sistemlerin üretiminde düşük ve orta DDAB derişimlerinde işletme basıncı ile lipozomal sistemlerin boyutları önce artmakta sonra azalmaktadır. Ancak yüksek DDAB derişimlerinde, lipozomal sistemlerin boyut dağılımına işletme basıncının etkisi bulunmamaktadır. $C_{DDAB}=5$ mg/mL olduğu koşulda monodispers boyut dağılıma sahip ve boyut dağılımları 44-122 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir.
- RESOLVE prosesi ile anyonik lipozomal sistemlerin üretiminde düşük DPPG derişiminde ve 20 MPa üzerindeki koşulda 142-342 nm boyut aralığından 79-164 nm boyut aralığına düşmektedir. Yüksek DPPG derişiminde ise işletme basıncının artmasıyla lipozomların boyutları 59-122 nm aralığından 142-295 nm aralığına artmaktadır. $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda monodispers boyut dağılıma sahip ve boyut dağılımları 91-190 nm arasında değişen lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir.
- RESOLVE prosesi ile katyonik lipozomal sistemlerin üretiminde düşük DDAB derişiminde basıncın artmasıyla mikrometre boyutlu lipozomal sistemlerden nano boyutlu lipozomal sistemlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. Yüksek DDAB derişimlerinde ise mikrometre boyutlarında lipozomal sistemlerin tasarımları gerçekleştirilmiştir. Ancak $C_{DPPG}=2.5$ mg/mL olduğu koşulda, işletme basıncının

artmasıyla lipozomal sistemlerin boyutları önce azalmakta sonra artmaktadır. Genel olarak 44-190 nm arasında değişime monodispers boyut dağılıma sahip lipozomal sistemleri üretilmiştir.

Hem RESS hem de RESOLVE proseslerinden elde edilen anyonik ve katyonik lipozomal sistemlerin depolama süresi ile hidrodinamik boyutlarındaki değişimler 28 gün süresince incelenmiştir. Bu süreçte;

- RESS prosesiyle üretilen anyonik lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyut dağılımları depolama süreci ile önemli bir değişim göstermemektedir. Üretimin gerçekleştiği tüm ortam bileşimlerinde ve işletme koşullarında elde edilen lipozomal sistemler hidrodinamik boyut dağılımlarını depolama süreci boyunca korumaktadır.
- RESS prosesiyle üretilen katyonik lipozomal sistemlerinde ise 10 MPa'da düşük ve orta DDAB derişimlerinde elde edilen lipozomların hidrodinamik boyutları depolama süresi ile artmaktadır. Yüksek DDAB derişiminde ise depolama süreci ile lipozomlar 59-190 nm arasında değişen monodispers bir boyut dağılıma sahiptir. 20 MPa'da ise incelenen her bir DDAB derişimlerinde lipozomlar hidrodinamik boyut dağılımlarını genel olarak korumaktadır. 30 MPa'da düşük ve yüksek DDAB derişimlerinde lipozomlar hidrodinamik boyut dağılımlarını genel olarak korumaktadır. Ancak orta DDAB derişiminde depolama süreci ile lipozomal sistemlerin boyutları önce artmakta sonra azalmaktadır.
- RESOLVE prosesiyle üretilen anyonik lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyut dağılımları; 10 MPa'da yüksek DPPG derişimi dışındaki koşullarda depolama süreci sonunda nano boyutlardan mikrometre boyutlara doğru artmaktadır. Benzer değişim 20 MPa'da gerçekleşmektedir. 30 MPa'da ise lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarında nano boyutlardan mikrometre boyutlara geçişler görülmektedir.
- RESOLVE prosesiyle üretilen anyonik lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyut dağılımlarının depolama süreci ile değişimleri incelendiğinde; 10 MPa'da düşük ve yüksek DDAB derişimlerinde lipozomal sistemlerin hidrodinamik boyutlarının mikrometre düzeyinde olduğu saptanmıştır. Ancak $C_{DDAB}=2.5$

mg/mL olduğu koşulda depolama süreci ile lipozomal sistemler boyutlarını genel olarak korumakta ve boyutları 68-220 nm arasında değişmektedir. 20 MPa'da ise düşük DDAB derişiminde elde edilen lipozomal sistemlerin boyutları 51-79 nm aralığından 79-164 nm aralığına artmaktadır. Orta DDAB derişimlerde ise lipozomların boyutları başlangıç anına göre artarken yüksek DDAB derişiminde ise mikrometre boyutlarındaki lipozomal sistemin boyutları mikrometre düzeyinde olup depolama süreci ile azalmaktadır. 30 MPa'da düşük DDAB derişiminde üretilen lipozomal sistemler depolama süreci ile mikrometre boyuta geçmektedir. $C_{DDAB}=2.5$ mg/mL'da tasarlanan lipozomal formların depola süreci ile boyutlarında genel olarak önemli bir değişim olmayıp 59-190 nm arasında değişmektedir. Yüksek DDAB derişiminde ise mikrometre boyutlarındaki lipozomal sistemin boyutları mikrometre düzeyinde olup depolama süreci ile önce artmakta sonra azalmaktadır.

Depolama süreci ile tasarımları gerçekleştirilen lipozomal sistemlerin yüzey yüklerindeki değişimlerde incelenmiştir. Bu süreçte;

- RESS prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yükleri incelenen işletme basıncı ve DPPG derişiminde depolama süreci boyunca yüzey yüklerini korumaktadır. Genel olarak -38 mV ile -60 mV aralığında değişen anyonik lipozomal formlar oldukça kararlı yapıdadır.
- RESS prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yükleri de incelenen işletme basıncı ve DPPG derişiminde depolama süreci boyunca yüzey yüklerini korumaktadır. Genel olarak +27 mV ile +54 mV aralığında değişen katyonik lipozomal formlar oldukça kararlı yapıdadır.
- RESOLVE prosesi ile üretilen anyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yükleri incelenen işletme basıncı ve DPPG derişiminde depolama süreci boyunca yüzey yüklerini korumaktadır. Genel olarak -30 mV ile -36 mV aralığında değişen anyonik lipozomal formlar oldukça kararlı yapıdadır.
- RESOLVE prosesi ile üretilen katyonik lipozomal sistemlerin depolama süreci boyunca yüzey yükleri incelenen işletme basıncı ve DPPG derişiminde depolama

süreci boyunca yüzey yükleri genel olarak değişkenlik göstermektedir. Genel olarak +1 ile +23 mV aralığında değişen katyonik lipozomal formlar oldukça kararsız yapıda olup çökme eğilimindedir.



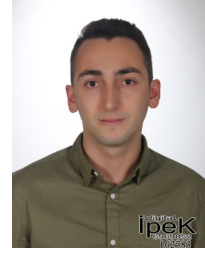
KAYNAKLAR

- Aburai, K., Yagi, N., Yokoyama, Y., Okuno, H., Sakai, K., Sakai, H., Sakamoto, K., Abe, M.** (2011). Preparation of liposomes modified with lipopeptides using a supercritical carbon dioxide reverse-phase evaporation method. *Journal of Oleo Science*, 60, 209-215.
- Arıca, B.** (1992). Primakin difosfat lipozomlarının formülasyonu, in vitro salıverilmesi ve in vivo dağılımı üzerinde çalışmalar. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (Bilim Uzmanlığı Tezi). 188s, Ankara.
- Bangham, A.D.,** (1965). Standish, M.M., Watkins, J.C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13, 238-262.
- Badens, E., Magnan, C., Charbit, G.** (2001). Microparticles of soy lecithin formed by supercritical processes, *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 194–204.
- Bahadır, S.** (2012). Ligand destekli ultrafiltrasyon ile rasemik amino asit karışımlarının ayrılması. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (Yüksek Lisans Tezi), Sivas.
- Batzri, S., Korn, E.,** (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication, *Biochimica et Biophysica Acta*, 298, 1015-1019.
- Castor, T. P.** (1994). Methods and apparatus for liposomes preparation, World Patent, WO9427581.
- Castor, T. P., Chu, L.** (1996). Methods and apparatus for making liposomes containing hydrophobic drugs, World Patent, WO9615774.
- Deamer, D., Bangham, A.D.,** (1976) Large volume liposomes by an ether vaporization method, *Biochimica et Biophysica Acta*, 443, 629-634.
- Deamer, D.W.,** (1978) Preparation and properties of ether-injection liposomes, *Annals of the New York Academy Science*, 308, 250-258.
- Frederiksen, L., Anton, K., Hoogevest, P.V., Keller, H.R., Leuenberger, H.** (1997). Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 921-928.
- Gulati, M, Grover, M, Singh, S, Singh, M.** (1998). Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 165: 129-168.
- Gursoy, A.Z.** Kontrollu salım sistemleri.1. İstanbul: Kontrollu Salım Sistemleri Derneği; 2002.
- Imura, T., Gotoh, T., Otake, K., Yoda, S., Takebayashi, Y., Yokoyama, S., Takebayashi, H., Sakai, H., Yuasa, M., Abe, M.** (2003). Control of physicochemical properties of liposomes using a supercritical reverse phase evaporation method, *Langmuir*, 19, 2021–2025.
- Imura, T., Otake, K., Hashimoto, S., Gotoh, T., Yuasa, M., Yokoyama, S., Sakai, H., Rathman, J. F., Abe, M.** (2002). Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 27, 133–140.

- Kadimi, U.S., Balasubramanian, D.R., Ganni, U.R., Balaraman, M., Govindarajulu, V.** (2007). In vitro studies on liposomal amphotericin B obtained by supercritical carbon dioxide-mediated process, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 273–280.
- Kunastitchai, S., Pichert, L., Sarisuta, N., Müller, B. W.** (2006). Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form, *International Journal of Pharmaceutics*, 316, 93–101.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., Fessi, H.** (2012). Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1, 147-168.
- Lesoin, L., Boutin, O., Crampon, C., Badens, E.** (2010). The CAS method: A continuous anti-solvent process to produce liposomes using supercritical CO₂, In Ninth Conference on Supercritical Fluids and Their Applications: September 5–8 2010, Salerno, Edited by Reverchon E. Salerno: Centro Stampa di Ateneo–Università degli Studi di Salerno, 171–176.
- Lesoin, L., Crampon, C., Boutin, O., Badens, E.** (2011). Development of a continuous dense gas process for the production of liposomes, *The Journal of Supercritical Fluids*, 60, 51–62.
- Lesoin, L., Crampon, C., Boutin, O., Badens, E.** (2011). Preparation of liposomes using the supercritical anti-solvent (SAS) process and comparison with a conventional method, *The Journal of Supercritical Fluids*, 57, 162-174.
- Li, Y., Yang, D. J., Chen, S. L., Chen, S. B., Chan, A. S.** (2008). Comparative physicochemical characterization of phospholipids complex of puerarin formulated by conventional and supercritical methods, *Pharmaceutical Research*, 25, 563–577.
- Li, Y., Yang, D. J., Chen, S. L., Chen, S. B., Chan, A. S.** (2008). Process parameters and morphology in puerarin, phospholipids and their complex microparticles generation by supercritical antisolvent precipitation, *International Journal of Pharmaceutics*, 359, 35–45.
- Magnan, C., Badens, E., Commenges, N., Charbit, G.** (2000). Soy lecithin micronization by precipitation with a compressed fluid antisolvent — influence of process parameters, *The Journal of Supercritical Fluids*, 19, 69–77.
- Meure, L. A., Knott, R., Foster, N. R., Dehghani, F.** (2009). The depressurization of an expanded solution into aqueous media for the bulk production of liposomes, *Langmuir*, 25, 326–337.
- Naik, S., Patel, D., Surti, N., Misra, A.** (2010). Preparation of PEGylated liposomes of docetaxel using supercritical fluid technology, *The Journal of Supercritical Fluids*, 54, 110–119.
- New, R.R.C.** (1990). Preparation of liposomes, In: New, R.R.C (ed.), *Liposomes, A Practical Approach*, Oxford University Press, 33-104.
- Oku, N., Mac Donald, R.C.,** (1983). Differential effects of alkali metal chlorides on formation of giant liposomes by freezing and thawing and dialysis, *Biochemistry*, 22, 855-863.
- Otake, K., Shimomura, T., Goto, T., Imura, T., Furuya, T., Yoda, S., Takebayashi, Y., Sakai, H., Abe, M.** (2006). Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method, *Langmuir*, 22, 2543–2550.

- Otake, K., Imura, T., Sakai, H., Abe, M.** (2001). Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide, *Langmuir*, 17, 3898–3901.
- Otake, K., Shimomura, T., Goto, T., Imura, T., Furuya, T., Yoda, S., Takebayashi, Y., Sakai, H., Abe, M.** (2006). One-step preparation of chitosan-coated cationic liposomes by an improved supercritical reverse-phase evaporation method, *Langmuir*, 22, 4054–4059.
- Schieren, H., Rudolph, S., Finkelstein, .M., Coleman, P., Weissmann, G.** (1978). Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 542, 137-153.
- Szoka, F.C., Papahadjopoulos, D.,** (1978). A new procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture, by reverse phase evaporation (rev), *Proceedings of the National Academy of Science*, 75, 4194-4198.
- Talsma, H.** (1991). Preparation, characterization and stabilization of liposomes, University of Utrecht (PhD Thesis), The Netherlands.
- Xia, F., Xia, F., Jin, H., Zhao, Y., Guo, X.** (2011). Supercritical antisolvent-based technology for preparation of vitamin D3 proliposome and its characteristics, *Chinese Journal of Chemical engineering*, 19, 1039–1046.
- Xia, F., Hu, D., Jin, H., Zhao, Y., Liang, J.** (2012). Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique, *Food Hydrocolloids*, 26, 456–463.
- Wen, Z., Liu, B., Zheng, Z., You, X., Pua, Y., Li, Q.** (2010). Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique, *Chemical Engineering Research and Design*, 88, 1102–1107.
- Zhong, J., Dai, L. C.** (2011). Liposomal preparation by supercritical fluids technology. *African Journal of Biotechnology*, 10, 16406-16413.

Url-1 < <https://slidex.tips/download/lptler-lipitlerin-snflandrmas> > 20.11.2018



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Gökhan YILDIZ
Doğum Yeri ve Tarihi	Bakırköy, 14.09.1990
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Mehmet Akif Mahallesi, Serin Sokak No13/2 İkitelli, Küçükçekmece İSTANBUL
E-posta Adresi	gkhnldzz1@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Halkalı Toplu Konut Lisesi, 2009
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği, 2014
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği,

İş Tecrübesi

KETS Fabrics	2018 - Devam ediyor
--------------	---------------------