

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SEFİKSİMİN DÜŞÜK ÇÖZÜNÜRLÜK VE
PERMEABİLİTESİNİN SİKLODEKSTRİN TÜREVLERİ
KULLANILARAK ARTIRILMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Ecz. Nurten ÇELEN

Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SEFİKSİMİN DÜŞÜK ÇÖZÜNÜRLÜK VE PERMEABİLİTESİNİN
SİKLODEKSTRİN TÜREVLERİ KULLANILARAK ARTIRILMASI
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Ecz. Nurten ÇELEN

Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ

ANKARA

2015

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince, her türlü destek ve imkanı sağlayan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanı saygıdeğer hocam Sayın **Prof. Dr. Sema Çalış**'a ve bu süreçte bilimsel ve manevi yol göstericiliği ile bana destek olan saygıdeğer hocam Sayın **Prof. Dr. Erem Bilensoy**'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, antimikrobiyal etkinlik testini birlikte yürüttüğümüz saygıdeğer hocam **Yrd. Doç. Dr. Melike Ekizoğlu**'na, göstermiş olduğu sabır, ilgi ve desteğinden ötürü teşekkürlerimi sunarım. Yine tez çalışmalarım sırasında, Fourier Transform İnfrared Spektroskopi analizleri ve ¹H-NMR spektroskopisi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen **Dr. Ecz. Keriman Özadalı Sarı**'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteği, dostluğu ile hep yanımda olan, deneyimlerini ve bilgilerini benden esirgemeyen **Ecz. (B.U.) Kıvılcım Öztürk** başta olmak üzere bütün Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, Eczacılık Teknolojisi Bölümü'ndeki değerli hocalarıma, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, idari personelimize, teknisyenlerimize değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda beni destekleyen, dostluklarıyla hep yanımda olduklarını hissettiğim arkadaşım **Gizem Aşkın**'a ve **Gülnihal Gökçe**'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca etkin madde desteği için **Bilim İlaç**'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiç esirgemeyen, her zaman yanımda olan, varlığıyla bana güç veren nişanlım **Özgür Tezel**'e, kardeşim **Çiğdem Çelen**'e, **anneme, babama** ve neşe kaynağım olan yeğenlerim **Ela** ve **Ecrin Deniz**'e, en derin teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Çelen, N. Sefiksimin düşük çözünürlük ve permeabilitesinin siklodekstrin türevleri kullanılarak artırılması üzerine çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015 Sefiksim(SEF), üçüncü jenerasyon sefalosporin grubuna dahil olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve oral biyoyararlanımı % 40'tır. Siklodekstrinlerin (CD) suda çözünürlüğü düşük ilaçlarla etkileşerek bu ilaçların çözünürlüğünde artış sağlama özellikleri vardır. Ayrıca CD kompleksleşmesinin suda çözünürlüğü düşük ilaçların oral biyoyararlanımlarını da artırdıkları bilinmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada SEF'in sudaki çözünürlüğünü, permeabilitesini ve dolayısıyla oral biyoyararlanımını artırmak amacı ile SEF içeren CD komplekslerinin hazırlanması ve bunların toz ve tablet formunda çözünme profillerinin tespiti amaçlanmıştır. Bu çalışmada beş farklı siklodekstrin türevi kullanılarak yapılan faz çözünürlük çalışmalarını takiben, iki farklı hazırlama yöntemi olan yoğurma ve çöktürme/dondurarak kurutma yöntemleri ile SEF:CD inklüzyon kompleksleri hazırlanmış ve fizikokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar optimum sonuçların yoğurma yöntemi ve HP- β -CD ile elde edildiğini göstermiştir. Yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD kompleksi ile tablet formülasyonu geliştirilmiş ve hem tablet formülasyonu hem de inklüzyon kompleksleri için çözünme testi yapılmıştır. Çözünme deneyleri de CD kompleksleşmesinin, çözünürlüğü anlamlı ölçüde artırdığını göstermiştir. SEF ve SEF:CD kompleksleri için Caco-2 hücreler ile yapılan permeasyon çalışmaları, SEF'in in vitro permeasyonunun CD kompleksleşmesi ile arttığını ve CD kompleksleşmesinin SEF'in sınırlı oral biyoyararlanımının artırılması için umut vaat eden bir çözüm olduğunu göstermektedir. Çözünme ve permeabilite çalışmaları da HP- β -CD ve yoğurma yönteminin en iyi veriler verdiğini destekler yönde bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sefiksim; Siklodekstrin; Inklüzyon kompleksi; Çözünürlük ve permeabilite artırma

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK (114S096) nolu 1002 Hızlı Destek Projesi

ABSTRACT

Celen, N. Studies for enhancing poor solubility and permeability of cefixime using cyclodextrin complexation. Hacetepe University Institute of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara, 2015

Cefixime(SEF) is a wide spectrum antibiotic that is included in the third generation cephalosporins group. Its oral bioavailability is reported to be 40 %. Cyclodextrins have the ability to interact with poorly water-soluble drugs resulting an increase in their apparent water solubility. It is also known that cyclodextrin complexation enhances oral bioavailability of poorly soluble drugs. Thus, it was aimed to design and develop cyclodextrin complexes containing SEF to improve aqueous solubility, permeability and oral bioavailability. In this study, using five different cyclodextrin derivatives, SEF's inclusion complexes were prepared by two different preparation methods which are kneading and coprecipitation/colyophilisation methods and resulting complexes then physicochemically characterized. Studies showed that the optimum results were obtained by kneading method and HP- β -CD. Tablet formulations were developed using SEF: HP- β -CD and SEF: M- β -CD kneaded complex and dissolution studies were carried out for both inclusion complexes and tablet formulations. Results of the dissolution studies also showed that complexation with cyclodextrins increased SEF dissolution rates significantly. In vitro permeability studies for SEF and SEF:CD inclusion complexes using Caco-2 cell culture model, indicates that cyclodextrin complexation also helps improve in vitro permeation of SEF increasing the drug's apparent permeability constant. Thus, it seems to be a promising solution for improving SEF's poor oral bioavailability. Both dissolution and phase solubility studies appear to confirm that among CD derivatives HP- β -CD and among complexation methods kneading method yield optimum data for cefixime.

Keywords: Cefixime; cyclodextrin; inclusion complex; enhancement poor solubility and permeability

Supported by TUBITAK (114S096) research project.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beta Laktam Antibiyotikleri	3
2.2. Sefalosporinler	3
2.2.1. Birinci Kuşak Sefalosporinler	5
2.2.2. İkinci Kuşak Sefalosporinler	5
2.2.3. Üçüncü Kuşak Sefalosporinler	5
2.2.4. Dördüncü Kuşak Sefalosporinler	5
2.3. Siklodekstrinler	12
2.3.1. Siklodekstrin Türevleri	16
2.3.2. İlaç:Siklodekstrin İnküzyon Kompleksleri	18
2.3.3. Komplekslerin Hazırlanma Yöntemleri	24
2.3.4. Komplekslerin Karakterizasyon Yöntemleri	25
2.3.5. Siklodekstrinlerin İlaçların Çözünürlüğü Üzerine Etkileri	27
2.3.6. Siklodekstrinlerin İlaç Biyoyararlanımı Üzerine Etkileri	29
2.3.7. Siklodekstrinlerin İntestinal Permeabilite Üzerine Etkileri	31
2.3.8. Siklodekstrinlerin İlaç Güvenilirliği Üzerine Etkisi	34
2.3.9. Siklodekstrinlerin İlaç Stabilitesi Üzerine Etkileri	35
2.3.10. Siklodekstrinlerin İlaç Taşınmasında Kullanılmaları	36
2.3.11. Siklodekstrinlerin Farmakokinetiği ve Toksisitesi	45
2.4. İlaçların Oral Yolla Uygulanması	46

2.4.1. Tabletler	47
2.4.2. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)	49
2.5. Caco-2 Hücreler ile Transport/Absorpsiyon Çalışmaları	51
2.5.1. Caco-2 Hücreler	51
2.5.2. Permeabilite/Transport Çalışmaları	53
3. GEREÇ ve YÖNTEM	54
3.1. Kullanılan Maddeler ve Aletler	54
3.1.1. Kimyasal Maddeler	54
3.1.2. Biyolojik maddeler	55
3.1.3. Aletler	55
3.2. Yöntemler ve Deneyler	57
3.2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	57
3.2.2. SEF trihidratın Miktar Tayini	58
3.2.3. Analitik Yöntem Validasyonu	59
3.2.4. Faz Çözünürlük Çalışmaları	63
3.2.5. İnküzyon Kompleksi Hazırlama Çalışmaları	64
3.2.6. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	64
3.2.7. SEF trihidrat ve Formülasyonların Toz Halde Çözünme Deneyleri	65
3.2.8. Tablet Formülasyonu Geliştirilmesi	66
3.2.9. Tabletlerin Çözünme Testleri	67
3.2.10. Antibakteriyel Etkinlik Testi	69
3.2.11. Caco-2 Hücreler ile SEF trihidrat Permeabilite Çalışmaları	70
4. BULGULAR	72
4.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	72
4.1.1. SEF trihidratın FTIR Spektrumu	72
4.1.2. SEF trihidratın X-Işını Kırınımı Analizi	72
4.1.3. SEF trihidratın DSC Analizi	75
4.1.4. SEF trihidratın ¹ H-NMR Spektrumu	75
4.1.5. SEF trihidratın SEM Görüntülemesi	78
4.1.6. SEF trihidratın UV Spektrumu	78
4.2. SEF trihidratın Miktar Tayini	80

4.2.1. Kalibrasyon Denklemine Ait Bulgular	80
4.3. Analitik Yöntem Validasyonuna İlişkin Bulgular	81
4.3.1. Özgünlük	81
4.3.2. Doğrusallık	84
4.3.3. Doğruluk	84
4.3.4. Kesinlik	85
4.3.5. Gözlenebilirlik Sınırı (LOD) ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (LOQ) Değerlerinin Saptanması	87
4.3.6. Stabilitate	87
4.4. Faz Çözünürlük Çalışmaları	88
4.5. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	94
4.5.1. İnküzyon Komplekslerinin FTIR Spektrumları	94
4.5.2. İnküzyon Komplekslerinin X-Işını Kırınımı Analizleri	97
4.5.3. İnküzyon Komplekslerinin DSC Analizleri	100
4.5.4. İnküzyon Komplekslerinin ¹ H-NMR Spektrumu	100
4.5.5. İnküzyon Komplekslerinin SEM Görüntülemesi	107
4.6. SEF ve Formülasyonların Çözünme Deneyleleri	111
4.7. Tabletlerin Çözünme Deneyleleri	118
4.8. Antibakteriyel Etkinlik Testi	124
4.9. Caco-2 Hücreler ile SEF trihidrat Permeabilite Çalışmaları	126
5. TARTIŞMA	128
5.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	128
5.2. SEF trihidratın Miktar Tayini	130
5.3. Faz Çözünürlük Çalışmaları	130
5.4. İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması	131
5.5. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	133
5.5.1. İnküzyon Komplekslerinin FTIR Spektrumları	134
5.5.2. İnküzyon Komplekslerinin X-Işını Kırınımı Analizleri	135
5.5.3. İnküzyon Komplekslerinin DSC Analizleri	136
5.5.4. İnküzyon Komplekslerinin ¹ H-NMR Spektrumu	136
5.5.5. İnküzyon Komplekslerinin SEM Görüntüleri	137
5.6. SEF ve Formülasyonların Çözünme Deneyleleri	138

5.7. Tablet Formülasyonlarının Hazırlanması	139
5.8. Tabletlerin Çözünme Deneyleri	140
5.9. SEF trihidratın Antibakteriyel Etkinlik Testi	142
5.10. Caco-2 Hücreler ile SEF trihidrat Permeabilite Çalışmaları	143
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	145
KAYNAKLAR	147
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
BCS	Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi
BSA	Bovine Serum Albumin
Caco-2	Kolon adenokarsinoma
SEF	Sefiksim
CD	Siklodekstrin
CDS	Kimyasal taşıyıcı sistem
CGTaz	Siklodekstrin glukozil transferaz
C _{max}	Maksimum plazma konsantrasyonu
CME-β-CD	Karboksimetiletil β-siklodekstrin
CMC	Karboksimetil selüloz
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EXE	Ekzemestan
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier transform infrared spektroskopisi
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
HPMC	Hidroksipropil metil selüloz
HP-β-CD	Hidroksipropil-β-siklodekstrin
HP-γ-CD	Hidroksipropil-γ-siklodekstrin
IR	İnfrared
i.m.	İntramuskuler (kas içi)
i.v.	İntravenöz (damar içi)
KE	Kompleks etkinliği
LC	Sıvı kromatografisi
LOD	Gözlenebilirlik sınırı

LOQ	Tayin sınırı
LPS	Lipopolisakkarit
MA	Molekül ağırlığı
MHA	Müller Hinton agar
MHSB	Müller Hinton sıvı besiyeri
MİK	Minimum inhibe edici konsantrasyon
M- β -CD	Metil- β -siklodekstrin
NaCMC	Sodyum karboksimetil selüloz
NMR	Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi
P-gp	P-glikoprotein
RM- β -CD	Random metil- β -siklodekstrin
SBE- β -CD	Sülfobütil eter- β -siklodekstrin
SLS	Sodyum lauril sülfat
SS	Standart sapma
TGA	Termogravimetrik analiz
USP	Amerikan farmakopesi
UV	Ultraviole
VK	Varyasyon katsayısı
X	Ortalama
X-RAY	X-ışını
X-RD	X-ışını difraksiyonu (kırınımı)
α -CD	α -siklodekstrin
β -CD	β -siklodekstrin
γ -CD	γ -siklodekstrin

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	β -laktam antibiyotiklerin etki mekanizması	3
2.2	Sefalosporinlerin Sınıflandırılması	4
2.3	Sefalosporin grubu antibiyotiklerin temel yapı çekirdeği	6
2.4	Sefalosporin grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları	6
2.5	SEF kimyasal yapısı	8
2.6	α , β ve γ CD'lerin şematik gösterimi	13
2.7	Siklodekstrinlerin genel yapısı	15
2.8	β -Siklodekstrin türevlerinin şematik gösterimi	17
2.9	Piyasada ticari ürünü bulunan siklodekstrin türevleri	18
2.10	Siklodekstrin internal kavite büyüklüğünün inklüzyon kompleksi yapısına etkisi	20
2.11	Siklodekstrin internal kavite büyüklüğünün inklüzyon kompleksi yapısına etkisi	20
2.12	Teorik faz çözünürlük diyagramları	22
2.13	İlaç:CD kompleksleşmesinin biyoyararlanım üzerine etkisi	30
2.14	Gastrointestinal kanalda safra asidi ile yarışmalı kompleks oluşumu sonucu İlaç:CD kompleksinden ilaç salımının ve absorpsiyonunun artmasının şematik gösterimi	30
2.15	Biyolojik membrandan ilaç permeasyonu şematik gösterimi	32
2.16	Siklodekstrinler ile penetrasyon artışının şematik gösterimi	32
2.17	Siklodekstrinlerin P-gp inhibisyonu şematik gösterimi	33
2.18	Tablet etkin maddesinin intestinal absorpsiyonla kan dolaşımına geçişi	47
2.19	Gastrointestinal kanalda ilaç biyoyararlanım oranı ile ilgili prosesler	48
2.20	BCS Şematik Gösterimi	51
2.21	Membran transport mekanizmaları	52
3.1	ThinCert şematik gösterimi	71
4.1	SEF trihidratın FTIR spektrumu	73
4.2	SEF trihidratın X-ışını kristalogramı	74

4.3	SEF trihidratın DSC termogramı	75
4.4	SEF trihidratın ¹ H-NMR spektrumu	77
4.5	SEF trihidratın SEM görüntüsü	78
4.6	SEF trihidratın UV spektrumunun literatürdeki UV spektrumuyla karşılaştırılmasını gösteren şekil	79
4.7	SEF trihidratın pH 7.2 Fosfat tamponundaki (100 µg/mL) HPLC kromatogramı	80
4.8	SEF trihidrat kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon denklemi	81
4.9	SEF trihidrat ve kullanılan diğer maddelerin HPLC spektrumları	82
4.10	SEF trihidrat ve kullanılan diğer maddelerin HPLC spektrumları	83
4.11	SEF trihidratın HP-β-CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı	88
4.12	SEF trihidratın M-β-CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı	89
4.13	SEF trihidratın α-CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı	89
4.14	SEF trihidrat β-CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı	90
4.15	SEF trihidratın γ-CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı	90
4.16	SEF trihidrat, HP-β-CD, SEF:HP-β-CD fiziksel karışımı, SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma), SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) FTIR spektrumları	95
4.17	SEF trihidrat, M-β-CD, SEF:M-β-CD fiziksel karışımı, SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma), SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) FTIR spektrumları	96
4.18	SEF trihidrat, HP-β-CD, SEF:HP-β-CD fiziksel karışımı, SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma), SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) X-ışını kristalogramları	98
4.19	SEF trihidrat, M-β-CD, SEF:M-β-CD fiziksel karışımı, SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma), SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) X-ışını kristalogramları	99
4.20	Bütün inklüzyon kompleksleri ve fiziksel karışımların DSC	100

4.21	HP- β -CD'e ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	103
4.22	M- β -CD'e ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	103
4.23	SEF: HP- β -CD fiziksel karışımına ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	104
4.24	SEF: M- β -CD fiziksel karışımına ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	104
4.25	SEF: HP- β -CD birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	105
4.26	SEF: M- β -CD birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	105
4.27	SEF:HP- β -CD yoğurma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	106
4.28	SEF:M- β -CD yoğurma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	106
4.29	HP- β -CD SEM görüntüsü	107
4.30	SEF: HP- β -CD fiziksel karışımı SEM görüntüsü	107
4.31	Birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan SEF: HP- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü	108
4.32	Yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF: HP- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü	108
4.33	M- β -CD SEM görüntüsü	109
4.34	SEF: M- β -CD fiziksel karışımı SEM görüntüsü	109
4.35	Birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan SEF: M- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü	110
4.36	Yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF: M- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü	110
4.37	400 mg SEF, doğal siklodekstrinler ve türevleri ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünme profilleri. (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	115
4.38	400 mg SEF, doğal siklodekstrinler ve türevleri ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünme profilleri. (1) Birlikte	115

	çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	
4.39	400 mg SEF, HP- β -CD ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	116
4.40	400 mg SEF, M- β -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	116
4.41	400 mg SEF, α -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	117
4.42	400 mg SEF, β -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	117
4.43	400 mg SEF, γ -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	118
4.44	Referans tablet, laboratuvar ortamında hazırlanan 400 mg SEF ve 100 mg SEF tabletlerin çözünme profilleri (pH 7,2 fosfat tamponu)	121
4.45	Referans tablet, SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD ile yoğurma yöntemi kullanılarak hazırlanan tabletlerin pH 7,2 fosfat tamponunda çözünme profilleri	121
4.46	Referans tablet, SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD ile yoğurma yöntemi kullanılarak hazırlanan tabletlerin suda çözünme profilleri	123
4.47	SEF trihidrat ve hazırlanan formülasyonların E.coli'ye karşı MİK değerleri	125
4.48	SEF trihidrat ve SEF:CD komplekslerinin Caco-2 hücrelerden geçiş P_{app} değerleri değerleri	127

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1 SEF'in farmakokinetik özellikleri	10
2.2 Siklodekstrinlerin tarihsel gelişimi	12
2.3 Doğal siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri	14
2.4 β -CD'in farmasötik olarak önemli türevleri	17
2.5 Ticari olarak piyasada bulunan CD türevlerine ilişkin örnekler	18
2.6 Kompleksleşme etkinliğini artırma yöntemleri	23
2.7 Siklodekstrinler ile çözünürlüğü artan ilaçlara örnekler	28
2.8 Siklodekstrinlerin ilaç biyoyararlanımı ve biyolojik membranlardan penetrasyonu üzerindeki etkileri	34
2.9 Siklodekstrinlerin ilaç stabilitesi üzerine etkileri	35
2.10 Oral İlaç Taşınmasında Siklodekstrin Uygulamaları	37
2.11 Oküler İlaç Taşınmasında Siklodekstrin Uygulamaları	39
2.12 CD'ler ile ilaç salım bölgesinin ve/veya zaman profilinin modifikasyonu	41
2.13 İlaç:CD kompleksleri ve ilaç taşıyıcı yeni sistemler	44
2.14 BCS ve CD'lerin ilaç biyoyararlanımları üzerindeki etkisi	49
3.1 SEF trihidrat ters faz HPLC yöntemi	58
4.1 SEF trihidrata ait protonların spektrumdaki sinyal değerleri	76
4.2 SEF trihidrat ve formülasyonda kullanılan maddelerin alıkonma zamanları	84
4.3 Geri kazanım yüzdeleri ve % VK	85
4.4 SEF trihidrat miktar tayini yöntemi tekrarlanabilirlik sonuçları	86
4.5 SEF trihidrat miktar tayini yöntemi için tekrar elde edilebilirlik sonuçları	87
4.6 SEF trihidrat miktar tayini yöntemi için stabilite sonuçları	88
4.7 SEF trihidratın çeşitli CD çözeltilerindeki çözünürlükleri	91
4.8 Siklodekstrin protonlarının inklüzyon kompleksi halinde $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda kayma değerleri	102
4.9 SEF ve farklı CD türevleri ile ve farklı yöntemlerle hazırlanan toz	112

	halde inklüzyon komplekslerinden zamana karşı çözünen SEF trihidrat miktarları (n=6). (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi	
4.10	SEF referans tablet, yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD tabletlerinden pH 7,2 fosfat tamponunda zamana karşı çözünen SEF miktarları (n=6)	119
4.11	SEF referans tablet, yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD tabletlerinden suda zamana karşı çözünen SEF miktarları (n=6)	122
4.12	Referans tablet ve hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD tabletlere ait f_1 ve f_2 istatistikleri	124
4.13	SEF trihidrat ve hazırlanan formülasyonların E.coli'ye karşı MİK değerleri	125
4.14	SEF trihidrat ve SEF:CD komplekslerinin Caco-2 hücrelerden geçiş P_{app} değerleri değerleri	126

1. GİRİŞ

Sefiksim, bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılmak üzere 1997 yılında FDA tarafından onaylanmış 3. jenerasyon sefalosporin grubuna dahil olan; ampicilin, sefalekssin, sefaklor ve trimetoprim sülfametoksazole dirençli *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde etkili, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. SEF, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösterir. Beta-laktamaz enzimlerine ileri derecede dayanıklıdır. Bu nedenle, beta-laktamaz varlığı nedeniyle penisilinlere ve bazı sefalosporinlere dirençli olan mikroorganizmalara etkilidir. Otitis media (orta kulak iltihabı), faranjit, bronşit gibi aşağı solunum yolu enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılmaktadır.

SEF, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'nde, (BCS) Sınıf IV'e dahildir, yani çözünürlük ve permeabilitesi düşüktür. Oral biyoyararlanımı, sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle % 40'tır. Çözünme, suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların oral absorpsiyonunda hız kısıtlayıcı basamaktır.

Nişastanın enzimatik parçalanma ürünleri olan siklodekstrinler (CD) suda çözünürlüğü zayıf ilaçlar ile kompleks oluşturarak, bu maddelerin çözünürlüklerini artırmaktadırlar. Çözünürlük artışının mekanizması, siklodekstrinlerin çözelti içinde kovalan olmayan dinamik inklüzyon kompleksleri oluşturmalarına dayanır. Çözünürlükteki bu artış, çözünmeyi ve biyoyararlanımı da artırır. Ayrıca intestinal absorpsiyon, siklodekstrinlerin penetrasyon artırıcı etkileri yardımı ile artırılmış olur.

SEF'in BCS Sınıf IV'e dahil olmasından kaynaklanan oral absorpsiyon ve biyoyararlanım sorunlarını giderebilmek amacıyla, çözünürlüğünün ve permeabilitesinin artırılması amaçlanmıştır. CD'ler ile inklüzyon kompleksleri oluşturularak çözünürlüğün artırılabilmesi, siklodekstrinlerin intestinal permeabiliteyi artırıcı etkisinin olması ve oral kullanımda siklodekstrinlerin toksisitesinin yok denilecek kadar az olması nedeni ile SEF:CD inklüzyon kompleksleri hazırlanmasına karar verilmiştir.

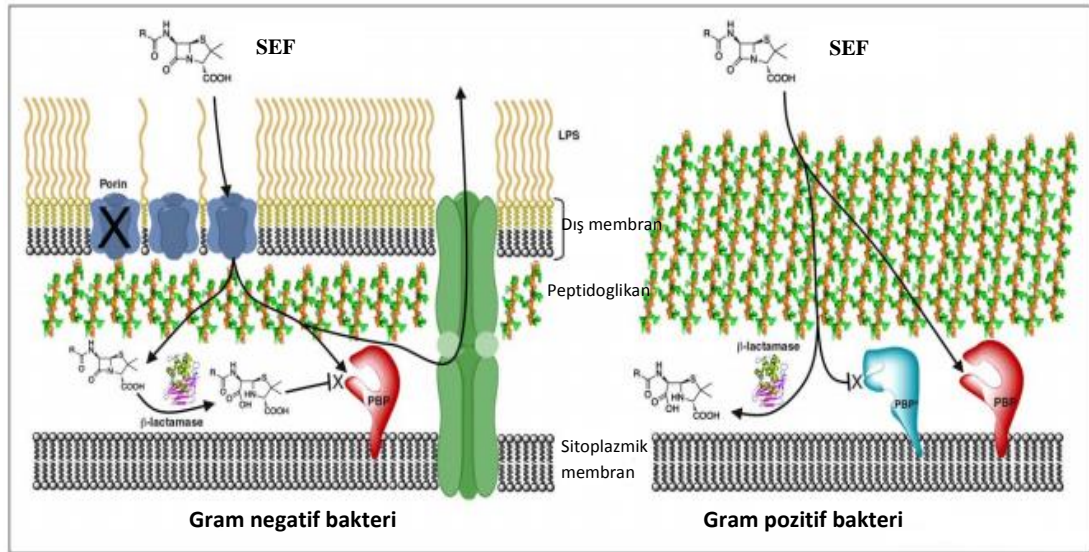
Bu tez çalışmasında, farmasötik alanda sıklıkla kullanılan siklodekstrin türevlerinden α -siklodekstrin (α -CD), β -siklodekstrin (β -CD), γ -siklodekstrin (γ -CD),

Metil- β -siklodekstrin (M- β -CD), Hidroksipropil- β -siklodekstrin (HP- β -CD) kullanılarak SEF'in iki farklı hazırlama yöntemi ile (yoğurma ve birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemleri) inklüzyon kompleksleri hazırlanmıştır. Kompleksleştirme işlemini takiben kompleks oluşumuna hazırlama yöntemi ve CD türevinin etkisini gözlemek amacıyla in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar, optimum CD türevini ve kompleks hazırlama yöntemini belirlemek üzere yapılmıştır. CD türevlerinin çözünürlük üzerindeki etkisini incelemek amacı ile faz çözünürlük çalışmaları ve DSC, FTIR, XRD, SEM gibi karakterizasyon tekniklerinin yanısıra kompleksleşmenin çözünmeye etkisini incelemek için de in vitro çözünme deneyleri yapılmıştır. Son olarak SEF'in siklodekstrinlerle kompleksleşmesi sonucu permeabilitesindeki değişiklikleri incelemek amacı ile Caco-2 hücreler ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beta Laktam Antibiyotikleri

Beta laktam antibiyotikleri, antimikrobiyal bileşiklerin en popüler ve en eski grubunu teşkil etmektedir (1). Penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamların dahil olduğu geniş bir grubu kapsamaktadır (2,3). Beta laktam antibiyotikleri etkilerini, bakteri hücre duvarı sentezini son aşamasında inhibe ederek göstermektedirler (2,4). Tüm beta laktam antibiyotikler; bakterilerde hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) transpeptidaz aktivitesini bloke ederek peptidoglikan sentezini engellemek suretiyle etki ederler. Sonuçta hücre duvarı sentezi yapılamayan bakteri lizise uğrar ve ölür. Beta-laktam antibiyotikler bakterisidal etkilidirler (2). Beta laktam antibiyotiklerin etki mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

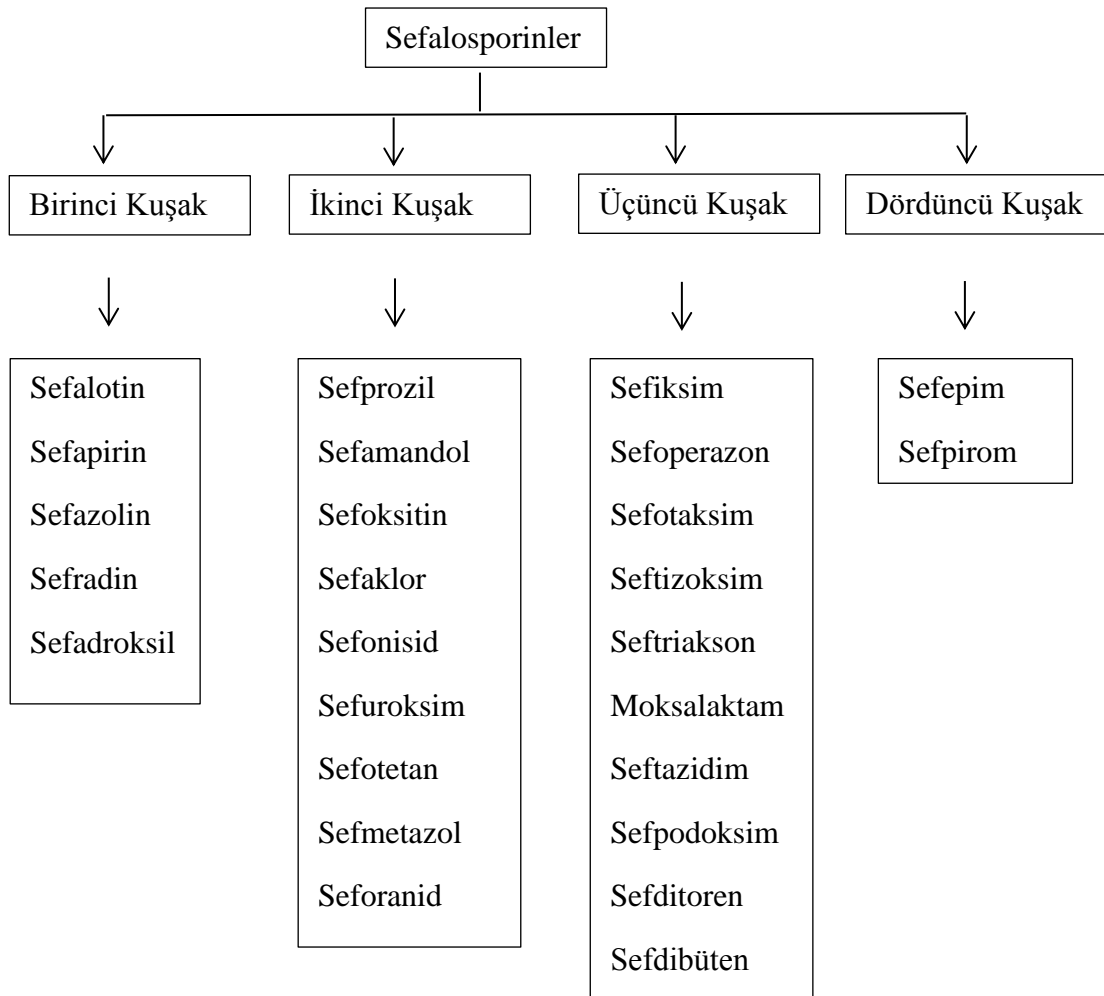


Şekil 2.1. β-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması (5).

2.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler, penisilinler gibi bakterisid etkileri olan ve tedavide penisilinlere benzer endikasyonlarda kullanılan β-laktam türevi antibiyotiklerdir.

Birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlerin, endikasyonların çoğunda penisilinlere belirgin bir üstünlükleri yokken, üçüncü kuşak sefalosporinler özellikle Gram negatif bakterilerin neden oldukları ciddi enfeksiyonlarda tercih edilirler (2,6). Birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere dahil olan ilaçlar Şekil 2.2’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. Sefalosporinlerin Sınıflandırılması.

2.2.1. Birinci Kuşak Sefalosporinler

Birince kuşak sefalosporinler (sefazolin, sefaleksim), Stafilokoklar gibi β -laktamaz üreten organizmalara karşı artmış aktivite göstermektedirler. Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkiliyken, anaerob bakteriler ve gram negatif bakteriler üzerinde etkileri düşüktür (2,6).

2.2.2. İkinci Kuşak Sefalosporinler

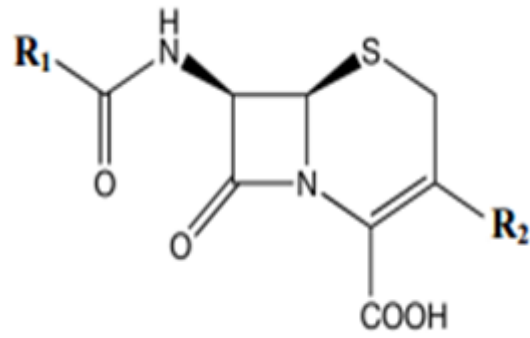
Yarılanma ömürleri, birinci kuşak sefalosporinlere göre daha uzundur. Beta laktamazlara karşı dayanıklı olduklarından etki spektrumları geniştir. Sefaklor, sefuroksim ikinci jenerasyon sefalosporinlere örnek verilebilir. Gram negatif bakteriler üzerinde, birinci kuşak sefalosporinlere oranla daha etkilidirler (2,6).

2.2.3. Üçüncü Kuşak Sefalosporinler

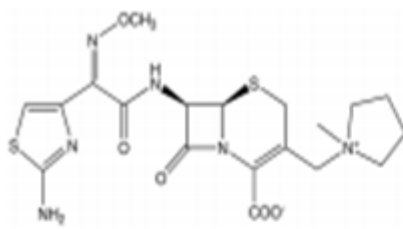
Üçüncü kuşak sefalosporinlerin etki spektrumları birbirinden farklılık göstermektedir (2). Sefaklor gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde oldukça etkilidir fakat çeşitli beta laktamazlara karşı dayanıklı değildir. SEF gram negatif bakteriler üzerinde güçlü etki gösterirken ve çeşitli beta laktamazlara dayanıklı iken Stafilokoklar üzerinde etkisi düşüktür (7).

2.2.4. Dördüncü Kuşak Sefalosporinler

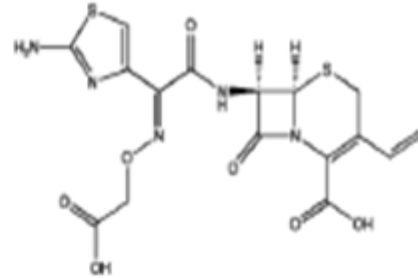
Dördüncü kuşak sefalosporinler, kromozomal β laktamazlara (örneğin, enterobakterlerin ürettiği) ve çoğu üçüncü kuşak sefalosporini inaktive eden genişlemiş spektrumlu β laktamazların hidrolizine daha dirençlidir. Bu kuşaktan Sefepim penisiline dirençli streptokokların çoğuna karşı iyi aktivite gösterir ve enterobakter enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Diğer yandan klinik rolü üçüncü kuşak sefalosporinler gibidir . Sefalosporin grubu antibiyotiklerin temel yapı çekirdekleri ve kimyasal yapıları Şekil 2.3 ve Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



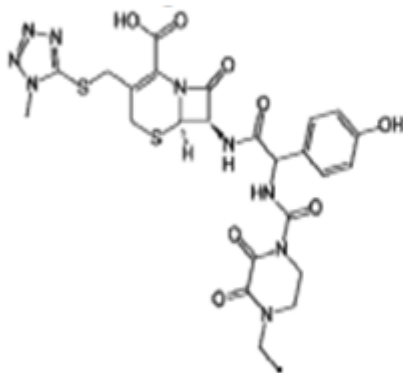
Şekil 2.3. Sefalosporin grubu antibiyotiklerin temel yapı çekirdeği.



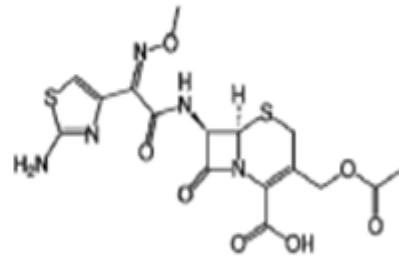
Sefepim



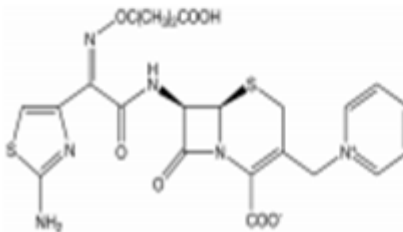
Sefiksım



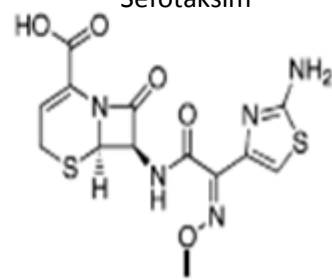
Sefoperazon



Sefotaksım



Seftazidım



Seftizoksım

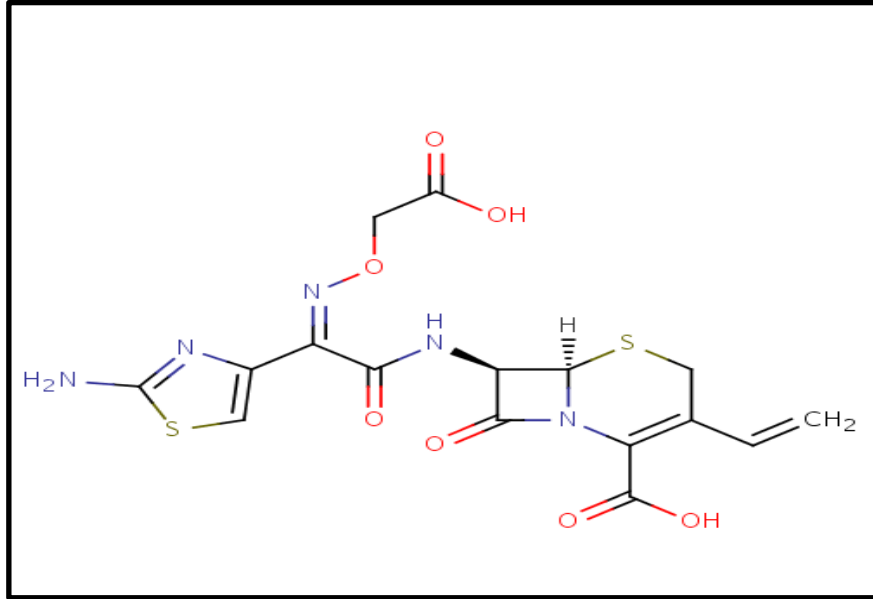
Şekil 2.4. Sefalosporin grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları.

Sefiksım (SEF)

SEF, bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılmak üzere 1997 yılında FDA tarafından onaylanmış 3. kuşak sefalosporin grubuna dahil olan; ampisilin, sefaleksın, sefaklor ve trimetoprim sülfametoksazole dirençli *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde etkili, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. SEF, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösterir. Beta-laktamaz enzimlerine ileri derecede dayanıklıdır. Bu nedenle, beta-laktamaz varlığı nedeniyle penisilinlere ve bazı sefalosporinlere dirençli olan mikroorganizmalara etkilidir. Otitis media, faranjit, bronşit gibi aşağı solunum yolu enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (7-10). SEF, BCS'ye göre Sınıf IV'e dahil olan bir ilaçtır, düşük çözünürlük ve permeabilite gösterir, bu nedenle de oral biyoyararlanımı düşüktür (11).

SEF'in Fizikokimyasal Özellikleri

SEF ; 453,45 g/mol molekül ağırlığına sahip, beyaz-sarımtırak renkte kristalize tozudur. Kimyasal yapısı (6R,7R)-7-(2-(2-Amino-4-thiazolyl)glyoxylamido)-8-oxo-3-vinyl-5-thia-1-azabicyclo (4.2.0)oct-2-ene- 2-carboxylic acid şeklindedir. Kapalı formülü C₁₆H₁₅N₅O₇S₂ şeklindedir. SEF pratik olarak su, eter, etil asetat ve heksanda çözünmez. Gliserol, alkol ve asetonda güç çözünür; metanolde serbestçe çözünür; propilen glikolde çözünür. SEF'in erime noktası 250 °C civarındadır (12-15). SEF kimyasal yapısı Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. SEF kimyasal yapısı.

SEF'in Etki Mekanizması

SEF, diğer beta laktam antibiyotiklerinde olduğu gibi, bakterisidal etkisini penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak ve peptidoglikan sentezini inhibe ederek bakteri hücre duvarına zarar vermek suretiyle göstermektedir.

SEF'in Dozu

Standart doz günde 400 mg'dır. Bu doz bir defada ya da 12 saat arayla iki kez olacak şekilde alınabilir. İdrar yolu enfeksiyonlarında günde bir defa 200 mg yeterlidir. Yaşlı hastalarda yetişkinler için önerilen doz şeması uygulanır. Böbrek yetmezliği varsa, böbrek fonksiyonu değerlerine göre gerekli düzenleme yapılır. Çocuklar için önerilen doz, günde kilo başına 8 mg'dır. Bu doz bir defada ya da iki eşit doza bölünerek verilebilir. İki yaşına kadar olan çocuklarda bu doz şemasına uyulur. İki yaşından büyük olanlarda pediatrik oral süspansiyonun aşağıdaki dozları kullanılabilir:

- 2-4 yaş arasında günde 5 ml
- 5-8 yaş arasında günde 10 mL

- 9-12 yaş arasında günde 15 mL

50 kg'dan ya da 12 yaştan büyük olan çocuklarda yetişkin dozu uygulanır. 6 aylıktan küçük çocuklarda SEF'in güvenilirliği ve etkinliği saptanmamıştır (15,16).

SEF'in Yan Etkileri

SEF, genel olarak iyi tolere edilen bir ilaçtır. Klinik uygulamalarda gözlenen yan etkilerden çoğu hafif ve sınırlı düzeyde olmuştur.

Mide-barsak bozuklukları: SEF tedavisi sırasında en sık bildirilen yan etkiler diyare ve feçes değişimleridir. Diyare orta ya da daha ağır derecede olabilir ve nadiren tedavinin kesilmesine yol açabilir. Daha seyrek rastlanan yan etkiler arasında bulantı, abdominal ağrı, dispepsi, kusma ve gaz şişkinliği vardır. Seyrek olarak psödomembranöz kolit bildirilmiştir.

Santral sinir sistemi etkileri: Baş ağrısı, baş dönmesi.

Aşırı duyarlılık reaksiyonları: Deri döküntüleri, pruritus, ürtiker, ateş ve eklem ağrıları türünde alerjiler gözlenmiştir. Bu etkiler, ilacın bırakılmasından sonra ortadan kalkar.

Hematolojik ve biyokimyasal etkiler: Trombositopeni, lökopeni, ve eozinofili bildirilmiştir. Bu reaksiyonlar seyrek ve geriye dönüşümlü niteliktedir. Karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinde hafif ve geçici değişimler görülmüştür (12-15,17).

SEF'in Farmakokinetik Özellikleri ve Biyoyararlanımı

Absorpsiyon

SEF'in yarılanma ömrü 3-4 saattir. 200 mg SEF'in oral alımını takiben 3 – 4 saat sonunda elde edilen maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaşmaktadır ve maksimum plazma konsantrasyonu 2.0 – 2.6 mg/mL'dir. SEF'in ortalama olarak biyoyararlanımı %40 ile %50 arasında değişmektedir. SEF'in farmakokinetiği yiyeceklerden etkilenmemektedir (17,18).

Dağılım

Iv tek dozdan sonra görünen dağılıma hacmi 6.7 L'dir. Kararlı denge dağılıma hacmi ise yaklaşık 17 L'dir (17). Plazma proteinlerine bağlanma %65 – 70'dir. Safra, balgam, bademcikler, maksiller sinüs mukozası, orta kulak akıntısı ve prostat sıvısına dağılmaktadır. 100 mg oral dozdan sonra insan sütünde tespit edilmemiştir.

Metabolizasyon

SEF'in plazma veya idrarda biyolojik olarak aktif metabolitine rastlanmamıştır (17).

Eliminasyon

200 mg dozun yaklaşık %12 – 20'si idrarla değişmeden atılmaktadır. Renal veya renal olmayan yollarla eliminasyona uğramaktadır. Eliminasyon yarılanma ömrü 2.4-4 saattir. Iv alımı takiben total sistemik klerensi 73 mL/dk'dır. Oral klerensi ise 150 – 190 mL'dk'dır (17). SEF'in farmakokinetik özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. SEF'in farmakokinetik özellikleri (13,18,19).

Biyoyararlanım	%40 - 50
Dağılıma hacmi	0.3 L/kg
Plazma proteinlerine bağlanma	% 65
Plazma yarılanma ömrü	3-4 saat
Eliminasyon yarılanma ömrü	1.3 mL/dk/kg
Eliminasyon	Renal

SEF'in Miktar Tayini

SEF miktar tayini için spektrofotometrik, kromatografik, voltametrik yöntemler, kapiller elektroforez vb kullanılmaktadır (20-24). Bu yöntemler arasında en çok kullanılanlar spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerdir.

SEF'in in vitro miktar tayini için ters faz HPLC kullanılabilir. Kromatografi UV dedeksiyon ile 260- 290 nm'de sabit sıcaklıkta yapılmaktadır (25).

SEF'in plazma ve idrardan miktar tayini için HPLC, HPTLC, voltametrik yöntemler kullanılmaktadır (26).

2.3. Siklodekstrinler

Nişastanın enzimatik degradesyon ürünü olan siklodekstrinler 100 yıldan uzun zamandır üzerinde çalışılan ve birçok farmasötik preparat içerisinde yer alan moleküllerdir (27). Siklodekstrinler ilk olarak Villers tarafından 1891 yılında keşfedilmiş olan doğal kaynaklı oligosakkaritlerdir (28,29). Yapılarından kaynaklanan fizikokimyasal özellikleri, bu moleküllerin eczacılık, tıp, kimya, tekstil gibi alanlarda kullanılmasını sağlamıştır. Farmasötik alanda, ilaçların sudaki çözünürlüğünün, çözünmesinin ve biyoyararlanımının iyileştirilmesi amacıyla veya kontrollü ilaç taşıyıcı sistem olarak, gastrointestinal sistem veya oküler irritasyonu azaltmak, kötü koku ve tadı maskeleyerek, ilaç-ilaç veya ilaç-eksiptiyen etkileşimlerini önlemek veya ilacın fiziksel ve kimyasal stabilitesini düzeltmek amacıyla kullanılmaktadırlar (30,31). Tablo 2.2’de siklodekstrinlerin tarih içerisindeki gelişimi özetlenmiştir.

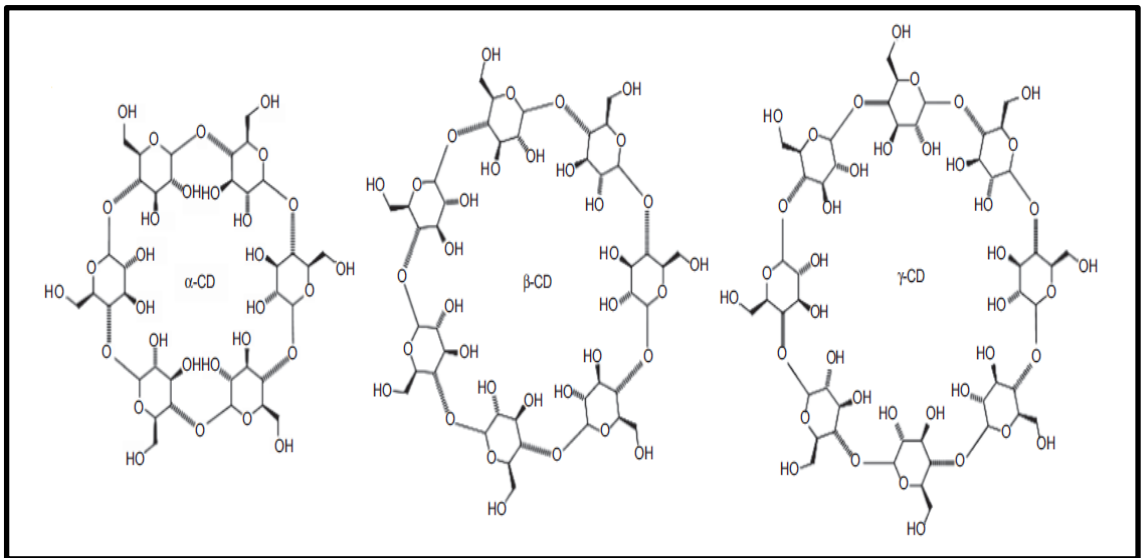
Tablo 2.2. Siklodekstrinlerin tarihsel gelişimi (27,32,33).

Tarih	Durum
1891	α ve β -siklodekstrinlerin keşfi
1903-1911	CD sentezinden sorumlu bakterinin izolasyonu ve farklı CD’lerin birbirinden ayrılması için girişim
1935	γ - siklodekstrinin keşfi
1936	CD’lerin siklik yapısının aydınlatılması
1940’lar	İnklüzyon kompleksi oluşumu fikrinin ortaya çıkması
1948	γ - CD yapısının aydınlatılması α , β ve γ -CDlerin yapılarının X-ışını kırınımı analizi ile aydınlatılması
1950’ler	İnklüzyon kompleksi oluşturma çalışmaları Büyük halkalı siklodekstrinleri keşfi
1953	CD’lerle alınan ilk patent
1965	İnklüzyon kompleksi oluşum mekanizmasının matematiksel modellerle açıklanması
1975	CD polimerlerle ilgili ilk yayın

Tablo 2.2. (Devam) Siklodekstrinlerin tarihsel gelişimi (27,32,33).

Tarih	Durum
1976	İlk ilacın piyasaya çıkışı
1980'ler	Yiyecek ve kozmetik endüstrisinde CD uygulamalarına geçilmesi
1981	İlk Uluslararası Siklodekstrin Sempozyumunun yapılması İlk Siklodekstrinin kitabının çıkması
2000'ler	CD agregasyonu üzerinde çalışmalar ve CD nanopartiküllerinin ortaya çıkışı

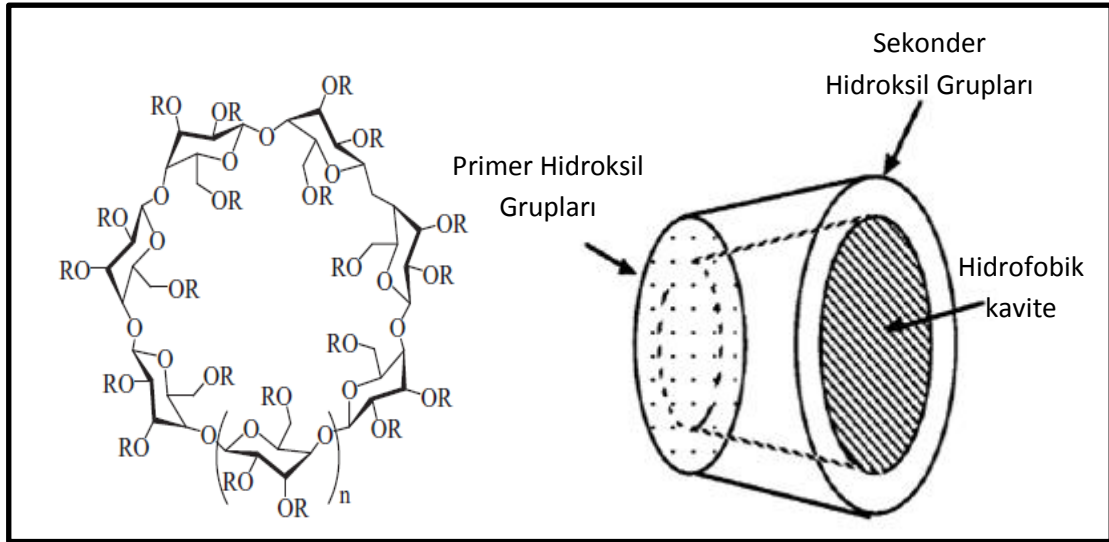
Siklodekstrinler nişastanın siklodekstrin glukozil transferaz (CGTaz) aracılığı ile enzimatik parçalanması sonucu elde edilen oligosakkaritlerdir (28). Enzimatik ürün, α , β ve γ siklodekstrinlerin karışımını içermektedir. Oligomerik siklodekstrin molekülleri birbirine α -1,4-D(+)-glukozidik bağı ile bağlanmış 6 – 8 glukopiranoz ünitesinden meydana gelmişlerdir (34). Farmasötik açıdan önem taşıyan α -siklodekstrin, β -siklodekstrin ve γ -siklodekstrin sırasıyla birbirlerine α -1,4-D(+)-glukozidik bağı ile bağlı 6, 7 ve 8 glukopiranoz ünitesi taşımaktadırlar (35). Doğal CD'lerin şematik gösterimi Şekil 2.6'da ve doğal CD'lerin fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

Şekil 2.6. α , β ve γ CD'lerin şematik gösterimi (35).

Tablo 2.3. Doğal siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri (35).

Karakteristik	Siklodekstrin tipi		
	α - CD	β - CD	γ - CD
Glukopiranoz ünitesi sayısı	6	7	8
Molekül ağırlığı (g/mol)	972	1135	1297
25°C, Sudaki çözünürlük (% a/a)	145	18.3	233
İç çapı (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Dış çapı (Å)	14.6	15.4	17.5
Kavite hacmi (Å)	174	262	427

Doğal siklodekstrinlerin kristal yapı analizleri, halkada bulunan tüm glukopiranoz ünitelerinin ekvatoryal pozisyonda oldukları için, termodinamik olarak istenen sandalye konformasyonuna sahip olduklarını göstermektedir. Bu konformasyon sonucunda, C(2) ve C(3)'e bağlı tüm sekonder hidroksil grupları, ekvatoryal konumda siklodekstrin kavitesinin geniş olan tarafında yer almaktadırlar. C(2)'ye bağlı hidroksiller kaviteye doğru, C(3)'e bağlı hidroksiller ise kaviteden dışarı doğru yönelmişlerdir. Kavitenin daha dar olan kısmında bulunan C(6)'ya bağlı primer hidroksil grupları, doğal CD'ler için iyi bir suda çözünürlük sağlamaktadırlar. Kavitede C-H gruplarının (C3), glukozidik oksijen atomlarının ve diğer C-H gruplarının (C5) halkası aynı hizada bulunmaktadır. Bu nedenle; kavite apolar bir karaktere sahiptir. CD'lerin fizikokimyasal özellikleri ve inklüzyon kompleksi oluşturma kapasiteleri, bu özel kimyasal yapının doğrudan sonucudur (32,33,36). CD'lerin genel yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Siklodekstrinlerin genel yapısı (33).

Doğal siklodekstrinler, insan salyası ve pankreatik amilaz tarafından hidroliz edilemez; intestinal mikroflora tarafından fermentasyona uğrarlar. Hidrofilik siklodekstrinlerin $\text{LogK}_{y/s}$ partisyon katsayısı değerleri -8 ile -12 arasında değişmektedir ve oral biyoyararlanımları % 4'ün altındadır. Bu nedenle hidrofilik siklodekstrinler düşük ve orta konsantrasyonlarda oral yoldan kullanıldıklarında non-toksik olarak kabul edilirler (37,38). Bazı siklodekstrin türevleri, örneğin metil siklodekstrinler, gastrointestinal kanaldan sistemik dolaşıma geçebilmekte ve parenteral uygulama sonrasında toksisite gösterebilmektedir. Sonuç olarak M- β -CD'lerin oral biyoyararlanımları, diğer CD türevlerine göre fazladır. Yapılan bir çalışmada M- β -CD'in oral biyoyararlanımı % 12 olarak bulunmuştur (39).

Parenteral olarak ise, α , β ve γ -siklodekstrinlerin hidrofilik türevleri kullanılabilir. γ -CD sulu çözeltide gözle görülür agregatlar oluşturduğu için parenteral uygulamaya uygun değildir (40). β -CD ise düşük çözünürlüğü ve bununla ilişkili yan etkileri (nefrotoksisite gibi) nedeniyle parenteral formülasyonlar için uygun değildir (32,37,41). Parenteral olarak uygulandığında β -CD'ler, metabolize olmazlar ve böbreklerde kolesterol ile suda çözünmeyen kompleksler oluşturarak birikirler (42).

2.3.1. Siklodekstrin Türevleri

Doğal siklodekstrinler ve doğal siklodekstrinlerle oluşturulan inklüzyon kompleksleri hidrofilik olsa da özellikle β -siklodekstrinin sudaki çözünürlüğü oldukça sınırlıdır (32,43). Bunun nedeni, CD molekülündeki hidroksil gruplarının kendi aralarında oluşturmuş olduğu hidrojen bağlarıdır (28). Siklodekstrinlerin türevlendirilmesinde amaç aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Doğal siklodekstrinlerin ve inklüzyon komplekslerinin çözünürlüğünü artırmak,
- CD ve konuk molekül arasındaki etkileşimi artırmak suretiyle daha dayanıklı kompleksler oluşturmak,
- Spesifik grupları CD molekülüne bağlamak ve yeni türevler sentezlemek,
- Siklodekstrinlerin biyolojik membranlardan geçişini artırmak
- İlaç salım özelliklerini değiştirmek (44).

Siklodekstrin türevleri kimyasal veya enzimatik olarak sentezlenebilmektedir. Bu siklodekstrin türevlerinin eldesinde, genel olarak 3 yöntemle süstitüsyon yapılmaktadır. Bu yöntemlerle elde edilen siklodekstrin türevleri şunlardır;

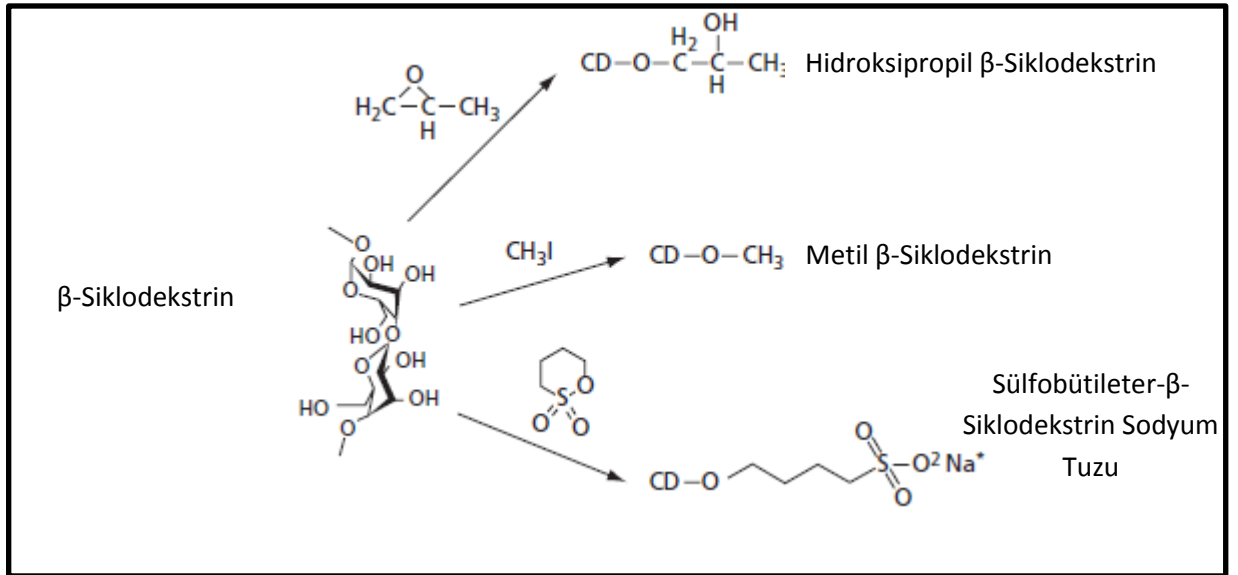
- Metillenmiş siklodekstrinler
- Hidroksipropillenmiş siklodekstrinler
- Sülfobütillenmiş siklodekstrinlerdir.

Metillenmiş Siklodekstrinler: Metilasyon, siklodekstrinde her glukopiranoz ünitesi için 2 veya 3 hidroksil grubu üzerinden gerçekleşir. Dimetil-siklodekstrinlerde, metilasyon C(6) numaralı pozisyondaki primer hidroksil grupları ve C(2) konumundaki sekonder hidroksil grupları üzerinde gerçekleşir, C(3) konumundaki sekonder hidroksil grupları serbest kalır. Trimetil-siklodekstrinlerde ise bütün hidroksil grupları süstitüe haldedir. Genellikle ve özellikle β -siklodekstrin süstitüsyonunun söz konusu olduğu durumlarda süstitüsyon rastgele gerçekleşmektedir ve süstitüsyon derecesi 1.8'dir (28).

Hidroksipropillenmiş Siklodekstrinler: Hidroksipropilasyon, metilasyon gibi seçici süstitüsyon vermemektedir ve reaksiyon esnasında hidroksipropil gruplarının

seçiciliği değişmektedir. Bu nedenle hidroksipropilasyon randomize şekilde gerçekleşmektedir. Bu tip türevlerin süstitüsyon dereceleri farklılık göstermektedir.

Sülfobütillenmiş Siklodekstrinler: Anyonik yapıdadırlar. Sülfobütillenmiş tek bir CD türevi vardır (SBE_{7m}-βCD). Yüklü grup siklodekstrinin kompleks oluşturma kapasitesini azaltsa da, sülfonat grubunun CD'den kolayca ayrılabilmesi nedeniyle SBE_{7m}-βCD yüksek bir ilaç bağlama kapasitesine sahiptir. β-Siklodekstrin türevlerinin şematik gösterimi Şekil 2.8'de ve β-CD'in farmasötik olarak önemli türevleri Tablo 2.4'te verilmiştir. Ticari olarak piyasada bulunan CD türevleri ise Tablo 2.5 ve Şekil 2.9'da özetlenmiştir.



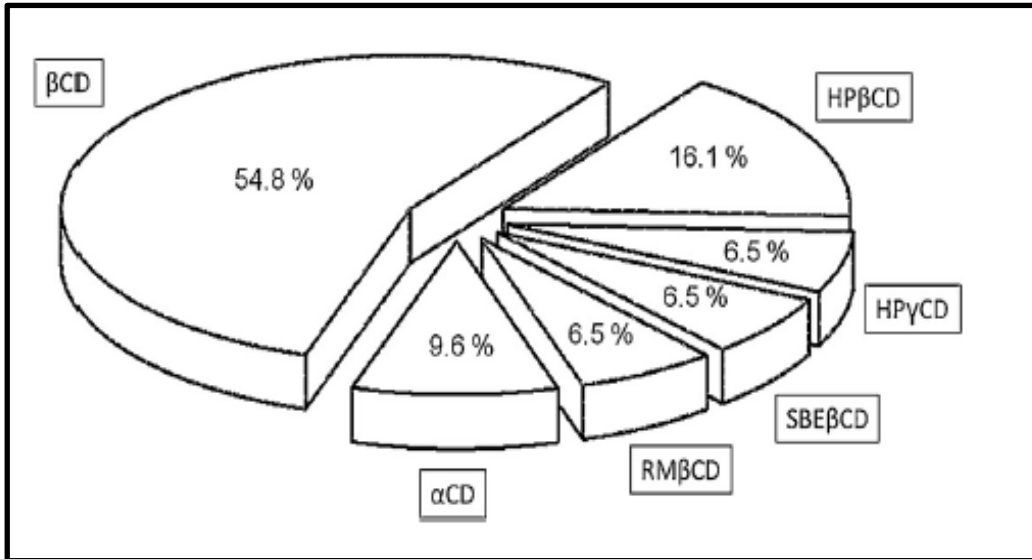
Şekil 2.8. β-Siklodekstrin türevlerinin şematik gösterimi (32).

Tablo 2.4. β-CD'in farmasötik olarak önemli türevleri (45).

Siklodekstrin	R=H veya
β-siklodekstrin	-H
2-Hidroksipropil- β-siklodekstrin	-CH ₂ CHOHCH ₃
Sülfobütileter β-siklodekstrin sodyum tuzu	-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ Na ⁺
Metil β-siklodekstrin	-CH ₃
Dallanmış β-siklodekstrin	Glukozil veya maltozil grubu

Tablo 2.5. Ticari olarak piyasada bulunan CD türevlerine ilişkin örnekler (46).

Siklodekstrin	Kullanıldığı Ticari Formülasyonlar
α -siklodekstrin	Oral ve parenteral formülasyonlar
β -siklodekstrin	Oral, bukkal ve topikal formülasyonlar
Hidroksipropil β -siklodekstrin	Oral, parenteral, rektal ve oftalmik formülasyonlar
Metil β -siklodekstrin	Göze ve buruna uygulanan formülasyonlar
Sülfobütiler β -siklodekstrin	Parenteral formülasyonlar



Şekil 2.9. Piyasada ticari ürünü bulunan siklodekstrin türevleri (27).

2.3.2. İlaç:Siklodekstrin İnküzyon Kompleksleri

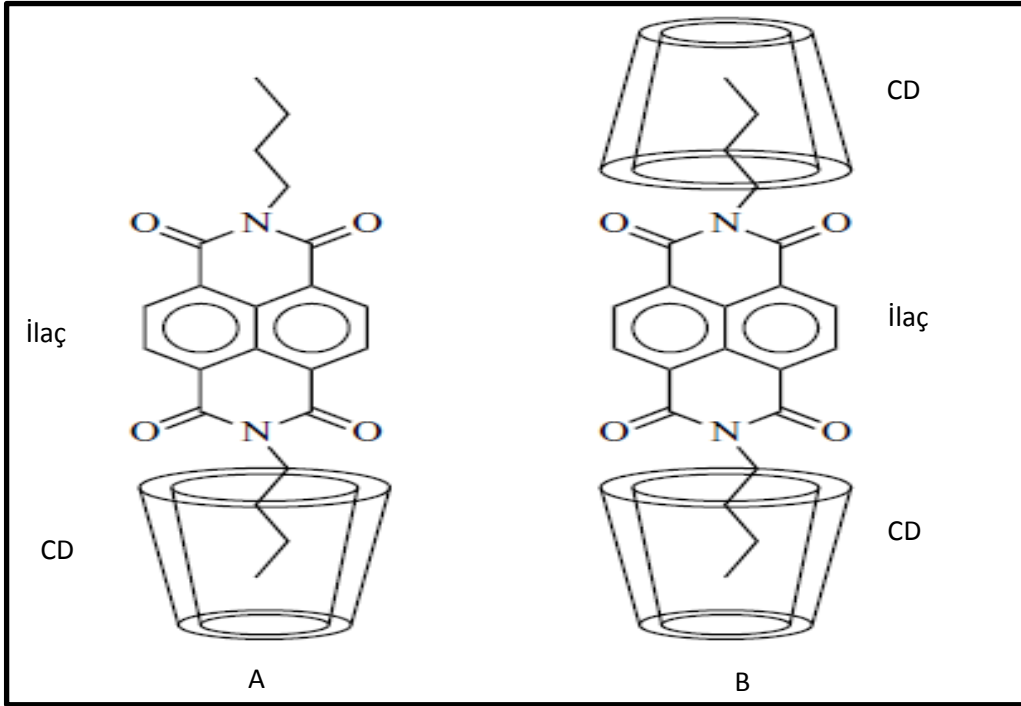
Siklodekstrinler yapılarından dolayı farmasötik alanda çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Hidrofobik molekülleri apolar kavitesine alır ve onların fizikokimyasal özelliklerini maskelerler. Siklodekstrinler eczacılıkta; çözünürlüğün artırılması, stabilite sorununun giderilmesi, yan etkilerin azaltılması, kötü tat veya kokunun maskelenmesi, biyoyararlanımın artırılması, absorpsiyonun iyileştirilmesi vb amaçlarla kullanılır (47).

Siklodekstrinler, yapılarından dolayı hidrofobik bir kaviteye sahiptir. Sulu çözeltilerinde, lipofilik ilaç molekülünün tamamını veya bir kısmını, hidrofobik kavitelere alarak suda çözünür inklüzyon kompleksleri oluşturmaktadırlar (48).

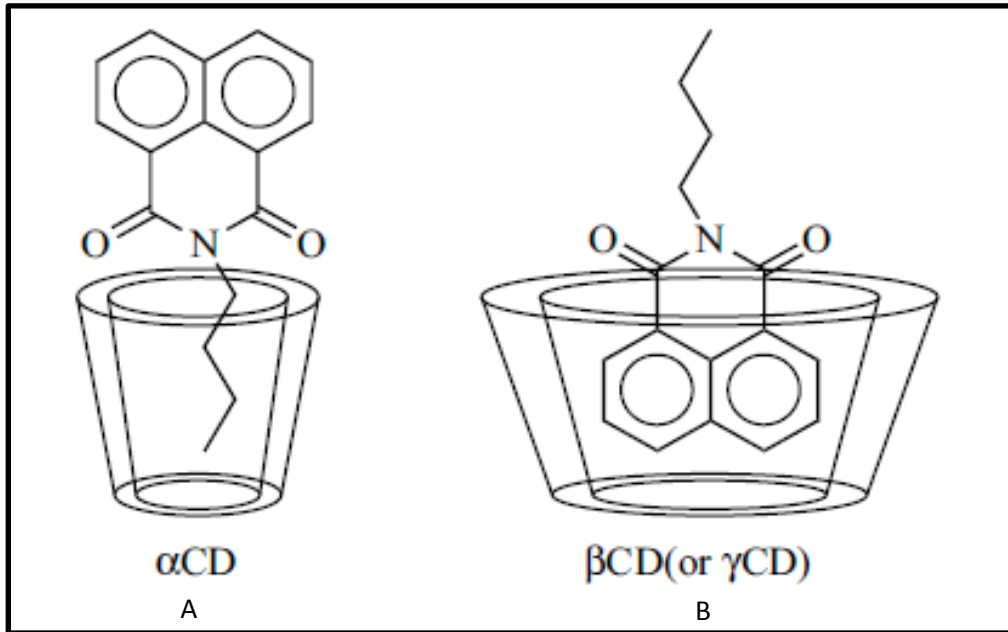
Kompleks oluşumu siklodekstrin ile konuk molekül arasında kovalan olmayan etkileşimlerle gerçekleşmektedir. Bu durum, devamlı olarak konuk molekülün kompleksin içerisine dahil olduğu ve kompleksten ayrıldığı dinamik bir süreçtir. En muhtemel bağlanma şekli, konuk molekülün daha az polar bölümünün siklodekstrin kavitesinin içerisine girmesi, daha polar ve çoğunlukla yüklü olan grubun ise kavitenin daha geniş olan kısmının hemen dışındaki çözücüye doğru yönelmesidir. Hangi tip kompleks oluşacağı;

- Siklodekstrin internal kavitesine
- Konuk molekülün büyüklüğüne
- Konuk molekülün lipofilikliğine

göre değişmektedir (49). İlaç ile siklodekstrin arasında inklüzyon kompleksi oluşurken apolar molekül veya molekülün bir kısmı arasında kovalan olmayan etkileşimler gerçekleşmektedir (48). Siklodekstrin veya konuk molekülün büyüklüğüne göre, 1 konuk molekül 1 veya 2 siklodekstrin molekülü ile etkileşime girebilirken (1:1 veya 1:2 kompleksler), 1 veya 2 konuk molekül 1 siklodekstrin molekülü (1:1 veya 2:1 kompleksler) ile etkileşime girebilir (28). Siklodekstrin internal kavite büyüklüğünün inklüzyon kompleksi yapısına etkisi Şekil 2.10 ve 2.11’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Siklodekstrin internal kavite büyüklüğünün inklüzyon kompleksi yapısına etkisi A) 1:1 inklüzyon kompleksi B) 1:2 inklüzyon kompleksi (28).



Şekil 2.11. Siklodekstrin internal kavite büyüklüğünün inklüzyon kompleksi yapısına etkisi A) Kısmi kompleksleşme B) Tam kompleksleşme (28,50).

Kompleksleşme süreci içerisinde, stabilite veya asosiyasyon katsayısının (K) belirlenmesi son derece önem arz etmektedir (31). Stabilite katsayısı ilaçların hangi siklodekstrin veya siklodekstrin türevine afinitesinin daha yüksek olduğunun saptanmasında önemlidir (51). Formül 2.1 ve 2.2’de stabilite katsayısının formülü verilmiştir.



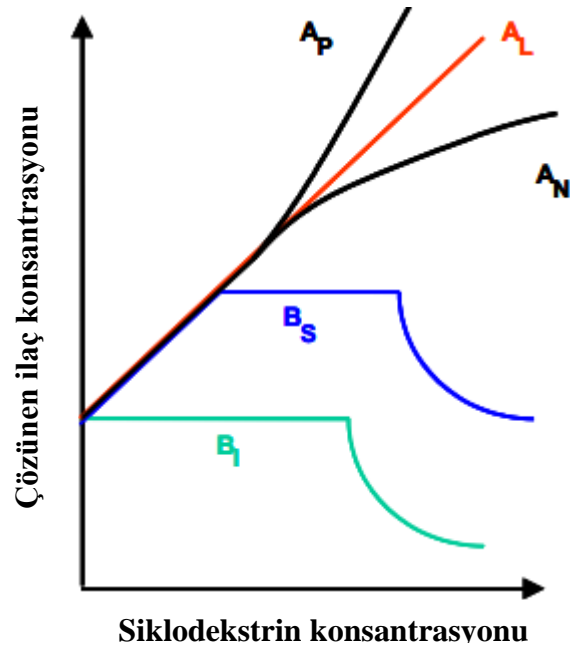
$$K = \frac{[\dot{I} - CD]}{[\dot{I}][CD]} \quad (2.2)$$

[CD]: Siklodekstrin konsantrasyonu

[\dot{I}]: İlaç konsantrasyonu

K: Asosiyasyon (stabilite) katsayısı

İnklüzyon kompleksleri oluşturulurken, komplekslerin oluşumunu matematiksel modellerle açıklayan Higuchi ve Connors’un tanımladığı faz çözünürlük çalışmalarından hem ilaç:CD oranı tespit edilebilmekte, hem de komplekslerin asosiyasyon katsayıları (K) hesaplanabilmektedir. Faz çözünürlük çalışmaları siklodekstrinler gibi çözünürlük artışı sağlayan moleküllerin etkisinin tayin edildiği bir karakterizasyon yöntemidir. Faz çözünürlük diyagramları A ve B tipi olarak iki kategoride incelenebilir. A tipi eğriler suda çözünen inklüzyon komplekslerini gösterirler ve çözünürlükteki artış siklodekstrin konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Bu tarz komplekslerde siklodekstrin konsantrasyonu arttıkça ilacın çözünürlüğü artmaktadır. B tipi eğriler ise suda zayıf çözünürlüğü olan kompleksleri tanımlar. B_S tipi eğriler suda sınırlı çözünürlüğü; B_I tipi eğriler ise suda çözünmeyen kompleksleri gösterir. A tipi kompleksler A_L (siklodekstrin konsantrasyonuna bağlı olarak çözünürlüğün doğrusal artması), A_P (pozitif sapma) ve A_N (negatif sapma) olarak alt birimlere ayrılır. Genel olarak suda çözünebilen siklodekstrin türevleri A tipi faz çözünürlük diyagramı gösterirken, daha az çözünür olan doğal siklodekstrinler B tipi faz çözünürlük diyagramı gösterirler (31). Teorik faz çözünürlük diyagramları Şekil 2.12’de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Teorik faz çözünürlük diyagramları

A tipi faz çözünürlük diyagramı gösteren komplekslerde asosiyasyon (stabilite) katsayısı çeşitli yöntemlerle hesaplanabilir. En sık rastlanan ilaç:CD kompleksleri 1 ilaç molekülünün 1 siklodekstrin molekülü ile kompleks oluşturduğu 1:1 ilaç:CD kompleksleridir. 1:1 ilaç:CD komplekslerinde asosiyasyon(stabilite) katsayısının ($K_{1:1}$) formülü, formül 2.3’de verilmiştir. $K_{1:1}$ değerleri 0 – 100.000 M^{-1} arasında değişmektedir (52).

$$K_{1:1} = \frac{Eğim}{S_o (1 - Eğim)} \quad (2.3)$$

S_o = İlacın gerçek (intrinsik) çözünürlüğü

Eğim = Faz çözünürlük diyagramının eğimi

Çeşitli sebeplerden dolayı, bir farmasötik preparat içerisinde mümkün olan en düşük miktarda siklodekstrin kullanılması önemlidir. Siklodekstrinlerin çözünürlüştürücü etkilerini araştırmanın en güvenilir yollarından biri de kompleksleşmiş/serbest CD oranlarını referans alarak kompleks etkinliğinin hesaplanmasıdır. Kompleks etkinliğinin hesaplanmasında formül 2.4 kullanılmaktadır (51) . Kompleksleşme etkinliğini artırma yöntemleri Tablo 2.6’da verilmiştir.

$$KE = So K1: 1 = \frac{[I/CD]}{[CD]} = \frac{Eğim}{1 - Eğim} \quad (2.4)$$

KE= Kompleks etkinliği

So= İlacın gerçek (intrinsik) çözünürlüğü

I/CD= Kompleks halindeki CD konsantrasyonu

CD= Serbest haldeki CD konsantrasyonu

Eğim= Faz çözünürlük diyagramının eğimi

Tablo 2.6. Kompleksleşme etkinliğini artırma yöntemleri (45).

Etki	Sonuç
İlaç iyonizasyonu	İlaçlar, noniyonize halde iyonize hallerine göre daha dayanıklı kompleksler oluşturmaktadır.
Tuz formu	İlaçların görünen çözünürlüğü tuz formlarının oluşturulmasıyla artmaktadır.
Kompleks içinde kompleks	Bir ilacın çözünürlüğü bazı durumlarda metal kompleksi oluşumuyla artırılabilir.
Asit/baz üçlü kompleksleri	Bazı hidroksi asitler (örneğin sitrik asit) ve bazı organik bazların, ilaç/siklodekstrin/asit veya baz üçlü kompleksleri ile kompleks etkinliğini artırdıkları gösterilmiştir.
Polimer kompleksleri	Suda çözünebilen polimerler, ilaç:siklodekstrin kompleksleri ile üçlü kompleks oluşturarak kompleks etkinliğini artırmaktadır.
Siklodekstrin agregatlarının çözünürlüklerinin artırılması	Organik katyon ve anyonların, suda düşük çözünürlük gösteren yüksüz ilaç:siklodekstrin komplekslerini çözünürlüklerini artırdıkları bilinmektedir.
İki veya daha fazla yöntemin kombinasyonu	Yukarıda bahsedilen iki veya daha fazla yöntemin kombinasyonu ile de kompleks etkinliği artırılabilir.

2.3.3. Komplekslerin Hazırlanma Yöntemleri

Siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşturmanın birçok yöntemi vardır. En çok kullanılan yöntemler sırasıyla aşağıdaki gibidir (33);

- Öğütme (*Physical blending /Grinding*)
- Yoğurma (*Kneading*)
- Birlikte Çöktürme (*Co-precipitation*)
- Nötralizasyon
- Püskürterek kurutma (*Spray drying*)
- Birlikte Dondurarak kurutma (*Co-lyophilization*)
- Eritme (*Melting*)

Öğütme: Hesaplanan molar oranda ilaç ve CD öğütülerek, uygun bir karıştırıcıda karıştırılır. Bu amaçla bilyalı karıştırıcılar kullanılabilir. Elde edilen karışım elenir. Sulu ortam gerekmediğinden hidrolize yatkın ilaçlar için uygun bir yöntemdir (33,53).

Yoğurma: Belirlenen molar oranlarda CD ve ilaç karıştırılarak, minimum miktarda su ilavesi ile pat kıvamına gelene kadar, 30-45 dakika karıştırılmasını takiben vakumlu etüvde kurutularak kompleksler hazırlanır.

Birlikte Çöktürme: Siklodekstrinin sulu çözeltisi hazırlanır ve karıştırma sırasında ilaç çözeltisi eklenir. Bu yöntemde çöktürücü olarak metanol gibi organik çözücüler kullanılır. Sulu siklodekstrin çözeltisi, karıştırılırken organik çözücüde çözülmüş ilaç çözeltisinin yavaş yavaş eklenmesi ile, oluşan kompleksin çöktüğü gözlenir. Çökelti santrifüjlenerek veya filtre edilerek elde edilir. Toplanan kompleks kurutulur (54,55).

Nötralizasyon: İlaç ve siklodekstrin çözüldüğü asidik veya bazik çözelti içerisinde ayrı ayrı çözündürülür, karıştırılır. Manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırdıktan sonra pH ölçümü yapılır. Daha sonra çözelti nötralize edilir. Bu yöntem asidik veya bazik ortamlarda, kimyasal olarak dayanıksız olan bileşikler için uygun değildir (33).

Püskürterek ve Dondurarak Kurutma: İlaç ve siklodekstrinin uygun çözücülerde çözeltileri hazırlanır ve karıştırılır. 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra püskürterek veya dondurarak kurutulur yani liyofilize edilir (56).

2.3.4. Komplekslerin Karakterizasyon Yöntemleri

İnklüzyon komplekslerinin oluşup oluşmadığının tespit edilmesinde;

- Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)
- Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR)
- Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (NMR)
- X-ışını difraksiyonu (X-RD)
- Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)
- Ultraviyole Spektroskopisi (UV)
- Termogravimetri

gibi yöntemler kullanılmakta ve karakterizasyon için birden fazla yöntem bir arada kullanılarak her yöntem bir diğerinin sağlamasını yapmaktadır.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Molekülün erime pikinde gözlenen kayıp, kompleks oluşumunun göstergesidir. Maddenin erime pikinin gözlenmemesi, ortamdaki maddenin siklodekstrin ile kompleks oluşturması ve ortamda serbest kristalize halde ilaç bulunmaması ile açıklanabilir. Bu teknik, erime noktası siklodekstrinlerin bozunma sıcaklığından düşük olan moleküllerle sınırlıdır (57). Kalitatif sonuç verir.

Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR)

Siklodekstrin ile ilaç arasındaki etkileşim hakkında fikir verir. Konuk molekülün karakteristik gruplara (karbonil, sülfonil vb) sahip olması gerekmektedir. Konuk molekülün spektral özelliklerindeki değişimden yola çıkılarak komplekslerin oluşup oluşmadığı ile ilgili yorum yapılabilir. Konuk moleküle spesifik bantların

kaybolması veya küçülmesi, ortamda bulunan serbest moleküllerin siklodekstrin molekülleri ile kompleks oluşturduğunu gösterir (58).

Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (H^1 -NMR)

Bu teknik kalitatif ve kantitatif analiz yanında, konuk molekülün hangi bölümünden kompleks oluşturduğu hakkında bilgi vermektedir. Kompleks oluşumu sonucu, yeni bir çevrede bulunan siklodekstrin kavitesinde iç yüzeyde bulunan H-3 ve H-5 protonlarının sinyallerinde kayma gözlenmektedir. Siklodekstrin dış yüzeyinde bulunan hidrojenler ise genellikle (H-2, H-4, H-6) kompleksleşmeden etkilenmezler. Siklodekstrin spektrumu dışında, konuk molekülün NMR spektrumunda da kayma gözlenebilmektedir (58).

X-ışını difraksiyonu (X-RD)

Bu yöntem maddenin kristal özelliğindeki değişimin incelenmesine dayanır. Konuk molekülün katı olduğu durumda, kompleks ile konuk molekül ve siklodekstrinin mekanik karışımının difraktogramları karşılaştırılarak kompleks oluşup oluşmadığına karar verilir (58).

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Elektron mikroskobu altında; konuk molekül, siklodekstrin molekülü ve oluşturulan komplekslerin kristal yapılarındaki değişim incelenerek inklüzyon komplekslerinin oluşup oluşmadığı hakkında diğer yöntemleri destekleyici nitelikte makroskopik gözlem ve yorum yapılabilir (58).

Ultraviyole Spektroskopisi (UV)

Kompleks oluşumu, konuk molekülün spektrumunda değişikliğe neden olmaktadır. Konuk molekülün spektrumundaki kaymalar inklüzyon kompleksi oluşumu ile yorumlanabilmektedir. Bunun için, konuk molekülün tek başına ve kompleks halinde UV spektrumları alınıp karşılaştırılarak yorumlanır (58).

Termogravimetri (TGA)

Isıtma işlemi sonrası kurutulmuş örnek ağırlığının ölçüldüğü kantitatif bir yöntemdir. Konuk molekülün kaynama noktası ve buharlaşan miktarı ölçülebilmektedir. Bu yöntemin sakıncası, sadece kaynama noktası siklodekstrin dekompozisyon sıcaklığından düşük olan uçucu bileşikler için sınırlı olmasıdır (59).

2.3.5. Siklodekstrinlerin İlaçların Çözünürlüğü Üzerine Etkileri

Bir dozaj formunun sahip olması gereken en önemli özelliği, içerdiği etkin maddeyi etki bölgesine terapötik etki sağlayacak miktarda ulaştırabilmesidir. Bir ilaç damar yolu dışında yollarla uygulanıyor ve sistemik etki gösteriyorsa, etkisi direkt olarak kana geçen miktarıyla ilişkilidir. Plazma konsantrasyonu ilacın farmakolojik etkilerini direkt olarak belirlediği için, ilacın absorpsiyon hızı ve oranı da burada önem kazanmaktadır. Bu nedenlerle, bir ilaç ürününün biyoyararlanımı kana geçen etkin madde miktarı ve geçiş hızıyla ilgilidir.

Bir ilaç etkin maddesinin biyoyararlanımının düşük olmasının nedenleri aşağıdaki gibi sıralanabilir,

- Çözünen ilacın fizyolojik pH'da stabilitesinin düşük olması
- Düşük partiyon katsayısı nedeniyle biyolojik membranlardan geçişinin zayıf olması
- Presistemik metabolizasyon
- Düşük çözünürlüğün absorpsiyonda hız kısıtlayıcı basamak olması

Bu biyoyararlanım problemlerin üstesinden gelebilmek için üç yaklaşım söz konusudur. Bunlar;

- Farmasötik Yaklaşım: Formülasyon, üretim prosesindeki değişikliklerle veya ilaç etkin maddesinin kimyasal yapısını değiştirmeden fizikokimyasal özelliklerinin düzenlenmesiyle biyoyararlanım sorunu giderilebilir.

- Farmakokinetik yaklaşım: İlacın kimyasal yapısı değiştirilerek farmakokinetik özelliklerinin düzenlenmesiyle biyoyararlanım problemi aşılır.
- Biyolojik Yaklaşım: İlaç uygulama yolu değiştirilebilir.(Örneğin oral yol yerine parenteral yol tercih edilebilir)

İkinci yaklaşım olan farmakokinetik yaklaşım pahalı, zaman isteyen bir süreçtir. Bu nedenle ilacın çözünürlüğünün artırılması ile ilgili olarak farmasötik yaklaşım daha fazla ilgi çekmektedir (60).

Çözünürlüğü artırmak için; partikül büyüklüğünü küçültme, sürfaktan kullanılması, ilacın solvat veya hidrat formunun kullanılması, katı dispersiyon oluşturulması vb yöntemler kullanılmaktadır (61).

Siklodekstrinler ile ilacın hidrofobik özellikleri gizlenerek, suda çözünür inklüzyon kompleksleri oluşturulabilmektedir (31). Kompleks halde ilaç kristalliğinin azalması, ilacın çözünürlüğünün artmasını sağlamaktadır. Tablo 2.7'de siklodekstrinler ile çözünürlük artan ilaçlara örnekler verilmiştir.

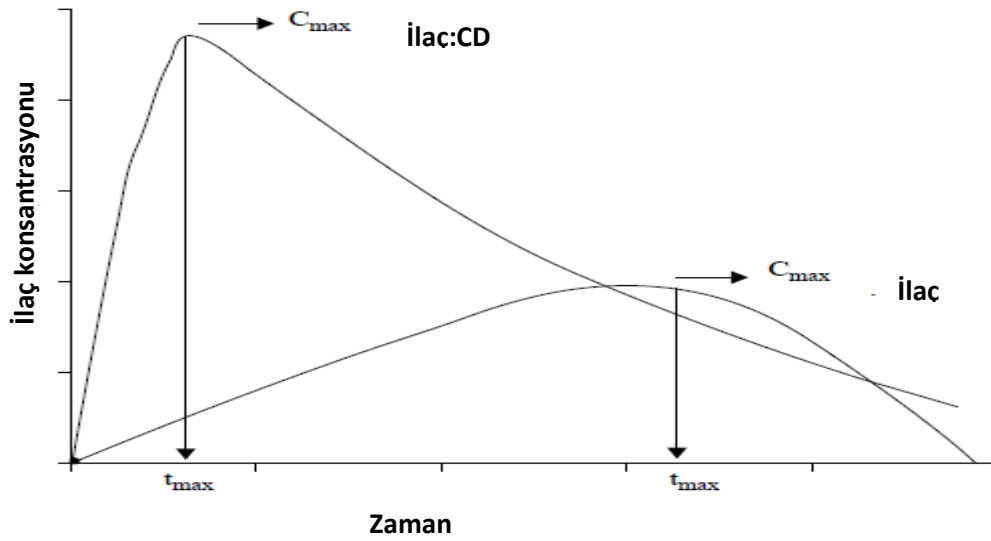
Tablo 2.7. Siklodekstrinler ile çözünürlüğü artan ilaçlara örnekler.

Siklodekstrin	İlaç	Referans
α -CD	Praziquantel	(62)
β -CD	Nimesulid, Sulfometiyazol, Lorazepam, Ketoprofen, Griseofulvin, Praziquantel, Klortalidon, Etodolak, Piroksikam, Itrakonazol, Ibuprofen	(45,62-64)
γ -CD	Praziquantel, Omeprazol, Digoksin	(62,65,66)
HP β -CD	Albendazol, Levemopamil HCl, Sulfometiyazol, Ketoprofen, Griseofulvin, Itraconazol, Karbamazepin, Zolpidem, Fenitoin	(45,67)
M β -CD	Naproksen, Kamptotesin, Takrolimus	(45,68)

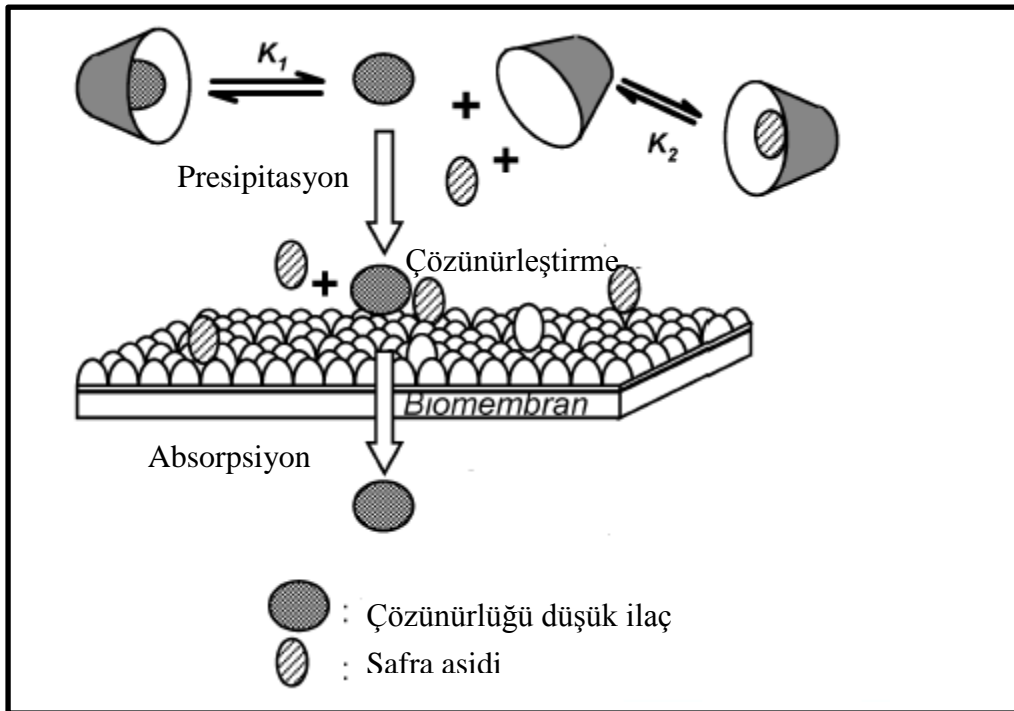
2.3.6. Siklodekstrinlerin İlaç Biyoyararlanımı Üzerine Etkileri

Siklodekstrinler, çözünürlüğü düşük ilaçların biyoyararlanımını, çözünürlüğünü, çözünme hızını ve/veya ilaç permeabilitesini artırarak iyileştirirler (69). Bunu, ilacın biyolojik bariyerde (deri, mukoza, göz korneası gibi) konsantre halde bulunmasını sağlayarak gerçekleştirmektedirler. Bazı durumlarda, ilacın sulu ortamda çözünmesini sağlamak amacıyla yeterli miktarda siklodekstrin kullanımı önem kazanmaktadır. Siklodekstrinin aşırı miktarda kullanılması ise, ilaç biyoyararlanımını azaltmaktadır (70). Şekil 2.13'te CD kompleksleşmesiyle ilaç biyoyararlanımındaki iyileşme şematize edilmiştir. Siklodekstrinlerin ilaçların biyoyararlanımlarını artırma mekanizmaları aşağıdaki şekilde sıralanabilir (71);

- Hidrofilik siklodekstrinlerin, çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlük ve ıslanabilirliğini artırmaları
- Kimyasal olarak dayanıklı olmayan ilaçların degradasyonunu önlemeleri
- Membran akış özelliklerini değiştirerek, bariyer fonksiyonunu azaltmaları, bu sayede peptid ve protein ilaçlar da dahil olmak üzere ilaçların absorpsiyonunu artırmaları
- Üçüncül bileşenlerle (safra asidi, kolesterol, lipidler vb) yarışmalı inklüzyon kompleksi oluşturma eğilimi, bu sayede kompleks halindeki ilacın salıverilmesi. Şekil 2.14'te yarışmalı kompleks oluşumu sonucu İlaç:CD kompleksinden ilaç salımının ve absorpsiyonunun artmasının şematik gösterilmiştir.
- İlacın intestinal epitelden p-gp aracılı inhibisyonunun önlenmesi.



Şekil 2.13. İlaç:CD kompleksleşmesinin biyoyararlanım üzerine etkisi (72).



Şekil 2.14. Gastrointestinal kanalda safra asidi ile yarışmalı kompleks oluşumu sonucu İlaç:CD kompleksinden ilaç salımının ve absorpsiyonunun artmasının şematik gösterimi K_1 = İlaç:CD kompleksi stabilite katsayısı K_2 =Safra asidi:CD kompleksi stabilite katsayısı

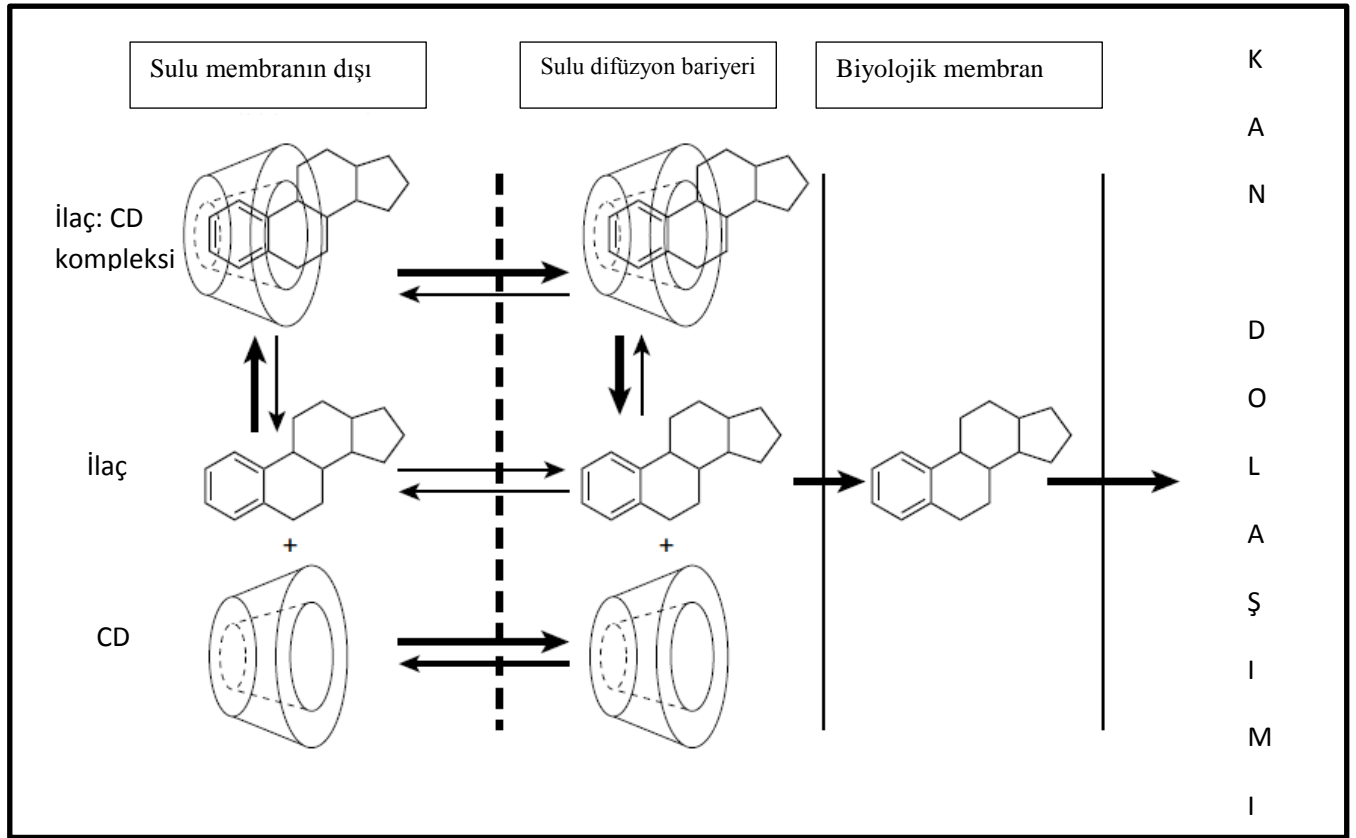
2.3.7. Siklodekstrinlerin İntestinal Permeabilite Üzerine Etkileri

Gastrointestinal sistemden ilaçların absorpsiyonu kompleks bir süreçtir ve birçok faktörden etkilenir. Bunlar sırasıyla;

- Fizikokimyasal faktörler (Molekül Büyüklüğü, İlacın pKa değeri, İyonizasyon derecesi ve Yağ/Su partiyon katsayısı, İyon tuzağı, Tuz ve ester şekli, Partikül büyüklüğü, Kristal şekli, Polimorfizm ve Solvatlar)
- Fizyolojik faktörler (Doku Perfüzyonu, Gastrik Motilite ve Gastrik Boşalma, Bireysel Farklılıklar, Besinlerin Etkisi, Taşıyıcı Proteinler)
- Dozaj formuna ilişkin faktörler (Dozaj Şeklinin Tipi, Formülasyon Bileşenlerinin Etkisi, Üretim Faktörleri, İlacı Depolama ve Paketlemenin Etkisi)

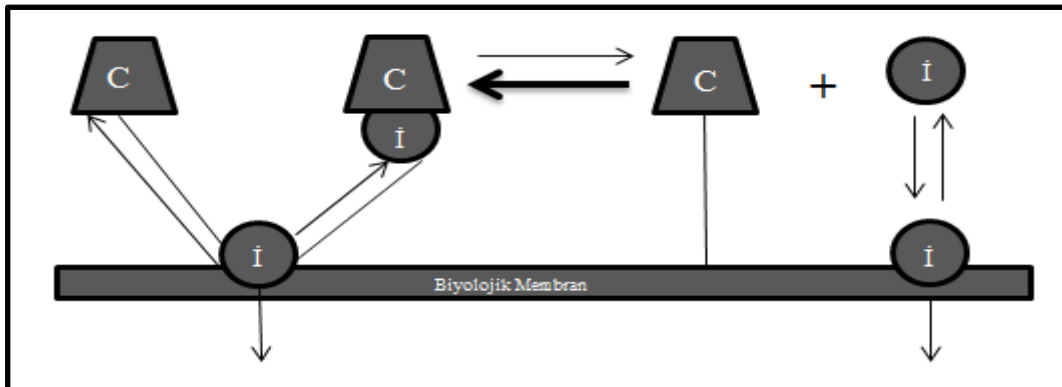
İntestinal permeabilite, bir ilacın oral absorpsiyonu için anahtar parametredir (73). Siklodekstrinlerin, kimyasal yapıları, molekül ağırlıkları (> 970 Da) ve düşük partiyon katsayıları nedeniyle biyolojik membranlardan geçişleri oldukça sınırlıdır. Sadece serbest haldeki ilaç molekülü lipofilik bariyerleri geçebilmektedir. Siklodekstrinler genel olarak, lipofilik biyolojik membranlardan, hidrofilik ilaçların permeabilitesinde artışa neden olmamaktadır (74).

Siklodekstrinler, ilacın permeabilitesini, biyomembran yüzeyinde ilacın dayanıklı halde bulunmasını sağlayarak da artırır. Nazal uygulamadan sonra, insülinin permeabilitesindeki artışın nedeni buna dayanmaktadır (75). Siklodekstrinler, ilacın biyolojik membranlardan geçişini artırabildiği gibi azaltabilmektedir. Çok fazla ya da çok az siklodekstrin kullanılması, permeabilitenin ve dolayısıyla biyoyararlanımın azalmasına neden olacaktır (76). Biyolojik membrandan ilaç permeasyonu Şekil 2.15'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Biyolojik membrandan ilaç permeasyonu şematik gösterimi (77).

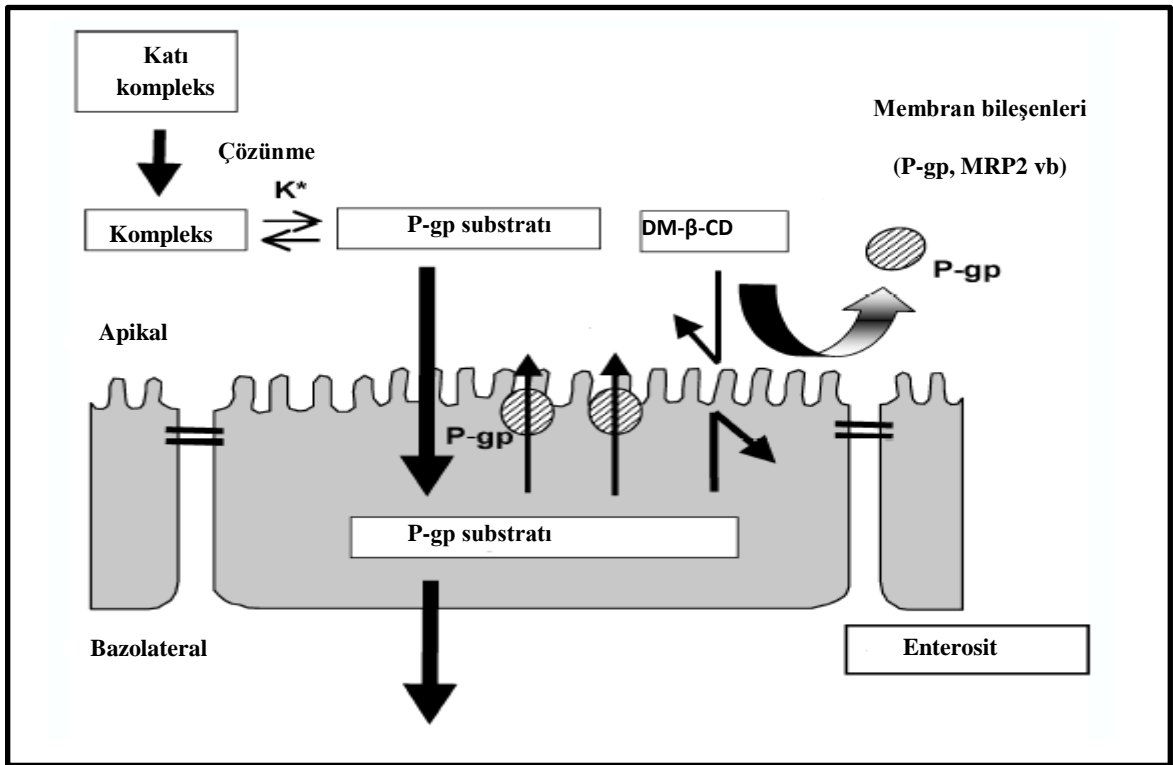
Biyolojik membranların dış kısmını sulu bir tabaka çevrelemektedir. Difüzyon bariyerine kadar siklodekstrinler hidrofobik ilacın sulu ortam içerisinde kalmasını sağlarlar ve sonrasında hidrofobik ilaç siklodekstrin kavitesinden ayrılarak biyolojik membranları aşabilir. Permeabilitesi düşük olan ilaçların biyolojik membran yüzeyine yoğun konsantrasyonda bulunmasını sağlayarak permeabiliteleri artırılmaktadır (77). Siklodekstrinler ile permeasyon artışının şematik gösterimi Şekil 2.16'da verilmiştir.



Şekil 2.16. Siklodekstrinler ile permeasyon artışının şematik gösterimi C:

Siklodekstrin, İ:İlaç molekülü (78).

P-glikoprotein (P-gp), çoklu ilaç pompa sistemi, ve Sitokrom P450 (CYP) 3A, insandaki en önemli Faz 1 ilaç metabolize edici enzim, intestinal kanalda bulunan enterositlerde (ilaçlar için primer absorpsiyon bölgesi) yüksek düzeyde bulunmaktadır (79). Takrolimus (P-gp substratı ilaç) ile Caco-2 hücreler kullanılarak yapılan bir transport çalışmasında, DM- β -CD'in ilacın biyolojik membrandan dışarı atılımını azalttığı gösterilmiştir (80,81). Siklodekstrinlerin P-gp inhibisyonu mekanizması Şekil 2.17'de gösterilmiştir. Tablo 2.8'de ise siklodekstrinlerin ilaç biyoyararlanımı ve biyolojik membranalardan penetrasyonu üzerindeki etkileri özetlenmiştir.



Şekil 2.17. Siklodekstrinlerin P-gp inhibisyonu şematik gösterimi.

Tablo 2.8. Siklodekstrinlerin ilaç biyoyararlanımı ve biyolojik membranlardan penetrasyonu üzerindeki etkileri.

Durum	Referans
Siklodekstrinler sadece sulu ortamda biyoyararlanım ve permeabilite üzerine artırıcı etkiye sahiptir	(82)
Hidrofilik siklodekstrinler su/yağ tipi kremlerden ilaç salımını azaltırken, yağ/su tipi kremlerden ilaç salımını artırır	(76)
Siklodekstrinlerin biyolojik bariyerlerden absorpsiyonu hemen hemen hiç yoktur	(37,83)
Siklodekstrinler, hidrofilik ilaçların biyolojik membranlardan geçişini artıramazlar	(69,76)
Siklodekstrinler, ilacın stabilitesini artırarak biyoyararlanımını artırabilirler	(75)
Hidrofilik siklodekstrinler oral olarak verildiklerinde toksik olmadıkları düşünülmektedir	(37)
Siklodekstrinler ve diğer penetrasyon artırıcılar, ilaçların biyolojik membranlara dağılmasında sinerjistik veya aditif etki göstermektedir	(84)
Çeşitli biyomembranlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, farklı deney koşulları altında, lipofilik ilacın çözünürleştirilmesi için gerekli siklodekstrin miktarından fazla siklodekstrin kullanıldığında, ilacın membrandan permeasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Permeasyondaki maksimum artış gerekli siklodekstrin miktarı kullanıldığında gözlenmiştir	(76,85)
Oral ilaç taşıyıcı olarak siklodekstrinlerle en fazla biyoyararlanım artışı Sınıf II (yüksek permeabilite, düşük çözünürlük) ilaçlarda gözlenmiştir	(86)

2.3.8. Siklodekstrinlerin İlaç Güvenilirliği Üzerine Etkisi

Siklodekstrinler, ilaçların neden olduğu irritasyonu önlemek amacıyla da kullanılabilirler (87). İlacın, siklodekstrinlerle kompleksleşerek çözünürlüğünün artırılması ile, ilaçlar daha düşük dozda kullanılabilir ve yüksek

dozda görülen yan etkiler elimine edilebilmektedir. Gansiklovir ile yapılan bir çalışmada, β -CD'in ilacın etkinliğini artırırken yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir (88). Siklodekstrinlerle kompleks haline getirilen ilaçların, biyolojik membranlar ile direkt teması engellenerek, terapötik etkilerini kaybetmeden yan etkileri ve lokal irritasyonları önlenmiş olur (82).

2.3.9. Siklodekstrinlerin İlaç Stabilitesi Üzerine Etkileri

Siklodekstrinler, dehidrasyon, hidroliz, oksidasyon gibi durumlara karşı ilaçların stabilitesini iyileştirir ve böylece yarılanma ömrünü artırır. SBE- β -CD'in birçok ilacın stabilitesinde, diğer siklodekstrinlere göre daha fazla artış sağladığı gösterilmiştir (89). Siklodekstrinlerin trimeprazin ve prometazinin fotostabilitelerini iyileştirdikleri de kayıtlara geçmiştir (90,91). Siklodekstrinler ayrıca ilaçların yarılanma ömürlerini ve katı hal stabilitelerini de iyileştirmektedir (92). Siklodekstrinlerle kompleksleşen ilaçlarının, serbest haldeki ilaca göre hidrolizleri daha yavaştır (93,94). Tablo 2.9'da siklodekstrinlerin ilaç stabilitesine etkileri verilmiştir.

Tablo 2.9. Siklodekstrinlerin ilaç stabilitesi üzerine etkileri.

İlaç	Siklodekstrin	Etki	Referans
Prometazin	HP- β -CD, M- β -CD	Fotostabilite	(91)
Glibenklamid	β -CD	Yarılanma ömrü	(95)
Diklofenak sodyum	β -CD	Katı halde termal stabilite	(96)
Doksorubisin	HP- β -CD, HP- γ -CD	Asit hidrolize ve fotodekompozisyona karşı stabilite	(93)
Digoksin	γ -CD	Hidrolize karşı stabilite	(97)
Paklitaksel	γ -CD, HP- γ -CD, HP- β -CD	Hidrolize karşı stabilite	
Flutamit	β -CD	Fotoreaktivite	(98)

2.3.10. Siklodekstrinlerin İlaç Taşınmasında Kullanılmaları

Siklodekstrinlerin çok fonksiyonlu karakteristik özellikleri (kontrollü salım, hedeflendirme, absorpsiyon artırma kabiliyetleri gibi); oral, rektal, sublingual, oküler, nazal, pulmoner, dermal ve diğer yeni ilaç taşıyıcı sistemlerle (lipozom, mikroküre, ozmotik pompalar, peptid ve protein taşınması, nanopartiküler sistemler gibi) kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (99). İlaç taşıyıcı sistemin birincil amacı etkili konsantrasyonda ilacı, etki bölgesine gerekli zamanda ulaştırmaktır (82). Güvenilirlik açısından, biyouyumluluk, ilaç taşıyıcı sistem için en önemli parametrelerden biridir. Siklodekstrinler; biyouyumlu, gastrointestinal kanaldan absorpsiyonları yok denecek kadar az olan, biyolojik membranlardaki komponentlerle (kolesterol gibi) etkileşime geçerek membran akış özelliklerini değiştirebilen, konuk molekülün fizikokimyasal özelliklerini ve biyolojik membranlardan geçişini artırabilen moleküllerdir (71).

Oral İlaç Taşınması

Oral ilaç taşınmasında siklodekstrinler; ilacın çözünürlüğünü artırarak biyoyararlanımını düzeltmeleri, absorpsiyon bölgesinde ilacın stabilitesini artırmaları, ilacın irritasyonunu azaltmaları gibi nedenlerle kullanılmaktadırlar. CD ile kompleksleştirilen ilacın lokal irritasyonunun azaldığı, ayrıca ilacın absorpsiyon yüzeyinde birikmesini sağlayarak mukozal ilaç permeabilitesinin arttığı gösterilmiştir.

Kompleks oluştururken seçilecek siklodekstrinin etkinliği ve güvenliği oldukça önemlidir. HP- β -CD'ler, β -CD ve diğer siklodekstrin türevlerine göre daha iyi oral güvenlik profili göstermektedir. Gastrointestinal kanaldan siklodekstrinlerin absorpsiyonu, kolon dışında çok az olduğundan, tüm siklodekstrin türevlerinin oral yolla uygulandıklarında pratik olarak toksik olmadıkları söylenebilir. Bu nedenle siklodekstrinlerin güvenlik profilleri ilaç:CD kompleksindeki ilaç ve siklodekstrinin LD₅₀ değerine bağlıdır. β -CD fiyatı en düşük bileşik iken, HP- β -CD ve SBE- β -CD'ler en pahalı olanlardır. Bu nedenlerle β -CD'in oral kullanım için, özellikle maliyet açısından, optimum siklodekstrin olduğu söylenebilir (35,78). Tablo 2.10'da oral ilaç taşınmasında siklodekstrinlerin kullanım amaçlarına örnekler verilmiştir

Tablo 2.10. Oral İlaç Taşınmasında Siklodekstrin Uygulamaları (78).

Etki	CD	İlaç
Çözünürlük ve çözünme hızında artışa bağlı biyoyararlanım artışı	β -CD HP- β -CD SBE7- β -CD DM- β -CD M- β -CD ME- β -CD	Ketoprofen, Griseofulvin, Terfenadin Albendazol, Ketoprofen, Fenitoin, Gliklazid Spiranolakton Takrolimus Albendazol Fenitoin
Terapötik etkinin yoğunluğunda veya süresinde artış	β -CD HP- β -CD	Terfenadin, Tolbutamid Tolbutamid, Amilobarbiton
Permeabilite artışı	HP- β -CD	Flutamid
Gastrointestinal stabilitede artış	HP- β -CD γ -CD	Rutin Digoksin
Dil altı biyoyararlanımda artış	HP- β -CD	Klomipramin, Testosteron
Bukkal biyoyararlanımda artış	HP- β -CD SBE7- β -CD	Danazol Danazol

Nazal İlaç Taşınması

Nazal uygulama karaciğerdeki ilk geçiş etkisinin elimine edildiği bir yoldur (100). Sistemik dolaşıma girebilmesi için ilacın nazal sıvıda çözünmesi gerekmektedir. Nazal formülasyonlarda siklodekstrinler, lipofilik ilaçların çözünürlüğünü artırmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Lipofilik siklodekstrinler, özellikle peptidlerin nazal taşınmasında permeasyon artırıcı olarak kullanılırlar. Doğal ve hidrofilik siklodekstrin çözeltilerinin geniş bir konsantrasyon aralığında direkt olarak bir mukoza (nazal, bukkal gibi) üzerine uygulanmasında herhangi bir sakınca olmamakla birlikte, metillenmiş siklodekstrinlerin uygulama süresi ve dozu

kontrol altında tutulmalıdır. Sıçanlarda, siklodekstrin kullanılarak insülin absorpsiyonunun belirgin bir derecede arttığı gözlenmiştir (101). Bu çalışma kapsamında α -CD, β -CD, γ -CD ve M- β -CD kullanılmıştır. Absorpsiyon artışı en fazla metillenmiş siklodekstrin türevi ile sağlanmış olsa da, metillenmiş siklodekstrinler ile toksisitenin de arttığı kayıtlara geçmiştir. İbuprofenle yapılan bir çalışmada ise, serbest halde oral mukoza, boğaz ve farinkse iritan etki gösteren ibuprofenin, doğal ve hidrofilik siklodekstrinler ile kompleksi oluşturulduğunda bu iritan etki ortadan kalkmıştır (102). Sonuç olarak, siklodekstrinler nazal bariyerin aşılmasını sağlamakta ve ilacın biyoyararlanımını artırmaktadırlar (35,103).

Pulmoner İlaç Taşınması

İlaçların pulmoner olarak uygulanması, genellikle hastalıkların lokal olarak tedavi edilmesini hedeflemektedir. Gastrointestinal kanalda ilacın degradasyonundan ve karaciğerdeki ilk geçiş etkisinden, pulmoner ilaç taşınması ile kaçınılabılır. Akciğerlerin yüzey alanının yüksek olması, enzimatik aktivitenin düşük olması ve kanlanmanın yüksek olması nedeniyle ilaç absorpsiyonunun yüksek olması beklenmektedir (45). Bu uygulamada ilaçların çözünürlüğünün düşük olması önemli bir sorun teşkil etmektedir. Çözünmeyen partiküller, üst hava yollarında mukosilier klirens ile veya alveollerdeki makrofajlar tarafından uzaklaştırılmaktadır (104). Siklodekstrinler ile, suda çözünmeyen ve kimyasal olarak dayanıklı olmayan ilaçların suda çözünürlüğü, çözümleri ve stabiliteleri iyileştirilerek akciğerden absorpsiyonları artırılabilir (45).

Oküler İlaç Taşınması

Göz damlalarındaki en önemli sorun, ilacın gözde yüksek lokal konsantrasyonunun sağlanamamasıdır. İlacın jel ile veya polimer matriks içerisinde uygulanmasıyla bu sorun aşılsa da, hasta uyuncu açısından bu yöntemler etkili olamamıştır (82).

Sulu göz çözeltilerinde CD'ler ilaçların çözünürlüğü ve kimyasal stabilizasyonu, oküler ilaç iritasyonunun azaltılması ve oküler ilaç permeabilitesinin artırılması amacıyla kullanılmaktadırlar.

Oftalmik preparatlarda kullanılan taşıyıcılar oküler yüzeye irritan olmamalı ve böylece refleks olarak oluşan gözyaşı ile ilacın göz yüzeyinden uzaklaşmasını önlemelidir. Hidrofilik siklodekstrinlerden, özellikle 2HP- β -CD ve SBE- β -CD'lerin göze toksik olmadıkları gösterilmiştir. İnsan kornea hücrelerine CD'lerin toksisiteleri α -CD > DM- β -CD > SBE- β -CD = HP- β -CD > γ -CD olarak bulunmuştur (69,105). β -CD'ler ise sudaki düşük çözünürlükleri nedeniyle oküler uygulamaya uygun değildir (37).

Siklodekstrinler, ilacın oküler yüzeye temas süresini artırarak ilacın permeabilitesini artırmaktadır. Dekametazon asetatla yapılan bir çalışmada, HP- β -CD'in ilacın permeabilitesini artırdığı ve permeabilitesi daha düşük olan deksametazon formuna dönüşmesini önlediği gösterilmiştir (78). Siklodekstrinlerin epiteldeki lipofilik membran bileşenleri ile etkileşerek membran lipofilitesini azaltabilme kapasitesi, lipofilik pilokarpin ön ilacının CD'lerle biyoyararlanımının azalması ile gösterilmiştir (106). Tablo 2.11'de oküler ilaç taşınmasında kullanılan siklodekstrinler örneklendirilmiştir.

Tablo 2.11 Oküler İlaç Taşınmasında Siklodekstrin Uygulamaları (49).

İlaç	CD
Asetazolamid	HP- β -CD, α -CD
Arachidonylethanolamide	HP- β -CD
Siklosporin	α -CD
Deksametazon	HP- β -CD
Deksametazon asetat	HP- β -CD
Diklofenak	HP- β -CD, M- β -CD
Pilokarpin	HP- β -CD, α -CD, β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD
Pilokarpin ön ilacı	HP- β -CD

Parenteral İlaç Taşınması

Parenteral ilaç taşınmasında siklodekstrinler; ilaçları çözünürlüştürücü, ilaç irritasyonunu azaltıcı, sulu ortamda dayanıklı olmayan ilaçların stabilitelelerinin

artırılması amacıyla kullanılmaktadırlar. HP- β -CD ve SBE- β -CD gibi siklodekstrin türevleri sudaki çözünürlüklerinin yüksek ve toksisitelerinin düşük olması nedeniyle parenteral kullanım için uygundur. Amerika ve Avrupa'da piyasada, % 40 HP- β -CD içeren itrakonazol parenteral preparatı bulunmaktadır (107). Siklodekstrinler parenteral uygulamada; ilaçların çözünürlüştürülmesi, uygulama bölgesinde ilaçların iritan etkilerinin azaltılması, ilaçların stabilitelerinin artırılması amacıyla kullanılmaktadırlar (78).

Parenteral olarak α , β ve γ -siklodekstrinlerin hidrofilik türevleri kullanılabilir. γ -CD parenteral uygulamaya uygun değildir çünkü sulu çözeltide gözle görülebilen agregatlar oluşturmaktadır (40). β -CD ise düşük çözünürlüğü ve bununla ilişkili yan etkileri (nefrotoksisite gibi) nedeniyle parenteral formülasyonlar için uygun değildir (32,37,41).

Rektal İlaç Taşınması

Rektal sıvı, gastrointestinal sıvı ile kıyaslandığında; daha küçük hacimli ve daha viskoz bir sıvıdır. Rektal ilaç taşınmasında siklodekstrinler, ilacın supozituar sıvağından salımını artırarak veya mukozal permeabilitesini artırarak etki gösterirler. Rektal sıvıların yüksek viskozitesinden dolayı ilacın supozituar sıvağından salımı önemli bir basamaktır. Siklodekstrinlerin rektal ilaç absorpsiyonu üzerindeki etkileri ilacın ve ilaç:CD kompleksinin partiyon katsayısından, supozituar sıvağına bağlı olarak değişebilir. Hidrofilik CD'ler yağlı sıvağıdan salımı artırmak ve/veya rektal sıvıda çözünmeyi artırmak suretiyle lipofilik ilaçların absorpsiyonunu artırır. Doğal siklodekstrinler ile kıyaslandığında, metillenmiş siklodekstrinlerin hidrofobik ilaçların (örneğin; flurbiprofen (108), bifenil asetik asit (109)) yağlı supozituar sıvağından absorpsiyonunu önemli derecede artırdıkları gösterilmiştir (68,110).

Sublingual İlaç Taşınması

Karaciğerdeki ilk geçiş etkisinin elimine edilebilmesi için, sublingual uygulama en etkili yollardan biridir (111). Birçok lipofilik ilacın, siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşturularak sublingual biyoyararlanımlarının arttığı gösterilmiştir. Örneğin HP- β -CD ile 17 β -estradiolün, androstenediolün ve

klomipraminin sublingual biyoyararlanımının arttığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (112-114).

Kontrollü İlaç Salımı

Siklodekstrinler, ilaçlarla kompleks oluşturma yeteneklerinden dolayı veya farmasötik formülasyonlarda taşıyıcı materyal olmaları nedeniyle hedeflenen bölgeye istenen sürede ilacın taşınmasını sağlarlar. Hidrofilik CD türevleri çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünü artırırken, hidrofobik siklodekstrin türevleri suda çözünen ilaçların taşıyıcıdan salınmasını geciktirmektedir. İyonize olabilen siklodekstrin türevleri ise inklüzyon kapasitesini, ilaç çözünme oranını ve ilaç irritasyonunu azalttığı için kullanılır (115). CD'ler ile ilaç salım bölgesinin ve/veya zaman profiline modifikasyonu Tablo 2.12'de örneklendirilmiştir.

Tablo 2.12. CD'ler ile ilaç salım bölgesinin ve/veya zaman profiline modifikasyonu (78,115).

Salım Özelliği	Amaç	CD
Ani salım	Suda çözünürlüğü düşük ilaçların, çözünürlük ve absorpsiyonlarını artırmak	HP- β -CD, DM- β -CD, SBE- β -CD ve Dallanmış- β -CDler
Uzatılmış salım	Suda çözünen ilaçların salımını geciktirmek	Etil- β -CD, Açıl- β -CD
Modifiye salım	Uzatılmış terapötik etki ile daha dengeli oral biyoyararlanım sağlamak	Çeşitli CD'lerin bir arada veya başka eksipyanlarla kullanılması
Geciktirilmiş, pH bağımlı salım (Enterik)	İlaçların asit ortamda korunması	CME- β -CD
Bölgeye özel salım	Kolona hedefleme	İlaç:CD konjugatları

Kolona Spesifik İlaç Taşınması

CD'ler mide ve ince barsakta nadiren hidrolize uğrarlar ve çok az miktarda absorplanırlar. Kolonda ise, kolonik mikrobiyal flora tarafından küçük sakkaritlere fermente edildiklerinden absorbe olabilirler. Siklodekstrinlerin bu özelliklerinden kolona ilaç taşınmasında faydalanılmaktadır (45). Siklodekstrin kompleksleri oral olarak uygulandığında, kolona ulaşana kadar hidrofobik kavitelilerindeki ilacı salacakları için, kolona spesifik ilaç taşınması için uygun değildir. İlaç:CD konjugatları ise, mide ve ince barsak boyunca dayanıklı kalacak ve kolondaki enzimatik degradasyon ile ilaç salımı başlayacaktır (116). Bifenilasetik asit ve siklodekstrin kullanarak oluşturulan amid ve ester tipi konjugatlar, kolona hedeflendirme açısından incelenmiştir (116). Ester tipi konjugat durumunda, ilaç salımı, siklodekstrinlerin halka açılmasıyla başlamaktadır. Bu da kolona ilaç taşınabilmesini sağlamaktadır. Diğer yandan, amid tipi konjugatlarda, halka açılmasına rağmen ilaç salımı gözlenmemektedir. Bunun nedeni, siklodekstrinlerin degradasyonu sonucu oluşan küçük sakkaritler ve bifenilasetik asit arasındaki amid bağının bakteriyel enzimlere dayanıklı olması ve yüksek hidrofilitesi nedeniyle absorpsiyonunun düşük olmasıdır (82).

Peptid ve Protein Taşınması

Peptid ve proteinlerin kimyasal ve enzimatik olarak dayanıksız olmaları, biyolojik membranlardan absorpsiyonlarının zayıf olması, hızlı plazma klirensi, doz-cevap eğrisi ve immünojenisite gibi çeşitli problemleri vardır (117). CD'lerin biyolojik membranlar ile etkileşebilme özellikleri peptid, protein ve oligonükleotidler için uygun taşıyıcı olmalarını sağlamaktadır. CD'ler protein ve peptid ilaçların fiziksel ve kimyasal stabilitesini düşük konsantrasyonlarda artırır. DM- β -CD takrolimusun, intestinal epitelyal hücrelerden P-gp pompa sistemini inhibe ederek oral biyoyararlanımını artırmaktadır (45).

Peptid ve proteinlerin çeşitli mukozal yollar ile sistemik uygulaması, oral ve parenteral yollara bazı açılardan üstünlük sağlamaktadır. Örneğin; peptid veya protein yapıdaki molekülün, transmukozal taşınma ile gastrointestinal ve hepatik klirensi elimine edilmiş olacaktır. Nazal uygulama, peptid ve protein ilaçların

uygulanabilmesi için en iyi ve pratik yol olarak görülmektedir. Ancak, nazal epitel de ilacın absorpsiyonu için fiziksel ve metabolik bir engel teşkil etmektedir. Siklodekstrinler ile (özellikle metillenmiş silodekstrinler) insülin, kalsitonin, insülin benzeri büyüme faktörü gibi ilaçların absorpsiyonunun arttığı gösterilmiştir (45,82,118).

Gen ve Oligonükleotid Taşınması

Gen taşınmasında viral vektörlerin toksisite ve immünojenisite göstermeleri sebebiyle viral olmayan vektörler tercih edilmektedir. Günümüzde gen taşıma teknolojisi olarak, terapötik nükleik asitlerin taşınmasında siklodekstrin molekülleri test edilmektedir. Siklodekstrinler ile oligonükleotidlerin in vivo taşınmasında, hücrel membranlardan geçebilme, endonükleazlara karşı duyarlılıkları, polianyonik doğalarının hücre içi ve dışı katyonik moleküllerle özgül olmayan etkileşimleri ve potansiyel immünojeniteleri gibi sorunları çözülebilmektedir (119). Siklodekstrinler, oligonükleotidlerin hücrel alımını ve endonükleazlara karşı stabilitesini artırır; immün stimülasyon ve platelet sayısının azalması gibi yan etkilerini de azaltırlar (119,120).

Dermal ve Transdermal Taşıma

Siklodekstrinler, lokal ve sistemik dermal ilaç taşınmasının optimizasyonunda kullanılmaktadırlar. CD'ler, transdermal ilaç taşınmasında; ilaç salımının ve/veya permeasyonunun artırılması, formülasyondaki veya absorpsiyon bölgesinde ilacın stabilitesinin sağlanması, ilaçtan kaynaklanan lokal irritasyonun azaltılması, taşıyıcıdan ilacın kontrollü salımının sağlanması amaçlarıyla kullanılmaktadırlar (78,83). α , β , ve γ -CDler ve bunların türevleri transdermal ilaç taşınmasında kullanılmaktadır. İlacın deriden penetrasyonunu ilacın taşıyıcı içerisindeki termodinamik aktivitesi ile birlikte deri/taşıyıcı partiyon katsayısı etkiler. Siklodekstrinler, ilacın taşıyıcı içerisindeki termodinamik aktivitesini artırarak ilaç salımını artırmaktadırlar. İlacın taşıyıcı sistemden salınması dermal ilaç absorpsiyonunun artmasını sağlar (76).

Beyine İlaç Taşınması ve Beyine Hedeflendirme

Bodor ve arkadaşlarının kimyasal taşıyıcı sistem (CDS) görüşü, steroid, antitümör etkili bileşik ve kalsiyum kanal antagonisti gibi bileşikleri, 1-metil-1,4-dihidronikotinik asit ile enzimatik sağlam bağlarla kovalan bağlayarak lipofilik hale getirmek ve beyine hedeflemeyi sağlamaktır. Ancak lipofilik özellik ilaçların suda çözünürlüğünü azaltmaktadır. HP- β -CD ilaçların çözünürlüğünü artırır ve dihidronikotinik asitin sulu çözeltideki kimyasal stabilitesini artırarak CDS'nin çözünürlük sorununu çözer. Beyine hedeflemede CDS'nin gelişiminde formülasyon tasarımı çok önemli yer tutar. CDS için formülasyon gelişiminde uygun dozaj formu, stabilite, çözünürlük özellikleri önemli yer tutar. Kan beyin engeli aşılması zor bir bariyer olduğundan peptidlerin absorpsiyonu mümkün değildir. Ancak P-glikoprotein (P-gp) sızıntıyı inhibe etmesi sayesinde DM- β -CD gibi siklodekstrinlerle bu yapıların beyine taşınması mümkün kılınmıştır (45). Tablo 2.13'te ilaç:CD komplekslerine ilişkin yeni ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler verilmiştir.

Tablo 2.13. İlaç:CD kompleksleri ve ilaç taşıyıcı yeni sistemler.

CD	İlaç	Taşıyıcı Sistem	Amaç	Referans
β -CD, HP- β -CD	Ketoprofen	Lipozom	Transdermal ilaç taşıyıcı sistem	(121)
HP- β -CD, DM- β -CD	Gonadorelin, Lizozim	İnjekte edilebilir mikroküreler	Protein stabilitesi ve geciktirilmiş salım	(122)
β -CD	Poli (propilen glikol) bisamin	Hidrojel	Doku mühendisliğinde biyomedikal materyal	(123)

Tablo 2.13. (Devam) İlaç:CD kompleksleri ve ilaç taşıyıcı yeni sistemler

CD	İlaç	Taşıyıcı Sistem	Amaç	Referans
HP- β -CD	Glutasyon	Mikropartikül	Peptid degradasyonunun önlenmesi ve oral geciktirilmiş salım sağlayan sistemlerin geliştirilmesi	(124)
HP- β -CD	Furosemit, Triklolan	Nanopartikül	Hidrofobik bileşenlerin transmukozal uygulanması	(125)
HP- β -CD, γ - CD	Metakolin	Nebulize aerosol	Pulmoner uygulama	(126)
HP- β -CD	İnsülin	Poröz partiküller	Pulmoner taşınma için geciktirilmiş salım sağlayan toz	(127)
HP- β -CD	İnsülin	Nanopartikül	Oral insülin taşıyıcı sistem	(128)
HP- β -CD	İnsülin	Mikroküre	Protein salım kinetiği	(129)

2.3.11. Siklodekstrinlerin Farmakokinetiği ve Toksikitesi

Farmasötik olarak kullanılan siklodekstrinler hidrofildir, molekül ağırlıkları yüksektir (973-2163 Da), hidrofilitesi yüksek ve oral biyoyararlanımları genellikle % 4'ün altındadır. HP- β -CD'in insanlarda oral biyoyararlanımı % 0,5 ile 3,3 arasında olup oral alınan dozun % 50-65'i feçesle atılmakta ve geri kalan doz ise kolonda bakteriler tarafından metabolize edilmektedir. Gastrointestinal kanaldan absorplanmadıkları için bütün siklodekstrin türevleri oral yoldan kullanıldıklarında pratik olarak toksik değildirler (37,130). Ancak burada RM β -CD için bir istisna söz

konusudur. Bu metillenmiş siklodekstrin türevi, diğer siklodekstrinlere oranla daha lipofiliktir ve hidrojen bağı donörleri daha azdır. Sonuç olarak metillenmiş β -CD türevinin oral biyoyararlanımının sıçanlarda %12'ye kadar çıktığı görülmüştür (39).

Siklodekstrinlerin insan eritrositleri üzerindeki hemolitik etkileri nedeniyle parenteral kullanımları daha sınırlıdır (37,41,71). Hemoliz verileri, CD indüklü membran hasarının ve sitotoksitenin belirlenebilmesine katkı sağlamaktadır. Hemolitik etki siklodekstrinler arasında $M\text{-}\beta\text{-CD} > \beta\text{-CD} > \text{HP-}\beta\text{-CD} > \alpha\text{-CD} > \gamma\text{-CD} > \text{HP-}\gamma\text{-CD} > \text{SBE-}\beta\text{-CD}$ şeklinde sıralanabilmektedir. Hemolitik aktivite ile siklodekstrinlerin kolesterole bağlanma kabiliyetleri arasında bir ilişki vardır (37) Örneğin; $M\text{-}\beta\text{-CD}$, kolesterolü insan epitel hücrelerinden uzaklaştırmaktadır (80). Bu durum, hücrenin lizisine neden olmaktadır. $\beta\text{-CD}$ sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle ve bununla ilişkili toksik etkileri (nefrotoksisite) nedeniyle parenteral olarak kullanılamamaktadır (32).

2.4. İlaçların Oral Yolla Uygulanması

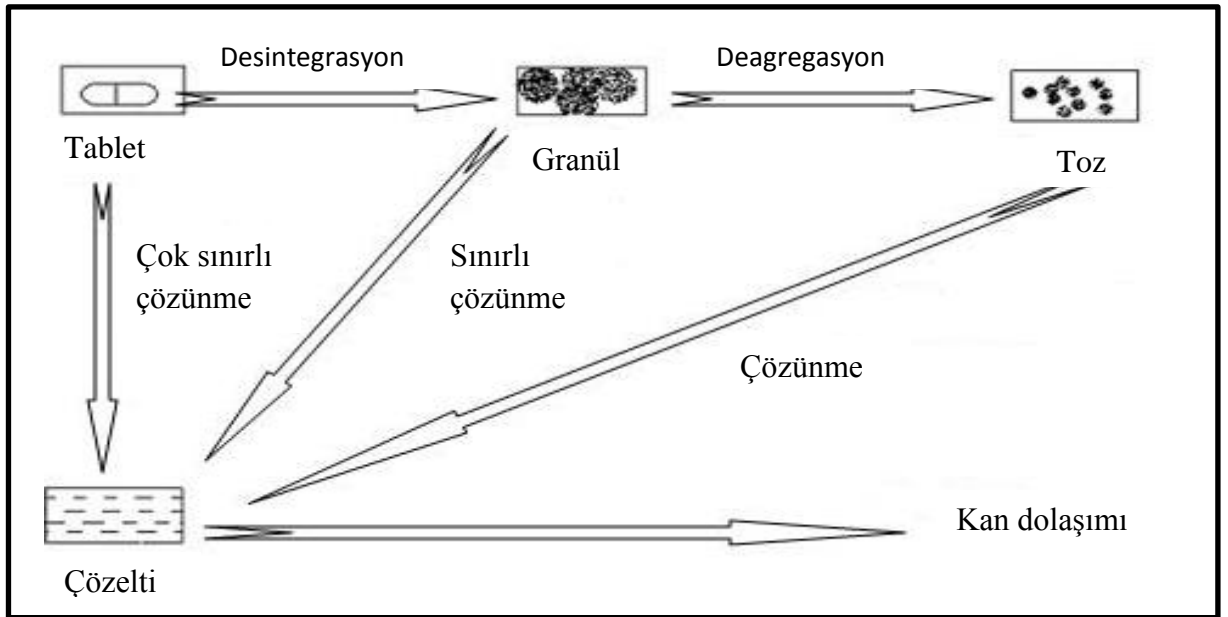
İlaç kullanımında en çok tercih edilen yol oral yoldur. Bunun nedenleri arasında; oral uygulamaya hasta uyuncunun iyi olması, acısız ve kolay bir uygulama şekli olmasını, pahalı teknolojiler gerektirmemesini sıralayabiliriz. Özellikle uzun süreli ilaç kullanımında hastaların birinci tercihi oral yoldur. Bu üstünlüklerinin yanısıra, oral ilaç uygulamasını kısıtlayan sakıncaları da vardır. Bunlar; düşük çözünürlük ve permeabilite, stabilite problemleri (peptid-protein ilaçlar) olarak sıralanabilir (131).

Birçok ilaç molekülü için fizyolojik koşullar veya ilacın intrinsik özelliklerinden dolayı uygulanan dozun çok düşük bir miktarı kan dolaşımına ulaşabilmektedir (132).

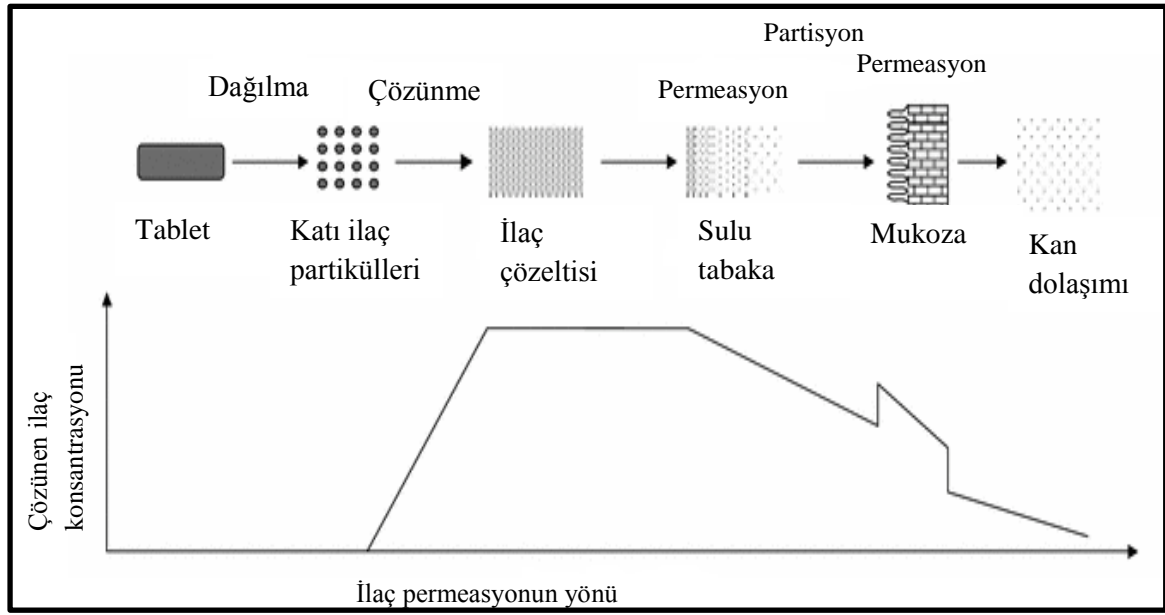
Oral yolla uygulanan dozaj formları arasında oral çözeltiler, oral süspansiyonlar, oral emülsiyonlar, sert ve yumuşak kapsüller, pelletler, tabletler bulunmaktadır. Söz konusu tez çalışmasında SEF:siklodekstrin inklüzyon komplekslerini içeren tabletler üzerinde çalışıldığından, oral dozaj şekillerinden tabletler hakkında daha ayrıntılı bilgi verilecektir.

2.4.1. Tabletler

Ağız yolu ile kullanılan tablet dozaj şekilleri tüm farmasötik dozaj şekilleri arasında en büyük ve en önemli yeri işgal ederler. İlaç molekülleri tablet hazırlamak ve formüle etmek konusunda çok büyük farklılıklar gösterirler. Son 30 yılda sentezlenen ilaç molekülleri genellikle sudaki çözünürlükleri az, akıcılığı ve basılabilirliği kötü mikronize partiküller, sıcaklık ve neme duyarlı maddeler olarak ortaya çıkmaktadırlar. Bu tür moleküllerden tablet tipi katı bir dozaj şeklinin, kolay ve makul bir maliyette üretilebilmesi, çözünme, dağılma zamanı, stabilite gibi farmakope standartlarını yerine getirebilmesi ve bu formülasyonların aynı zamanda biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik koşullarına uyması gerekmektedir. Tabletlerin oral olarak alınmasını takiben, ilacın kan dolaşımına geçiş etki bölgesine gitmesine kadar geçirdiği evreler aşağıdaki Şekil 2.18’de gösterilmiştir. Şekil 2.19’da ise gastrointestinal kanalda ilaç biyoyararlanım oranı şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.18. Tablet etkin maddesinin intestinal absorpsiyonla kan dolaşımına geçişi (133).



Şekil 2.19. Gastrointestinal kanalda ilaç biyoyararlanım oranı ile ilgili prosesler (86).

Tabletlerde Kullanılan Yardımcı Maddeler

Tablet yardımcı maddeleri fonksiyonları açısından aşağıdaki şekilde sınıflanabilirler;

- Dolgu maddeleri
- Bağlayıcılar
- Dağıtıcılar
- Kaydırıcılar (*Lubrikanlar*)
- Akış düzeltici / yapışmayı önleyiciler (*Glidanlar*)
- Asit-baz tamponlayıcılar
- Tatlandırıcılar
- Islanmayı sağlayıcı maddeler
- Kaplama maddeleri
- Matriks oluşturucular

2.4.2. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)

BCS, ilaç absorpsiyonunun anlaşılmasında permeabilite ve çözünürlük açısından bir çerçeve oluşturmaktadır. Bu sistem, ilaçları sudaki çözünürlüklerine, çözünme ve intestinal permeabilitelerine göre sınıflandırmaktadır. İlk olarak Amidon ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (134,135) . FDA (Food and Drug Administration) (136), WHO (World Health Organization) (11) ve EMA (European Medicines Agency)'nın da BCS ile ilgili rehberleri bulunmaktadır.

BCS'ye göre ilaç etkin maddeleri 4 grup altında toplanmaktadır. Tablo 2.14'de BCS ve CD'lerin ilaç biyoyararlanımı üzerindeki etkisi, Şekil 2.20'de BCS şematik olarak verilmiştir.

Tablo 2.14. BCS ve CD'lerin ilaç biyoyararlanımları üzerindeki etkisi (42).

Sınıf	Çözünürlük	Permeabilite	Absorpsiyon hız kontrolü	CD'lerin ilaç biyoyararlanımı üzerindeki etkisi	Örnek
I	Yüksek	Yüksek	Gastrik boşalma	Azaltabilir	Piroksikam
II	Düşük	Yüksek	Çözünme	Artırabilir	Karbamazepin
III	Yüksek	Düşük	Permeabilite	Azaltabilir	Difenhidramin Hidroklorür
IV	Düşük	Düşük	Çözünme ve permeabilite	Artırabilir	Siklosporin A

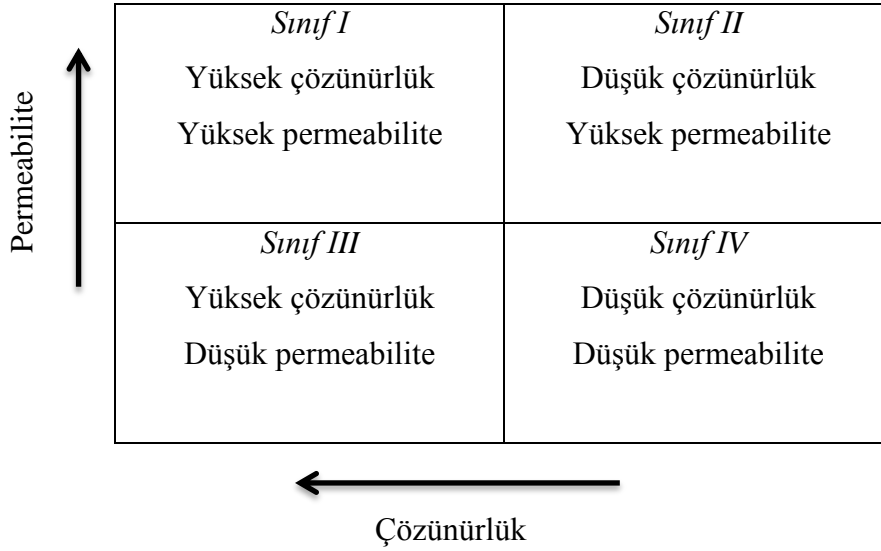
Çözünürlük: Ani salım yapan bir ürünün en yüksek dozunun 250 mL veya daha az suda (pH 1-7.5) çözünmesi durumunda, ürünün yüksek çözünürlüğe sahip olduğu söylenebilir. 250 mL, ilacın alınmasında hastanın ilaçla birlikte alacağı 1 bardak su düşünülerek belirlenmiş bir değerdir. Bir etkin madde yüksek çözünürlüğe sahipse biyoeşdeğerlik çalışmalarından genellikle muaf olur. Ancak polimorfizm ve

partikül büyüklüğü gibi faktörler çözünme hızını etkileyeceği için bu gibi durumlarda özel dikkat gösterilmesi gerekmektedir (137).

Permeabilite: İntestinal membrandan geçen ilaç miktarıyla ilişkilidir. Uygulanan dozun % 90'ının absorblanması durumunda, ilaç yüksek permeabilite gösteriyor demektir. İntestinal membrandan geçen ilacın ölçülmesiyle hesaplanabileceği gibi in vitro hücre kültürü yöntemleri de permeabilite hakkında fikir vermektedir.

Çözünme: Ani salım yapan bir dozaj şeklinde, ilacın % 85'inin ilk 30 dakikada çözünmüş olması gerekmektedir (80-82). Amerikan Farmakopesi'nde (USP), çözünme deneyinin Aparat I (sepet) ile 100 rpm'de (veya Aparat II (palet) ile 50 rpm'de) 500 mL, 900 mL veya 1000 mL ortam kullanılarak yapılması gerektiği bilgisi bulunmaktadır (138). Çözünme, biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik hakkında fikir edinmemizi sağlayan in vitro testtir. Bir ilacın, belirli bir ortamda zamana karşı çözeltiyeye geçme hızının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. İlacın % 85'ten fazlasının ilk 15 dk içinde çözünmesi durumunda, çözünme profilleri matematiksel değerlendirmeye gerek kalmaksızın benzer kabul edilmektedir (137).

Bir ilacın yüksek derecede çözünür olduğu düşünülüyorsa, ilaç verildikten sonra maruz kaldığı pH değeri aralığında, dozaj sisteminin dağılmasını takiben, etkin maddenin çabuk çözünmesi koşuluyla, ilacın herhangi bir biyoyararlanım sorunu yaratmaması beklenir. Böyle durumlarda çözünme profillerinin benzerliğine dayanarak biyoeşdeğerlik çalışması gereği kaldırılabilir (137).



Şekil 2.20. BCS Şematik Gösterimi (139).

2.5. Caco-2 Hücreler İle Permeabilite Çalışmaları

2.5.1. Caco-2 Hücreler

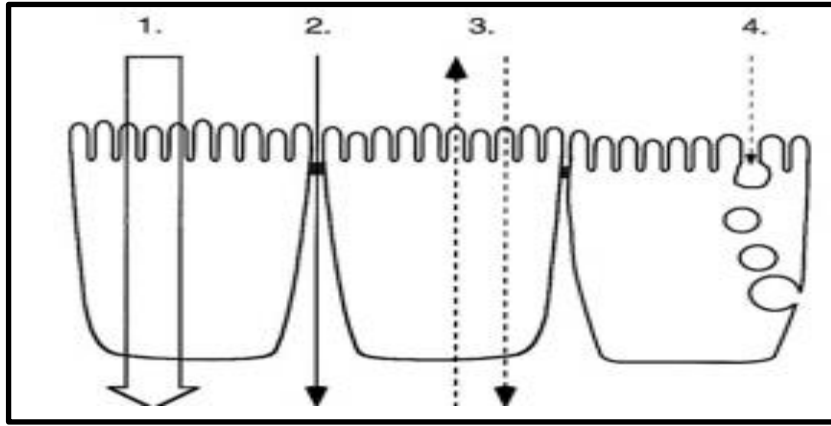
Hücre Kültürü Sistemlerinin Üstünlükleri

- Az miktarda bileşenle çalışılmasına olanak sağlar.
- Birçok bileşen bir arada izlenebilir.
- Sıcaklık, pH, çeşitli enzim inhibitörlerinin etkisi gibi deney koşulları kontrol altında tutulabilir.
- İlaç transport ve metabolizasyon mekanizmaları aydınlatılabilir.
- İlaç adaylarının veya formülasyon bileşenlerinin potansiyel toksik etkileri çalışılabilir.

İnsan kolon adenokarsinoma (Caco-2) hücre modeli en çok kullanılan ve en iyi karakterize edilmiş hücre modelidir. Bu nedenlerle ilaç absorpsiyon ve transport çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Caco-2 hücreler, in vitro ortamda büyütüldüklerinde normal enterositlerin yapısal özelliklerini gösterirler (140). Farklılaşarak, yapı ve işlevsel olarak ince barsak epitelinin birleşik tek tabakalarını (monolayer) oluştururlar. Bu özelliklerinden dolayı, ilaç absorpsiyonu için basit bir

in vitro model olarak düşünülmektedirler (141,142). Biyolojik membrandan ilaç transport mekanizmaları Şekil 2.21’de verilmiştir.

İntestinal membrandan hızla ve tamamen absorbe olan ilaçlar lipofilik yapıdadırlar ve intestinal membrandan geçerek genellikle pasif hücre içi yoldan absorbe olurlar. Hidrofilik moleküller ve peptidlerin ise membranalardan geçiş oranları düşüktür. Bu moleküller pasif paraselüler yoldan absorplanırlar. Kimyasal yapıları çeşitli besin maddelerinininki ile benzerlik gösteren bazı hidrofilik ilaçlar aktif olarak taşıyıcı aracılı transport veya taşıyıcı aracılı akış ile intestinal epitelden geçerler. Bazı protein yapılı bileşiklerin de veziküller aracılığı ile membrandan geçişi söz konusudur (143-145).



Şekil 2.21. Membran transport mekanizmaları. 1) Pasif hücre içi transport 2) Pasif hücreler arası transport 3) Aktif taşıyıcı aracılı transport 4) Veziküler transport (145).

Bahsi geçen dört transport mekanizması için Caco-2 hücre tabakalarından faydalanılmaktadır. Caco-2 hücre tabakalarından ilaç transportunun, in vivo intestinal transporta en çok uyum gösterdiği mekanizma pasif paraselüler (hücreler arası) yolaktır. Pasif paraselüler yolak, hücre tek tabakalarında, in vivo ortamdakinden daha az geçirgen olmakla birlikte, seçiciliklerinin karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir (145).

2.5.2. Permeabilite/Transport Çalışmaları

Caco-2 hücrelerden transport, absorpsiyon problemi olan, tercihen pasif mekanizmayla absorbe olan ilaçların permeabilitelerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Yapılan in vitro permeabilite ve in vivo oral absorpsiyon çalışmaları birbiri ile korele bulunduğundan, Caco-2 hücre tabakalarının, intestinal ilaç absorpsiyonunda model olarak kullanılabilceğini ortaya koymuştur (146). BCS çerçevesinde, belirli grup ilaçlar için Caco-2 hücrelerden geçiş, etkin madde diğer kriterleri sağlamış ise, in vivo biyoeşdeğerlik çalışmaları yerine kabul edilebilmektedir (134).

Caco-2 hücreler ile permeabilite çalışmalarında, çok gözlü kültür plaklarında hazırlanmış yarı geçirgen plastik kullanılır. Belirli bir süre hücreler büyütüldükten sonra, test edilecek numuneler hücrelerin *apikal* taraflarına uygulanır. Son olarak her test bileşeni için görünür permeabilite sabiti (P_{app}) hesaplanır.

Görünür permeabilite sabiti, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır (141,147).

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/AC_0$$

P_{app} = görünür permeabilite sabiti

dQ/dt = Akış hızı (kütle/zaman)

C_0 = Apikal yüzdeki başlangıç ilaç konsantrasyonu

A = Hücre yüzey alanı

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Maddeler ve Aletler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

2-hidroksipropil- β -siklodekstrin (CAVASOL® W7 HP Pharma)	Wacker Kimya AG, Almanya
Metil- β -siklodekstrin (CAVASOL® W7 M Pharma)	Wacker Kimya AG, Almanya
β -siklodekstrin	Sigma-Aldrich, Almanya
α -siklodekstrin	Sigma-Aldrich, Almanya
γ -siklodekstrin	Sigma-Aldrich, Almanya
SEF trihidrat	Bilim İlaç, Türkiye
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma-Aldrich, Almanya
Dimetil sülfoksit (analitik grade)	Applichem,
Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)	Biochrom AG, Almanya
L-glutamin 200 mM	Biochrom AG, Almanya
Magnezyum Stearat	Ali Raif İlaç, Türkiye
Metanol (HPLC grade)	Sigma-Aldrich, Almanya
Mikrokristalize selüloz (Avicel® pH 102)	Ali Raif İlaç, Türkiye
Mısır Nişastası	Ali Raif İlaç, Türkiye
Penisilin/Streptomisin 10000 U/10000 μ g/mL	Biochrom AG, Almanya
D(+) glikoz monohidrat	Merck
Ultra Saf Su	Millipore, ABD
Müller Hinton Agar	BD Besiyeri
Referans tablet Tablet (Referans ilaç)	Bilim İlaç, Türkiye

3.1.2. Biyolojik maddeler

Caco-2 Hücreler (İnsan epitelyal kolorektal adenokarsinom hücreleri)	ŞAP Enstitüsü, Türkiye
Fetal Sığır Serumumu (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Tripsin-EDTA	Biochrom AG, Almanya
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

3.1.3. Aletler

220 Volt Puar (Labopet 240)	Greiner bio-one, Almanya
Çözünme Cihazı	SOTAX Ch- 4123, İsviçre
DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)	Shimadzu DSC 60, Japonya
FT IR Spektrofotometresi (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi)	Perkin – Elmer Spectrum BX FT-IR, ABD
HPLC Sistemi	Agilent 1100 Series, Almanya
Hücre Kültürü için Flask	Greiner bio-one, Almanya
Hücre Kültürü için Insert	Greiner bio-one, Almanya
Hücre Kültürü için Su Banyosu	Memmert
Hücre Kültürü Kuyucukları (TC-Plate 24)	Greiner bio-one, Almanya
Inkübator	SANYO MCO-18AIC, Japonya
Işık Mikroskopi	Leica, Almanya
Laminar Hava Akımlı Kültür Kabini	BHG 2000 S/D, D:Group Company, İtalya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL 3000, Danimarka
Mekanik Karıştırıcı	Variomag Multipoint HP, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
NMR Spektrometresi	Bruker Biospin marka Yüksek Çözünürlüklü Dijital 300 MHz NMR Spektrometresi

Rotavapor	IKA-Werke-RV06 ML, Almanya
Steril Pipet	Greiner bio-one, Almanya
Steril Santrifüj Tüpü	Greiner bio-one, Almanya
Tablet Makinası	Erweka Apparatebau Tablet Makinası, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu	QUANTA 400F Field Emission SEM (Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu)
Terazi (Dijital)	Shimadzu, Japonya
Ters Faz (RP) Kolon	Waters, RPC18
UV Spektrometresi	Schimadzu UV 1700, Japonya
Vakumlu Etüv	Salvis, KUTS11, İsviçre
X-ışını diffraktometresi	Rigaku Ultima-IV X-ışını Kırınım Cihazı

3.2. Yöntemler ve Deneyler

3.2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Etkin maddenin saflığının kanıtlanabilmesi ve hazırlanan inklüzyon kompleksleri ile karakterizasyonlarının kıyaslanarak, kompleks oluşumuna karar verilebilmesi amacıyla, SEF trihidratın karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

SEF trihidratın FTIR Spektrumu

SEF trihidratın IR spektrumu, Bruker IFS 66/S spektrofotometresinde, 4000-400 cm^{-1} dalga boyları arasında gerçekleştirilmiştir.

SEF trihidratın X-Işını Kırınımı Analizi

SEF trihidratın X-ışını kırınımı analizi, Rigaku Ultima-IV X-Işını Kırınım Cihazı marka cihaz kullanılarak 40 kV voltajda, 2°/dk tarama hızında, 3° – 90° arası taranarak gerçekleştirilmiştir.

SEF trihidratın DSC Analizi

SEF trihidratın kalorimetrik analizi Shimadzu DSC60 model diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özel hazırlanan alüminyum plaklar arasına yerleştirilen örnek (~3 mg), 10°C/dk hızında 25-300°C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında ısıtılarak, DSC termogramları çekilmiştir.

SEF trihidratın ¹H-NMR Spektrumu

SEF trihidratın ¹H-NMR Spektrumu, Bruker Biospin marka Yüksek Çözünürlüklü Dijital 300 MHz NMR Spektrometresi ile alınmıştır. Çözücü olarak D₂O kullanılmış ve SEF molekülünde farklı pozisyonlarda bulunan hidrojen atomlarına ait kimyasal kayma (δ -ppm) değerleri verilmiştir.

SEF trihidratın SEM Görüntülemesi

QUANTA 400F Field Emission SEM Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. Yüzey yükünü en aza indirmek için altın-palladyum alaşımı ile 100 °A kalınlığında kaplanmıştır.

SEF trihidratın UV Spektrumu

SEF trihidratın pH 7.2 fosfat tamponunda 10 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmış çözeltisinin 200-400 nm arasında UV spektrumları kaydedilmiştir.

3.2.2. SEF trihidratın Miktar Tayini

SEF trihidrat için USP 30'da verilen ve validasyonu yapılan miktar tayini yönteminin özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. SEF trihidrat ters faz HPLC yöntemi

Mobil faz	Tetrabütil amonyum hidroksit çözeltisi: Asetonitril (75:25 h/h)
Mobil faz akış hızı	1 mL/dk
Sabit faz	Waters C18 kolon (3.9 x 300 mm , 10 µm)
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Dedektör	DAD, 289 nm
SEF alıkonma süresi	5 dk
Kolon sıcaklığı	25°C
Bitiş zamanı	6 dk

Kalibrasyon

SEF trihidratın pH 7.2 fosfat tamponunda hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 10 – 500 µg/mL konsantrasyonlar elde edecek şekilde 6 adet dilüsyon yapılmıştır. Tablo 3.1'de özellikleri verilen HPLC yöntemi kullanılarak, SEF trihidratın kalibrasyonu yapılmıştır. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.3. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. Yöntem validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır (148-150). HPLC analitik metodunun değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

- Özgünlük (Specificity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Aralık (Range)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
- Duyarlılık (Sensitivity)
- Stabilitate (Stability)

Özgünlük (Specificity)

Bir analitik yöntemin özgünlüğü; ortamda bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir, sayısal olarak ifade edilmez. Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, M- β -CD, tablet formülasyonunda kullanılan mısır nişastası, magnezyum stearat, avicel pH 102 çözeltilerinin, hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HBSS'nin etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direkt olarak orantılı olmasını sağlama yeteneğidir (148). Bu amaçla, SEF'in pH 7.2 fosfat tamponunda hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 10 – 500 μ g/mL konsantrasyonlar elde edecek şekilde 6 adet dilüsyon yapılmıştır. Kalibrasyon

doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

Aralık (Range)

Analitin kesin, doğru ve doğrusal olarak belirlendiği en düşük ve en yüksek değerler aralığıdır. Özgün aralıklar;

- İlaç ve etkin madde miktar tayininde; test derişiminin % 80-120
- İçerik tekdüzeliği için; test derişiminin % 70-130
- Çözünme testinde; özgün aralığın +/- %20'sini kapsamalıdır.

Bu amaçla, tabletlere yapılacak olan çözünme testi de göz önünde bulundurularak 10 – 500 µg/mL gibi geniş bir konsantrasyon aralığı seçilmiştir.

Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade etmektedir (148). SEF trihidratın miktar tayini için kullanılan yöntemde gün içi ve günler arası doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır (151).

$$\text{Doğruluk} = \frac{\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon} - \text{İlave edilen konsantrasyon}}{\text{İlave edilen konsantrasyon}} \times 100$$

Gün içi doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 10, 200, 500 µg/mL), her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Günler arası doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 10, 200, 500 µg/mL), her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden 3 gün boyunca analiz yapılmıştır.

SEF trihidrat miktar tayini için kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun araştırılması için ölçümle bulunan ve hazırlanan konsantrasyonlardan geri kazanımlar hesaplanmış ve geri kazanımların \bar{X} , SS ve %VK hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması amaçlanmaktadır.

Kesinlik (Precision)

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçümüdür. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerlerle ilgisi yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda numune ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) ve standart sapma (SS) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) olarak ifade edilir (152).

Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Kalibrasyon çalışmaları için hazırlanan çözeltilerden düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda (10, 200 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) birer çözelti seçilmiştir ve bu konsantrasyondaki çözeltinin 6 kez ardı ardına HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizi ile bulunan konsantrasyon değerlerinin ($\mu\text{g/mL}$) ortalama (\bar{X}), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın %2'den küçük olması gerekmektedir.

Tekrar Elde Edilebilirlik (Reproducibility)

Aynı konsantrasyondaki çözeltiden hareketle, aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Üç farklı konsantrasyon düzeyinde uygun sayıda bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün ve farklı günlerde gerçekleştirilir.

Deney içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 10, 200, 500 $\mu\text{g/mL}$) her bir

konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 10, 200, 500 µg/mL) her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayin edilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında HPLC analizi ile elde edilen konsantrasyon değerlerinin ($\mu\text{g/mL}$) \bar{X} , SS ve VK hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması gerekmektedir.

Duyarlılık (Sensitivity)

a) Gözlenebilirlik (Limit of Detection)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (153).

b) Tayin edilebilirlik (Limit of Quantification)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (153).

Stabilite (Stability)

SEF trihidratın analiz süresince dayanıklı olduğunu göstermek amacı ile, 10 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan SEF trihidrat çözeltisinin, 24 saat sonunda bozunmadan kalan miktarı tayin edilmiştir (n=6).

3.2.4. Faz Çözünürlük Çalışmaları

SEF trihidrat için α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD ile faz çözünürlük çalışması yapılmıştır. M- β -CD, HP- β -CD'in % 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a/h konsantrasyonunda çözeltileri hazırlanmıştır. α -CD, β -CD, γ -CD'in ise 1, 2, 4, 8, 10, 12, 16 mM konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. 25'er mg SEF flakonlara tartılarak, üzerlerine hazırlanan CD çözeltilerinden 1'er mL ilave edilmiştir (n=3). 72 saat manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 0.45 μ m'lik filtreden süzülmüştür. HPLC'de miktar tayini analizi yapılarak, 1:1 kompleks tipi faz çözünürlük eğrisinin lineer kısmının eğiminden yararlanılarak, asosiyasyon sabiti ($K_{1:1}$) hesaplanmıştır.

$$K_{1:1} = \frac{Eğim}{S_o (1 - Eğim)}$$

S_o = İlacın gerçek (intrinsik) çözünürlüğü

3.2.5. İnküzyon Kompleksi Hazırlama Çalışmaları

SEF trihidrat inküzyon komplekslerinin hazırlanmasında α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD kullanılmıştır. Faz çözünürlük çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre 1:1 molar oranda kompleks hazırlanmasına karar verilmiştir. Komplekslerin hazırlanmasında yoğurma ve birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemleri alternatif yöntemler olarak kullanılmıştır. Ayrıca SEF'in HP- β -CD ve M- β -CD için fiziksel karışımları da hazırlanmıştır.

Birlikte Çöktürme-Birlikte Dondurarak Kurutma Yöntemi ile Kompleks Hazırlanması

SEF:CD 1:1 mol oranında inküzyon komplekslerinin hazırlanması için eşit molar oranda SEF, α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD hesaplanarak tartılmıştır. Her siklodekstrin türevi için, SEF trihidrat bir beherde metanolde çözülmüş, başka bir beherde ise CD'in sudaki çözeltisi hazırlanmıştır. SEF trihidrat

çözültüsü, CD çözültüsüne eklenerek, manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 24 saat manyetik karıştırıcıda tutulan örnekte, çökmüş olan komplekslerden solvanların uzaklaştırılması için metanol, rotavaporda 2 saat uçurulmuştur. Ortamdan suyun uzaklaştırılması için, dondurulmuş olan örnek 72 saat liyofilize edilerek toz halde kompleks elde edilmiştir.

Yoğurma Yöntemi ile Kompleks Hazırlanması

SEF:CD 1:1 mol oranında inklüzyon komplekslerinin hazırlanması için eşit molar oranda SEF trihidrat, α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD hesaplanarak tartılmıştır. Her siklodekstrin türevi için, bir beherde toz halde SEF trihidrat ve CD karıştırıldıktan sonra, karışıma 1 mL ultra saf su sürekli karıştırarak yavaşça eklenmiştir. 30 dakika boyunca karıştırmaya devam edilmiştir. Karışım vakumlu etüvde 4 saat bekletilerek kurutulmuştur.

Fiziksel Karışım Hazırlanması

1:1 molar oranda kompleks için gerekli miktarlarda SEF trihidrat, HP- β -CD ve M- β -CD hesaplanarak tartılmıştır. Her CD türevi için, SEF trihidrat ve CD bir flakonda ezilmeden karıştırılarak, SEF:M- β -CD ve SEF:HP- β -CD fiziksel karışımları hazırlanmıştır.

3.2.6. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Karakterizasyon amacıyla hazırlanan kompleks ve fiziksel karışımların da SEF trihidrat için yapılan FTIR, XRD, $^1\text{H-NMR}$, DSC analizleri yapılmış ve SEM görüntüleri kaydedilmiştir. Karakterizasyon sonuçlarına göre SEF:CD komplekslerinin oluşup oluşmadığı incelenmiştir.

İnküzyon Komplekslerinin FTIR spektrumu

Komplekslerin IR spektrumu, Bruker IFS 66/S pektrofotometresinde, 4000-400 cm^{-1} dalga boyları arasında gerçekleştirilmiştir.

İnklüzyon Komplekslerinin X-Işını Kırınımı Analizi

Komplekslerin X-ışını kırınımı analizi, Rigaku Ultima-IV X-Işını Kırınım Cihazı marka cihaz kullanılarak 40 kV voltajda, 2°/dk tarama hızında, 3° – 90° arası taranarak gerçekleştirilmiştir.

İnklüzyon Komplekslerinin DSC Analizi

Komplekslerin kalorimetrik analizi Shimadzu DSC60 model diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özel hazırlanan alüminyum plaklar arasına yerleştirilen örnek (~3 mg), 10°C/dak hızında 25-300°C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında ısıtılarak, DSC termogramları çekilmiştir.

İnklüzyon Komplekslerinin ¹H-NMR Spektrumu

Komplekslerin ¹H-NMR Spektrumu, Bruker Biospin marka Yüksek Çözünürlüklü Dijital 300 MHz NMR Spektrometresi ile alınmıştır. Çözücü olarak D₂O kullanılmış ve komplekslerde farklı pozisyonlarda bulunan hidrojen atomlarına ait kimyasal kayma (δ -ppm) değerleri verilmiştir.

İnklüzyon Komplekslerinin SEM Görüntülemesi

Komplekslerin SEM görüntüleri QUANTA 400F Field Emission SEM Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alınmıştır. Yüzey yükünü en aza indirmek için altın-palladyum alaşımı ile 100 °A kalınlığında kaplanmıştır.

3.2.7. SEF trihidrat ve Formülasyonların Toz Halde Çözünme Deneyleri

İn vitro çözünme deneyleri, biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmaları hakkında fikir vermektedir. Ani salım (immediate release) yapan bir dozaj şeklinde, ilacın % 85'inin ilk 30 dakikada çözünmüş olması gerekmektedir (80-82). Bu nedenle, öncelikle hazırlanan ilaç:CD inklüzyon kompleksleri (toz halde) üzerinde çözünme deneyleri yapılmıştır. SEF trihidrat için USP 30'daki çözünme yöntemi aşağıda verilmiştir (25).

Alet: Aygıt II – palet

Çözünme Ortamı: pH 7.2 Fosfat Tamponu, 900 mL

Karıştırma Hızı: 100 rpm

Analiz süresi: 45 dk (10, 15, 20, 30 ve 45. dk)

Analiz numuneleri: SEF trihidrat, SEF: α -CD, SEF: β -CD, SEF: γ -CD, SEF:HP- β -CD, SEF: M- β -CD kompleksleri (herbir kompleks için birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemleri denenmiştir)

Yöntem: 900 mL pH 7.2 fosfat tamponu rezervuarlara konur. Sıcaklık 37 ± 0.5 °C'ye ayarlanır. 447,63 mg SEF trihidrat veya 447,63 mg SEF trihidrata eşdeğer miktarda inklüzyon kompleksi ortama eklenir. Karıştırma hızı 100 rpm olarak ayarlanır. 45 dakika süreyle çözünme incelenir. Uygun zaman aralıklarında örnekler alınır. Alınan örneklerin yerine taze ortam eklenir (n=6).

Alınan örneklerde, Agilent 1100 Series HPLC sistemi kullanılarak valide ettiğimiz yöntemle miktar tayini yapılmıştır (n=6). Örneklerde seyreltme yapılması gerekmemiştir.

3.2.8. Tablet Formülasyonu Geliştirilmesi

Tablet formülasyonlarında, yoğurma yöntemi ile 1:1 molar oranda hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD kompleksleri kullanılmıştır. SEF trihidrat dozu yüksek olduğu için, siklodekstrinle kompleks yapıldığında toz miktarı çok fazla olacağı için SEF trihidrat dozunun (400 mg) dörtte biri oranda (100 mg) çalışılmıştır. Tablet formülasyonları aşağıdaki gibidir.

- SEF:HP- β -CD 420,6 mg
- Avicel pH 102 113,4 mg
- Mısır Nişastası 60 mg
- Magnezyum stearat 6 mg
- SEF:M- β -CD 400,8 mg
- Avicel pH 102 133,2 mg

- Mısır Nişastası 60 mg
- Magnezyum stearat 6 mg

Formülasyonda Avicel pH 102 seyreltici-doldurucu, mısır nişastası dağıtıcı ve magnezyum stearat kaydırıcı olarak kullanılmıştır.

Kompleks ile Avicel pH 102 progresif olarak karıştırılmış, mısır nişastası üzerine kısım kısım ilave edilmiştir. Elde edilen toz karışımı magnezyum stearat üzerine ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Hazırlanan toz karışımından 600 mg tartılarak, tablet makinesinin mühresi toz karışımı ile doldurulmuş ve tabletler teker teker basılmıştır.

3.2.9. Tabletlerin Çözünme Deneyleri

İlaç:CD inklüzyon komplekslerinin çözünme profillerinin izlenmesinin ardından, çözünürlükte en fazla artışı sağlayan CD türevleri (HP- β -CD ve M- β -CD) seçilerek, tablet formülasyonları geliştirilmiş ve tabletler teker teker basılmıştır (Bölüm 3.2.8). Basılan tabletler üzerinde, farmakopede verilen aşağıdaki çözünme yöntemi kullanılarak çözünme deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Alet: Aygıt I – basket

Çözünme Ortamı: pH 7.2 Fosfat Tamponu, distile su, 900 mL

Karıştırma Hızı: 100 rpm

Analiz süresi: 45 dk (10, 15, 20, 30 ve 45. dk)(25).

Analiz numuneleri: Referans tablet (400 mg), Laboratuvar ortamında basılan 400 mg tablet, Laboratuvar ortamında basılan 100 mg tablet, SEF:HP- β -CD inklüzyon kompleksleri ile basılan tablet, SEF:M- β -CD inklüzyon kompleksleri ile basılan tablet

Yöntem 1: 900 mL pH 7.2 fosfat tamponu rezervuarlara konur. Sıcaklık 37 ± 0.5 °C'ye ayarlanır. Karıştırma hızı 100 rpm olarak ayarlanır. 45 dakika süreyle çözünme incelenir. Uygun zaman aralıklarında örnekler alınır. Alınan örneklerin yerine taze ortam eklenir (n=6).

Yöntem 2: 900 mL distile su rezervuarlara konur. Sıcaklık 37 ± 0.5 °C'ye ayarlanır. Karıştırma hızı 100 rpm olarak ayarlanır. 45 dakika süreyle çözünme incelenir. Uygun zaman aralıklarında örnekler alınır. Alınan örneklerin yerine taze ortam eklenir (n=6).

Alınan örneklerde, Agilent 1100 Series HPLC sistemi kullanılarak valide ettiğimiz yöntemle miktar tayini yapılmıştır (n=6). Örneklerde seyreltme yapılması gerekmemiştir. f_1 ve f_2 değerleri hesaplanarak dozaj şekilleri arasında fark olup olmadığı incelenmiştir.

Benzerlik faktöründen (f_2) yararlanılarak formülasyonların çözünme profilleri karşılaştırılmıştır. Benzerlik faktörü formül 3.1 ile hesaplanmıştır:

$$f_2 = 50 \log \{ (1 + 1/n \sum (R_t - T_t)^2)^{-0.5} \times 100 \} \quad (3.1)$$

f_2 = benzerlik faktörü n = örnek sayısı

R_t = Referanstaki t zamanında çözülmüş madde miktarı

T_t = Örnekteki t zamanında çözülmüş madde miktarı

Farklılık faktöründen (f_1) de çözünme profillerinin karşılaştırılmasında yararlanılmıştır. Farklılık faktörü formül 3.2 ile hesaplanmıştır:

$$f_1 = \{ \sum |R_t - T_t| / \sum R_t \} \times 100 \quad (3.2)$$

f_1 = farklılık faktörü

n = örnek alma zamanı sayısı

R_t = Referanstaki t zamanında çözülmüş madde miktarı

T_t = Örnekteki t zamanında çözülmüş madde miktarı

f_2 değeri 0-100 arasında değişmektedir. 50'den büyük olan f_2 değerleri için çözünme profilleri arasında fark olmadığı söylenir. f_1 değerleri 0-15 arasında olan çözünürlük profillerinin benzer olduğu söylenebilirken, bu değer 15'ten büyük olduğunda profillerin birbirinden farklı olduğu söylenir (154,155).

3.2.10. Antibakteriyel Etkinlik Testi

Antibakteriyel bileşikler için minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK, $\mu\text{g/mL}$), mikroorganizma üremesinin görülmediği en düşük konsantrasyondur. MİK değerlerinin saptanması çalışmalarında CLSI'n (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerdiği mikrodilüsyon yöntemi esas alınmıştır (156). Çalışmalarda *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection) bakteri suşu ve Müller Hinton sıvı besiyeri (MHSB) kullanılmıştır.

DeneySEL çalışmalara başlamadan bir gece önce Müller Hinton agara (MHA) ekilen *E.coli* bakteri suşu, çalışma günü MHSB'a alınarak 37°C 'de 2-4 saat inkübe edilmiştir. Bakteri süspansiyonunun bulanıklığı MHSB kullanılarak McFarland 0,5 süspansiyonuna eşdeğer bulanıklığa getirilmiş ($0,5 \times 10^8$ cfu/mL) ve sonuç inokulum 5×10^5 cfu/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deneylerde, her sırasında 12 kuyu bulunan 8 sıradan oluşmuş steril U tabanlı mikrotitrasyon plakları kullanılmıştır. Tüm kuyulara steril damlalık kullanılarak 0,05 mL besiyeri dağıtılmış, sonra 1. kuyuya steril mikropipet yardımıyla konsantrasyonu bilinen SEF trihidrat çözeltisinden, altındaki kuyulara ise α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD'in SEF trihidrat ile oluşturdukları inklüzyon kompleksleri eklenmiştir. Her sıranın 1. kuyusundaki karışım 8 kanallı mikropipetle iyice karıştırılarak 2. Kuyuya aktarılmış, aynı işlemler 2'den 3'e, 3'ten 4'e ... 10'dan 11. kuyuya kadar sürdürülmüştür. Böylece kuyularda 2 kat artan oranlarda seri dilüsyonlar yapılmıştır. Bu işlemden sonra kuyuların tümüne steril damlalık ile bakteri süspansiyonundan 0,05 mL eklenmiştir. Mikrotitrasyon plaklarının son sıradaki çukurlarından biri üreme kontrolü (besiyeri ve mikroorganizma) diğeri ise besiyeri (sadece besiyeri) kontrollü olarak kullanılmıştır. Mikrotitrasyon plakları hafifçe çalkalanarak bakteriler 37°C 'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizma üremesi ile oluşan bulanıklık dikkate alınarak hiç bulanıklığın olmadığı, diğeri bir ifade ile üremenin görülmediği en düşük konsantrasyondaki madde miktarını içeren dilüsyon minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK, $\mu\text{g/mL}$) olarak belirlenmiştir.

3.2.11. Caco-2 Hücreler ile SEF trihidrat Permeabilite Çalışmaları

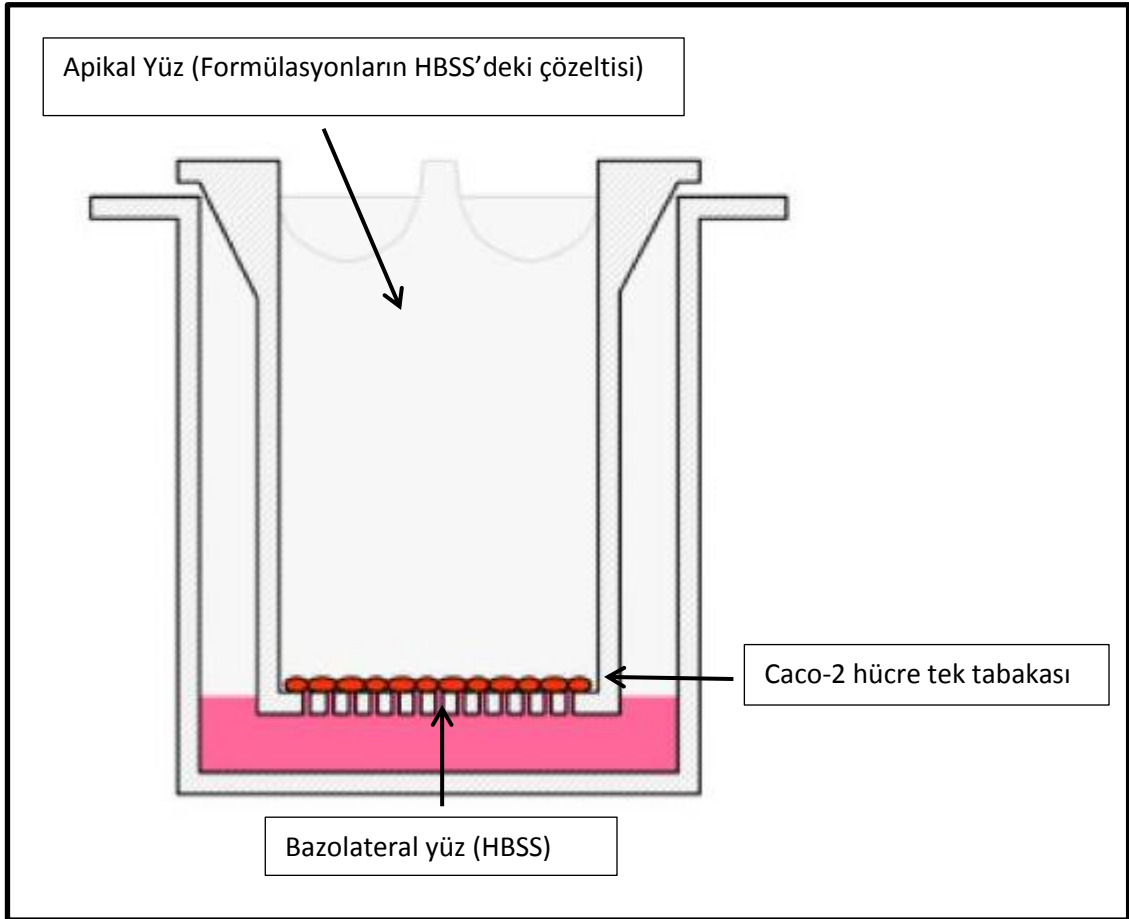
Caco-2 hücre ortamı, DMEM (500 mL) ortamına fetal sığır serumu (50 mL), pensilin-streptomisin (3 mL) ve L-glutamin (10 mL) ilave edilerek elde edilmiştir.

Caco-2 hücreler -180 °C azot tankından alınarak, laminar hava akışı olan kabine yerleştirilmiştir. 15 mL'lik steril santrifüj tüpüne alınan hücrelere 10 mL Caco-2 hücre ortamı eklenmiş ve 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 5 mL yeni ortamda süspande edilmiş ve 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına (ince boyunlu yatay şişe) transfer edilmişlerdir. Hücreler, % 5 CO₂ ortamında 37 °C'de nem inkübatöründe inkübe edilmiştir. Hücre ortamı her 2-3 günde bir değiştirilmiş daha sonra tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tripsinizasyon için 1,5 mL tripsin-EDTA (% 0.005 tripsin, % 0.002 EDTA) çözeltisi flasklara eklenerek inkübatörde 2 dakika tutulmuştur. Daha sonra hücreler transport kuyucuklarına ekilene kadar, santrifüjleme, yeniden süspande etme ve inkübasyon şeklinde prosedür tekrarlanmıştır.

Hücreler 24-26 kez pasajlandıktan sonra ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Transport kuyularının (ThinCert™, por açıklığı 1 µm, çap 13,85 mm) apikal kısmına 0,5 mL ortam, bazolateral kısmına ise 1 mL ortam ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonları da bu kuyucuklara ekilmiş ve 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Ortam 2 günde bir değiştirilmiş ve 20.gün sonunda permeabilite deneyi hücre tek tabakası yeterli düzeye ulaştıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Hücre tek tabakası integritesi transepitelyal direncin (TEER) ölçülmesi ile test edilmiştir. Transepitelyal elektriksel direnç 400-600 omh.cm² değerine ulaştığında hücre tek tabakası geçiş çalışmalarında kullanılmıştır.

Hücreler deney için hazır hale geldikten sonra, kuyucukların apikal ve bazolateral taraflarındaki ortam sırasıyla 0,5 ve 1 mL HBSS ile değiştirilmiş ve 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. SEF trihidrat, SEF:HP-β-CD, SEF:M-β-CD, SEF:α-CD, SEF:β-CD ve SEF:γ-CD'nin (her bir CD için birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemi kullanılmıştır) HBSS'deki çözeltisi; apikal yüze 0,5 mL olarak uygulanmış, bazolateral yüze 1 mL HBSS ilave edilmiştir. Kuyucuklar su

banyosunda 37 °C’de 2 saat çalkalanmıştır. Bazolateral yüzdeki örneğin miktar tayini valide edilen HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. ThinCert şematik gösterimi (147).

Görünür permeabilite sabiti, formül 3.3 kullanılarak hesaplanır (141,147).

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/AC_0 \quad (3.3)$$

P_{app} = görünür permeabilite sabiti

dQ/dt = Akış hızı (kütle/zaman)

C_0 = Apikal yüzdeki başlangıç ilaç konsantrasyonu

A = Hücre yüzey alanı

4. BULGULAR

4.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Etkin maddenin saflığının kanıtlanabilmesi ve hazırlanan inklüzyon kompleksleri ile karakterizasyonlarının kıyaslanarak, kompleks oluşumuna karar verilebilmesi amacıyla, SEF trihidratın karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.1.1. SEF trihidratın FTIR Spektrumu

SEF trihidratın Bölüm 3.2.1.1’de açıklandığı üzere $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyları arasında çekilen IR spektrumu Şekil 4.1’de verilmiştir.

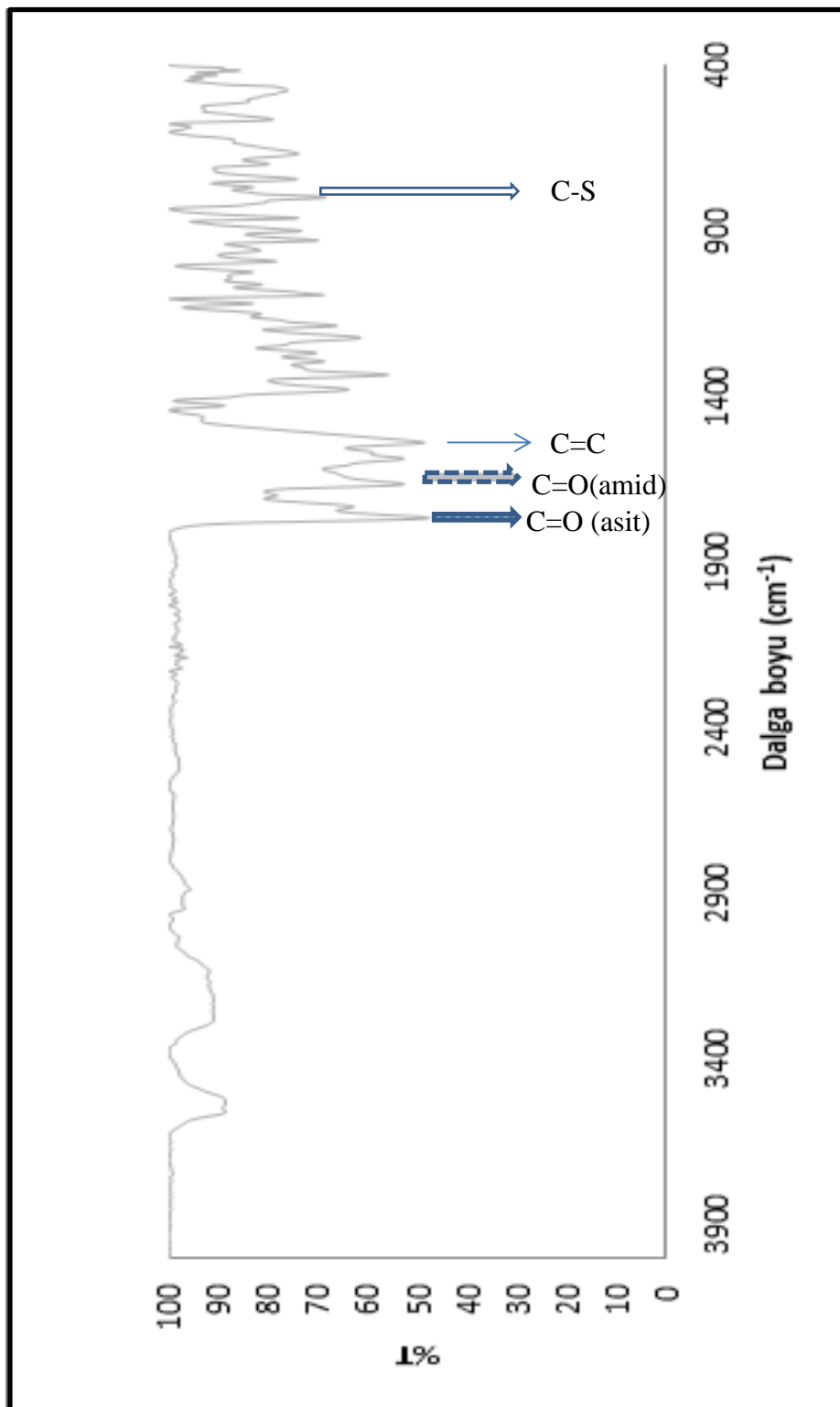
FTIR spektrumunda gözlenen SEF trihidrata ait majör pikler aşağıdaki gibidir.

- $1650-1740\text{ cm}^{-1}$ C=O asit bağlarına ait gerilme titreşimleri
- $1640-1690\text{ cm}^{-1}$ C=O amid bağlarına ait gerilme titreşimleri
- $1590-1640\text{ cm}^{-1}$ C=C çifte bağ gerilme titreşimleri
- $710-570\text{ cm}^{-1}$ C-S bağına ait gerilme titreşimleri

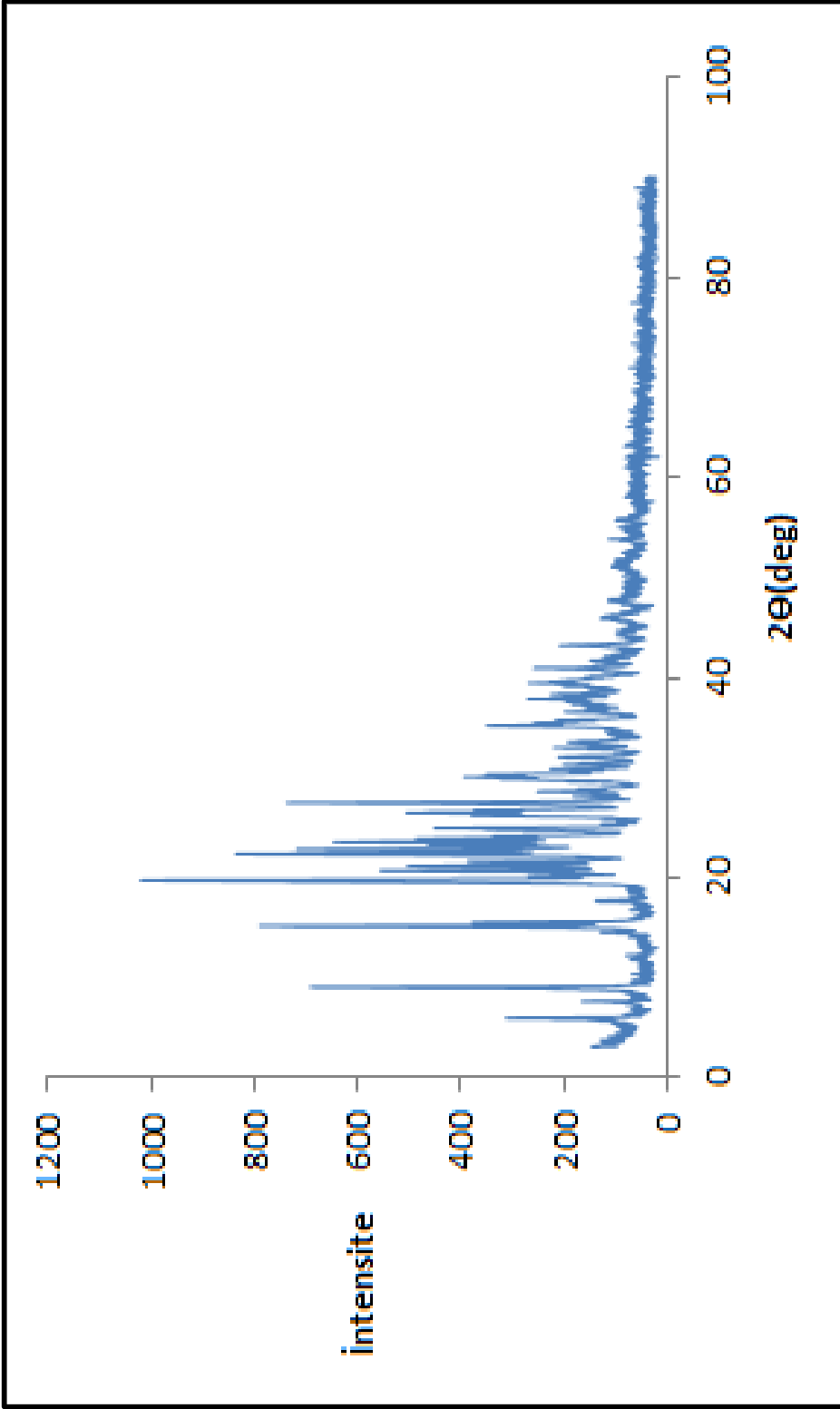
SEF’in FTIR spektrumunda gözlenen bu pikler literatürle uyumlu bulunmuştur (157).

4.1.2. SEF trihidratın X-Işını Kırınımı Analizi

SEF trihidratın X ışını kristalogramı Şekil 4.2’de verilmiştir. Elde edilen bulgular SEF trihidratın kristal yapısının değerlendirilmesinin yanısıra hazırlanan inklüzyon komplekslerinin karşılaştırılmasında ve karakterizasyonunda da kullanılmıştır. Kristalogramlara bakıldığında, SEF trihidratın 2 teta açısı $20 - 40$ derece arasında kristal pikler verdiği görülmektedir. Bu bulgu literatürle uyumludur (155).



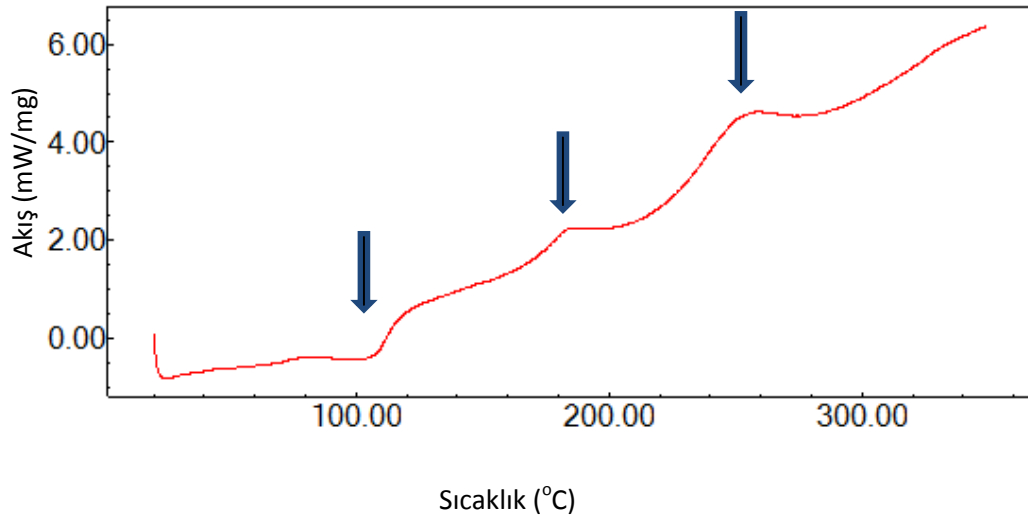
Şekil 4.1. SEF trihidratın FTIR spektrumu



Şekil 4.2. SEF trihidratın X-ışını kristalogramı (40 kV voltaj, 0,02 °/dk tarama hızında)

4.1.3. SEF trihidratın DSC Analizi

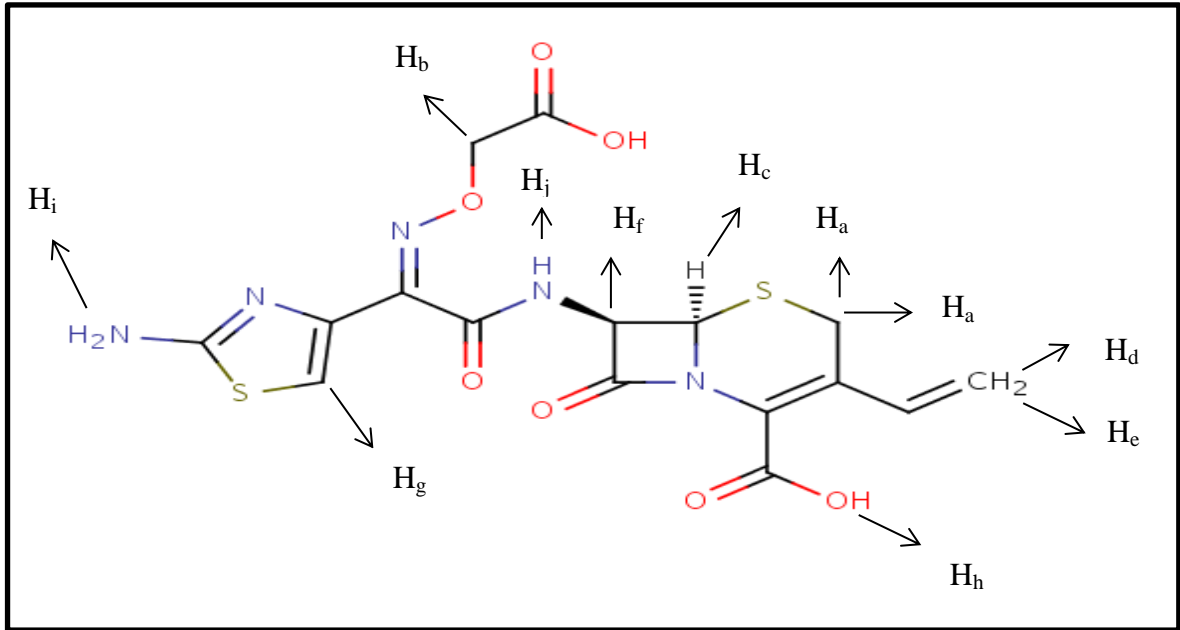
Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, Bölüm 3.2.1.3'te açıklandığı şekilde 10°C ile 350°C arasında gerçekleştirilmiştir. SEF trihidrata ait DSC termogramı Şekil 4.3'te verilmiştir. Elde edilen termogram, SEF trihidrat için literatürde verilen termogram ile uyumludur (158).



Şekil 4.3. SEF trihidratın DSC termogramı.

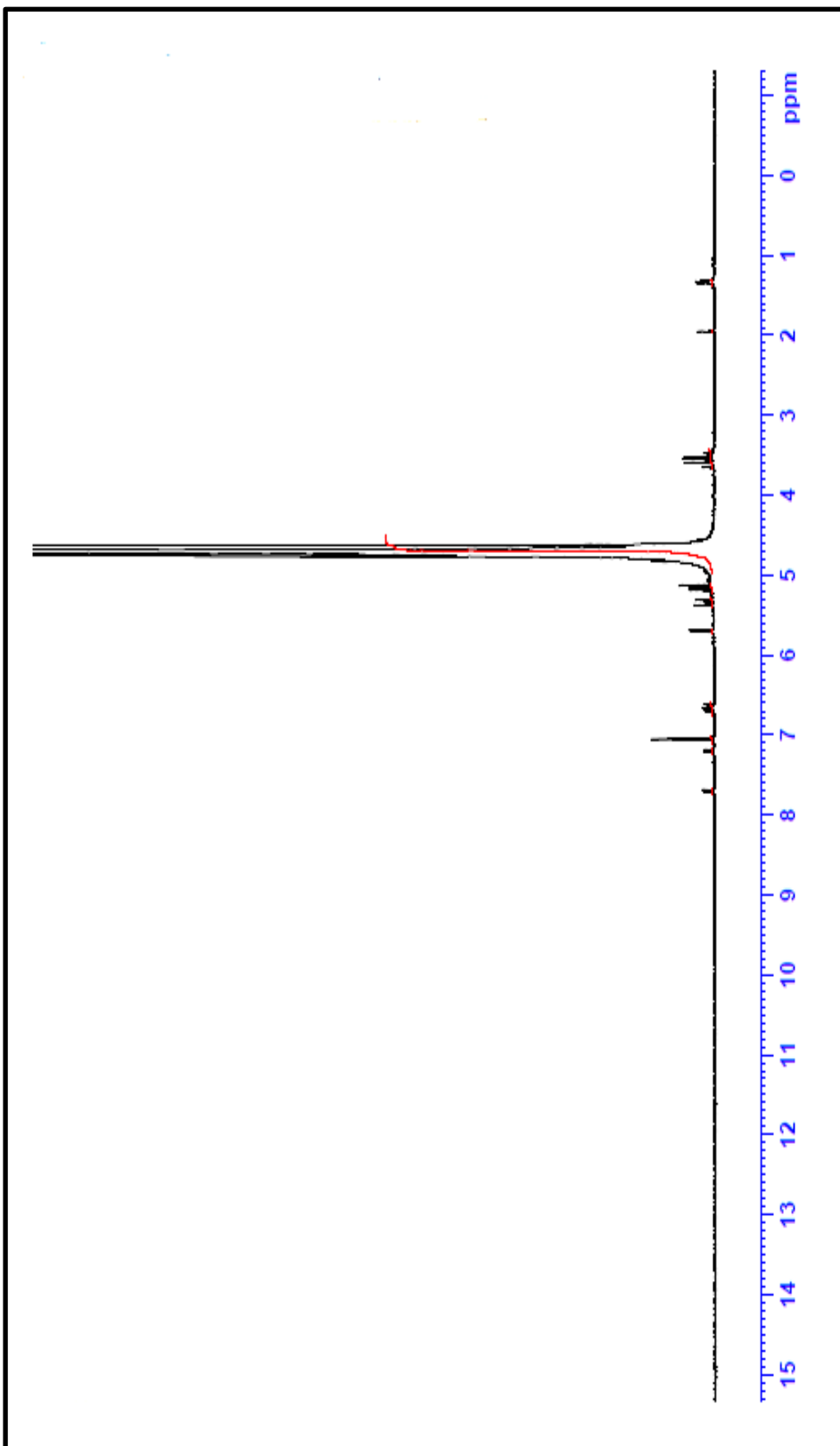
4.1.4. SEF trihidratın ¹H-NMR Spektrumu

SEF trihidratın ¹H-NMR spektrumu Bölüm 3.2.1.4'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. ¹H-NMR analizine ait spektrum Şekil 4.4 'te verilmiştir. SEF trihidrata spesifik protonların spektrumdaki kayma değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.



Tablo 4.1. SEF trihidrata ait protonların spektrumdaki sinyal değerleri.

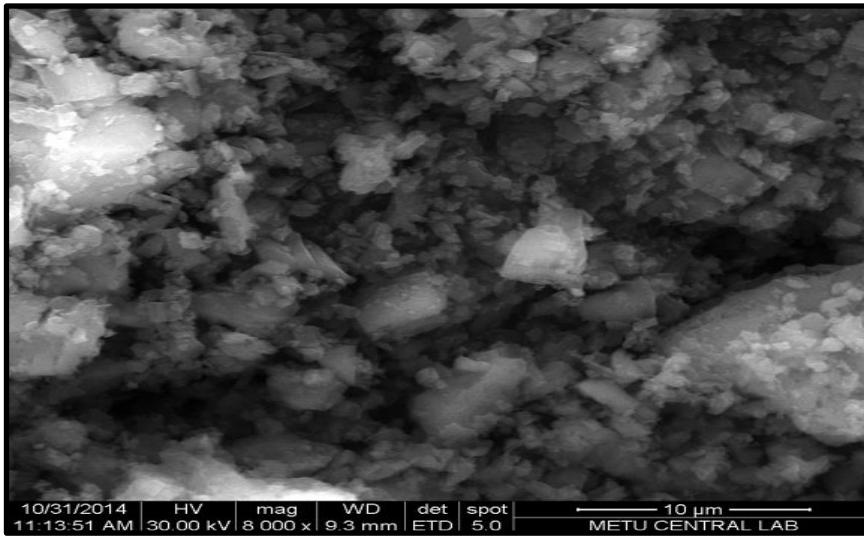
Proton	Sinyal ppm
H _a	3.47-3.65 (dd, 2H)
H _b	1.95 (s, 2H)
H _c , H _d , H _e	5.37-5.124 (m, 3H)
H _f	5.70-5.69 (d, 1H)
H _g	7.05 (s, 1H)
H _h	6,71-6,61 (m, 1H)
H _j	7.71-7.68 (d, 1H)



Şekil 4.4. SEF trihidratu $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (300 MHz, D_2O)

4.1.5. SEF trihidratın SEM Görüntülemesi

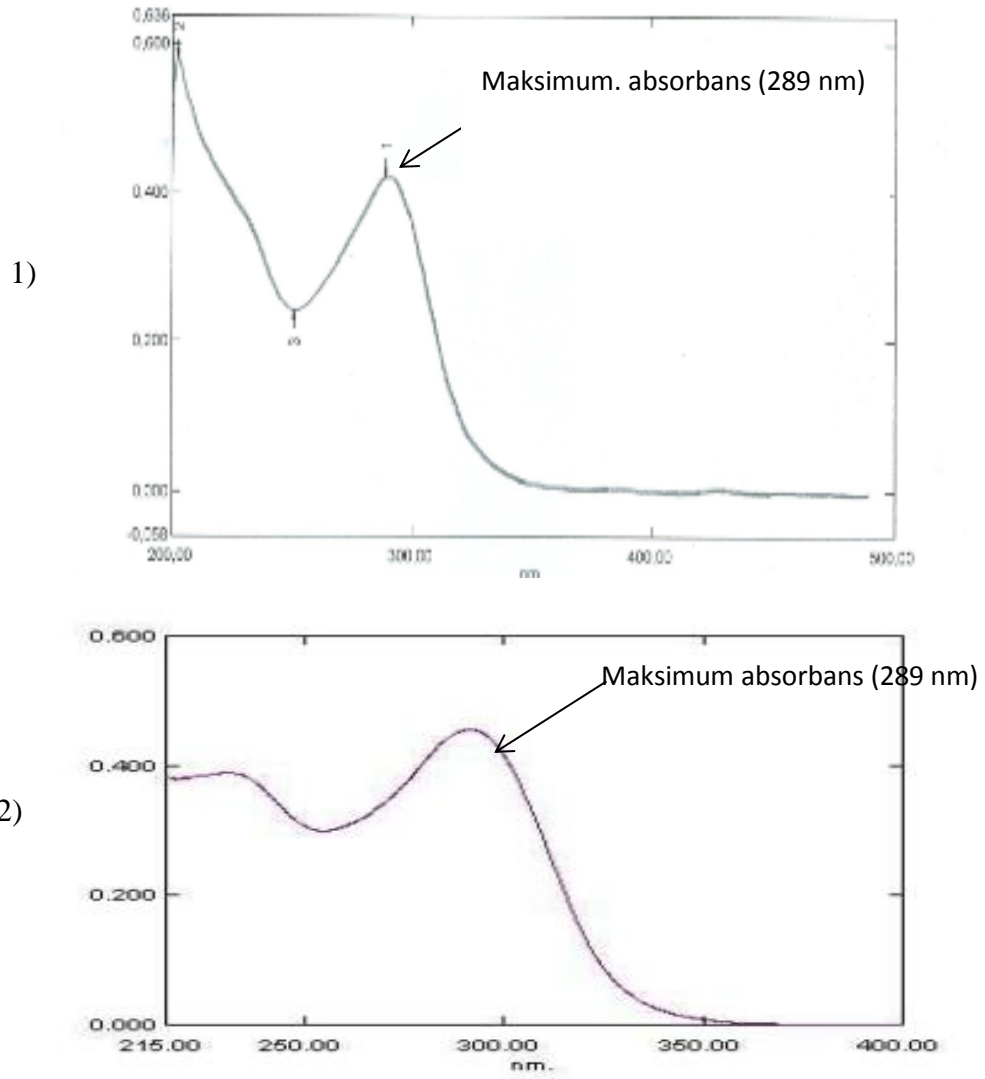
Bölüm 3.2.1.5'te açıklandığı şekilde yapılan SEM görüntüleme, SEF trihidratın kristal yapısının yanı sıra, hazırlanan inklüzyon komplekslerinin karşılaştırılmasında ve karakterizasyonunda da kullanılmıştır. SEF trihidratın SEM görüntüleri Şekil. 4.5'te verilmiştir. Bu SEM görüntülerinden SEF trihidratın kristal yapı gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.5. SEF trihidratın SEM görüntüsü (8000X).

4.1.6. SEF trihidratın UV Spektrumu

SEF trihidratın pH 7.2 fosfat tamponunda 1 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmış çözeltilerinin 200-400 nm arasında UV spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürle uyum içerisindedir (159). SEF trihidratın maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu 289 nm olarak bulunmuştur. SEF trihidratın UV spektrumu literatürle karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.6'da verilmiştir.



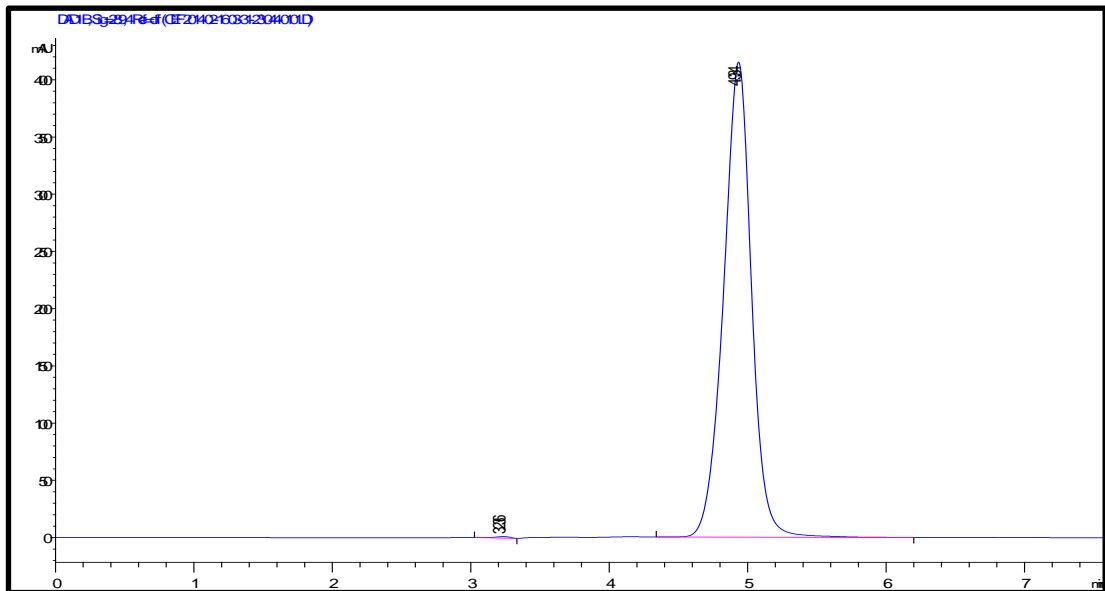
Şekil 4.6. SEF trihidratın UV spektrumunun literatürdeki UV spektrumuyla karşılaştırılmasını gösteren şekil 1)Deneyel olarak bulunan UV spektrumu 2)Literatürde yer alan UV spektrumu (160).

4.2. SEF trihidratın Miktar Tayini

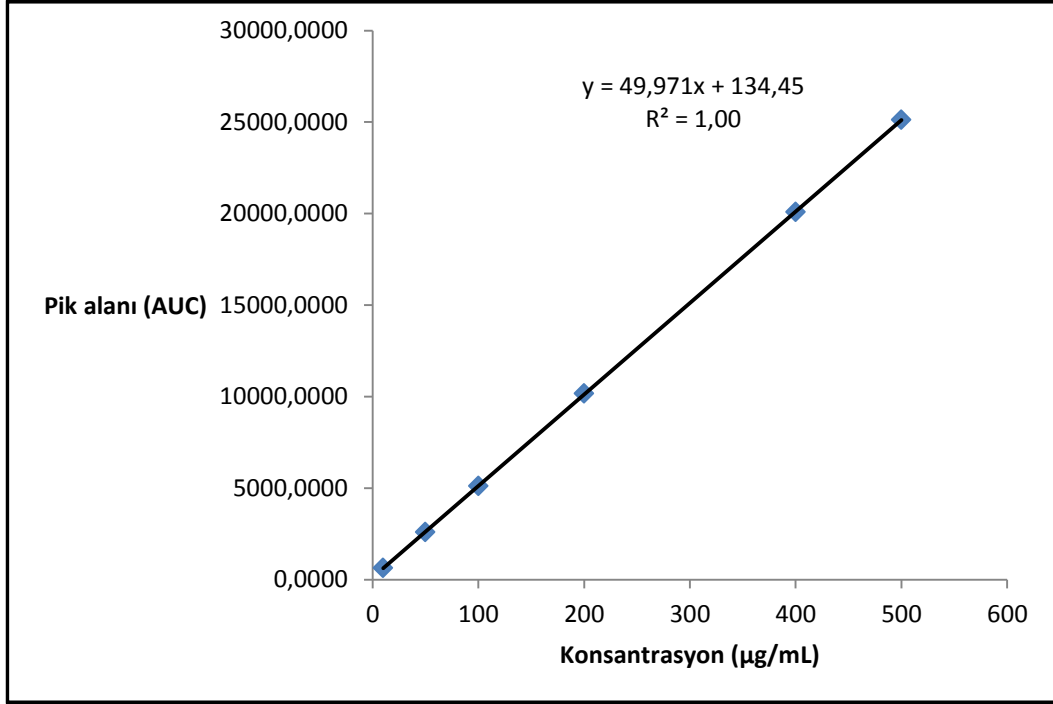
SEF trihidratın kantitatif analizi için, yapılan UV analizinden maksimum pik verdiği dalga boyunun 289 nm olduğu görülmüştür. Bu nedenle 289 nm’de çalışılmış ve Bölüm 3’te özellikleri verilen HPLC yöntemi valide edilmiştir. Diode Array (DAD) dedektörü ile yapılan analiz sonucu SEF trihidrata ait pik 5. dakikada saf olarak elde edilmiştir.

4.2.1. Kalibrasyon Denklemine Ait Bulgular

SEF trihidratın pH 7.2 fosfat tamponundaki kalibrasyonunda 10, 50, 100, 200, 400, 500 µg/mL olarak 6 konsantrasyon kullanılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında yapılacak olan faz çözünürlük ve çözünme çalışmaları sonucu elde edilecek örnek konsantrasyonlarını kapsayacak şekilde µg düzeyinde ve geniş bir aralıkta çalışılmıştır. Sonuçta elde edilen pik alanları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. SEF trihidrata ait kromatogram Şekil 4.7’de, kalibrasyon doğrusu (konsantrasyona karşı alan grafiği) Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. SEF trihidratın pH 7.2 Fosfat tamponundaki (100 µg/mL) HPLC kromatogramı.



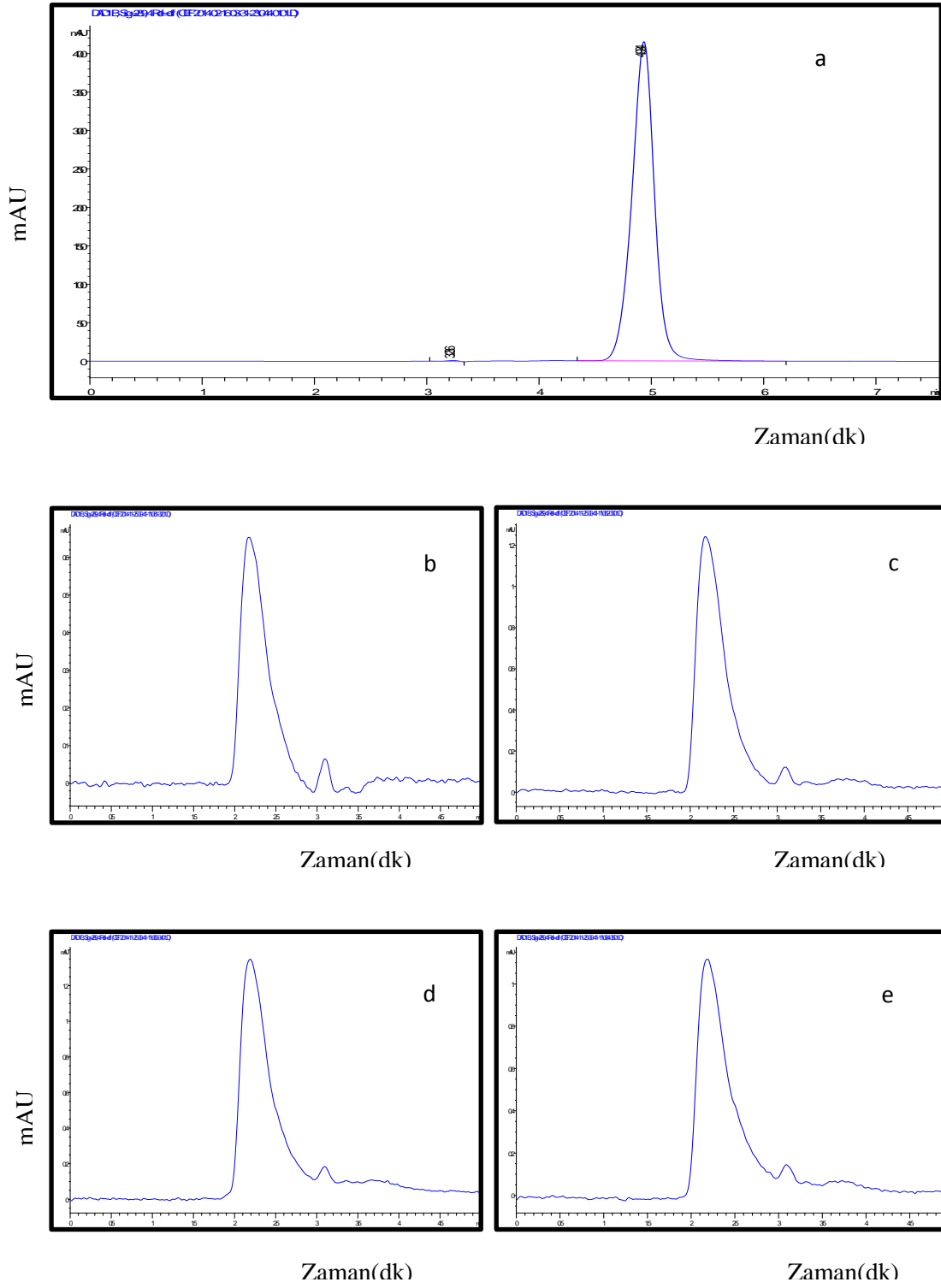
Şekil 4.8. SEF trihidrat kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon denklemi.

4.3. Analitik Yöntem Validasyonuna İlişkin Bulgular

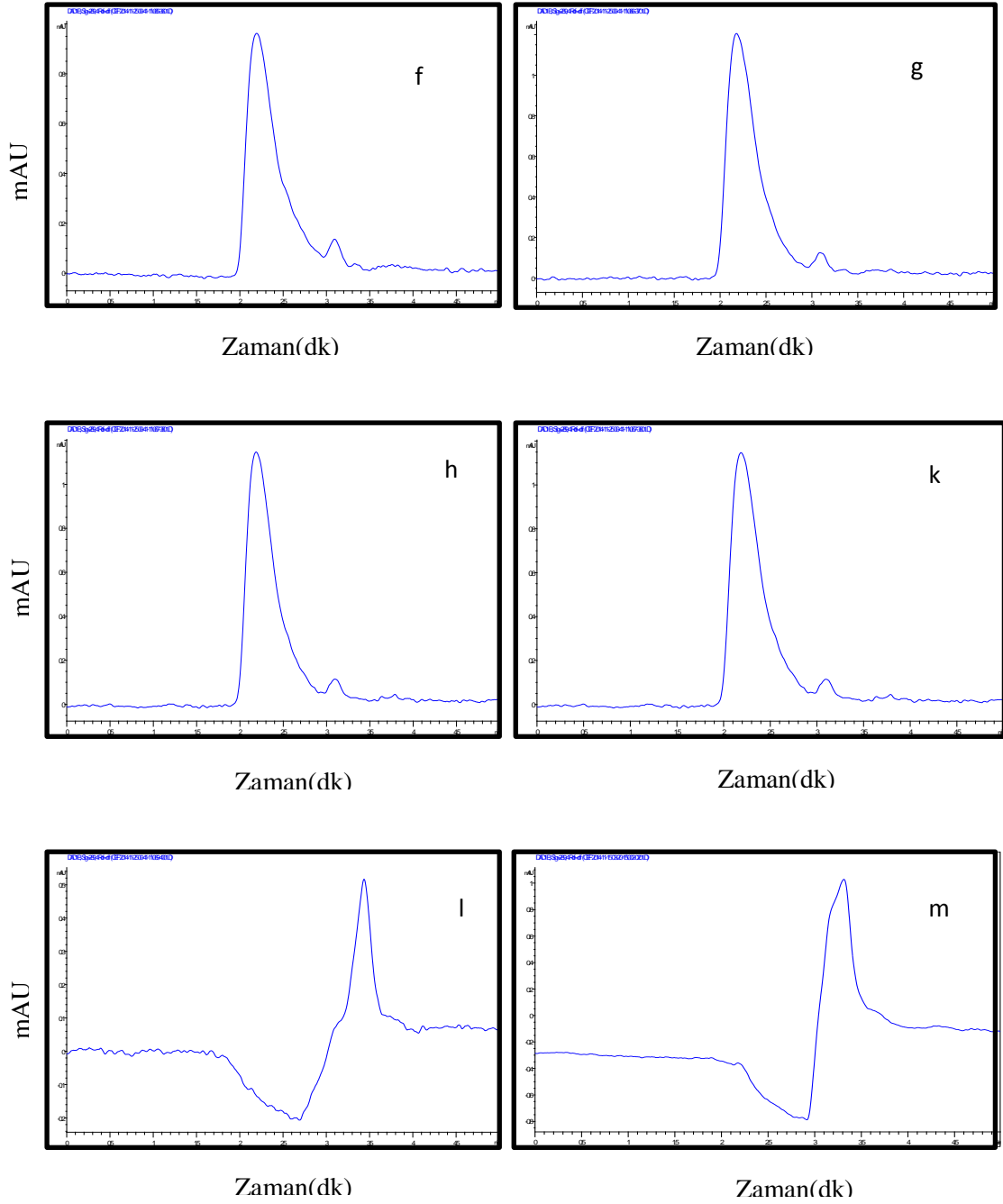
SEF trihidratın analitik yöntem validasyonu amacı ile validasyon parametrelerinden, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve tayin Edilebilirlik sınırı (LOQ), özgünlük ve stabilite incelenmiştir.

4.3.1. Özgünlük

Formülasyonlarda kullanılan α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, M- β -CD, tablet formülasyonunda kullanılan mısır nişastası, magnezyum stearat, avicel pH 102 çözeltilerinin, hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HBSS'nin, çözünme ortamı olarak kullanılan pH 7,2 fosfat tamponunun, etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC analizleri yapılmıştır. Bu maddelere ait spektrumların SEF trihidrat spektrumu ile karşılaştırılması ve herhangi bir çakışma olup olmadığı Şekil 4.9 ve 4.10'da görülmektedir. Tablo 4.2'de ise SEF trihidrat ve formülasyonlarda kullanılan diğer maddelere ilişkin alıkonma zamanları verilmektedir.



Şekil 4.9. SEF trihidrat ve kullanılan diğer maddelerin HPLC spektrumları (a:SEF trihidrat, b:HP- β -CD, c:M- β -CD, d: α -CD, e: β -CD)



Şekil 4.10. SEF trihidrat ve kullanılan diğer maddelerin HPLC spektrumları (f:γ-CD, g:Nişasta, h:Avicel pH 102, k:Magnezum stearat, l:HBSS, m:pH 7,2 Fosfat tamponu).

Tablo 4.2. SEF trihidrat ve formülasyonlarda kullanılan maddelerin alıkonma zamanları.

Madde	Alıkonma zamanı (dk)
SEF trihidrat	4.9
HP- β -CD	2.2
M- β -CD	2.2
α -CD	2.2
β -CD	2.2
γ -CD	2.2
Nişasta	2.2
Avicel pH 102	2.2
Magnezum stearat	2.2
HBSS	2.5
pH 7,2 Fosfat tamponu	2.5

4.3.2. Doğrusallık

Bölüm 3.2.2.2’de açıklandığı üzere, SEF trihidratın kalibrasyon denklemi için 6 farklı konsantrasyonda pH 7.2 fosfat tamponunda hazırlanan çözeltinin HPLC ile analizi sonucu elde edilen AUC değerleri grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon denkleminin yanısıra regresyon katsayısı da hesaplanmıştır. Regresyon katsayısı (r^2) 1,00 olarak saptanmıştır. Bu değer, SEF trihidratın kalibrasyon doğrusunu oluşturan noktaların doğrusal olduğunu göstermektedir. Bu durum, söz konusu tez çalışması kapsamında yapılacak olan testlerde, sonuçların güvenilirliği açısından önem arz etmektedir. Regresyon katsayısı 1’e yaklaşıkça, analizin güvenilirliği artmaktadır.

4.3.3. Doğruluk

SEF trihidratın miktar tayini için, Bölüm 3.2.2.4’te anlatıldığı gibi belirlenen yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneyler arası (günler arası; inter-assay) doğruluğunun gösterilmesi için düşük, orta ve yüksek 3 farklı konsantrasyonda (10, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 6 seri olarak çalışılmıştır. Yapılan HPLC analizi sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Geri kazanım yüzdeleri ve % VK.

	İlave edilen konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan konsantrasyon (µg/mL)	% VK	% Geri Kazanım
Gün içi	10	10,23	0,59	100,58
	200	200,88	0,44	100,44
	500	500,19	0,04	100,04
Günler arası	10	10,22	0,49	100,48
	200	199,20	0,40	99,60
	500	496,80	0,64	99,36

4.3.4. Kesinlik

Bölüm 3.2.2.5'te anlatıldığı gibi valide edilen yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik incelenmiştir.

a) Tekrarlanabilirlik

Kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 10, 200, 500 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için VK değerleri hesaplanmıştır. VK % 2'den küçük olması yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Tekrarlanabilirlik çalışmalarına ait bulgular Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4.SEF trihidrat miktar tayini yöntemi tekrarlanabilirlik sonuçları.

İlave Edilen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Pik alanı	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm SS$	(%)VK
10	634,986	10,016	10,012 \pm 0,007	0,072
	634,878	10,014		
	634,813	10,013		
	634,796	10,013		
	633,986	9,996		
	635,102	10,019		
200	10119,14	199,810	199,674 \pm 0,131	0,065
	10123,24	199,892		
	10110,34	199,634		
	10106,14	199,550		
	10106,24	199,552		
	10109,04	199,608		
500	24960,94	496,818	495,892 \pm 0,424	0,086
	24904,04	495,679		
	24907,64	495,751		
	24896,14	495,521		
	24909,64	495,791		
	24909,64	495,791		

b) Tekrar Elde Edilebilirlik

SEF trihidrat miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneyler arası (günler arası; inter-assay) kesinliğin değerlendirilmesi için yapılan deneyler açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. VK'nın % 2'den küçük bir değere sahip olması

yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir. Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarına ait bulgular Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. SEF trihidrat miktar tayini yöntemi için tekrar elde edilebilirlik sonuçları

	İlave edilen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% VK
Gün içi	10	10,23	1,73
	200	200,88	0,43
	500	500,19	0,67
Günler arası	10	10,22	1,49
	200	199,20	0,50
	500	496,80	0,72

4.3.5. Gözlenebilirlik Sınırı (LOD) ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (LOQ) Değerlerinin Saptanması

Bölüm 3.2.2.6'da belirtildiği gibi, Sinyal/Gürültü oranına göre SEF trihidrat numunesi için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,373 $\mu\text{g/mL}$ (S/N=3) ve 1,24 $\mu\text{g/mL}$ (S/N=10) olarak bulunmuştur.

4.3.6. Stabilite

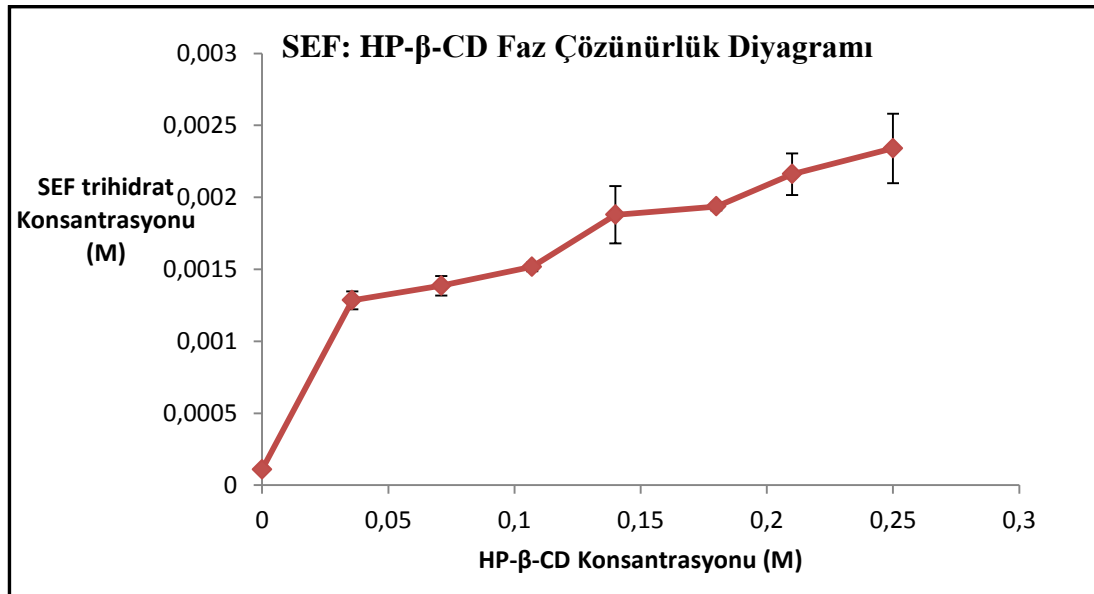
Analizi yapılan SEF trihidrat çözeltisi, 24 saat boyunca dayanıklı bulunmuştur. 24 saatlik stabilite bulguları Tablo 4.6'de verilmiştir. Herhangi bir bozunma ürününe ait pike rastlanmamıştır.

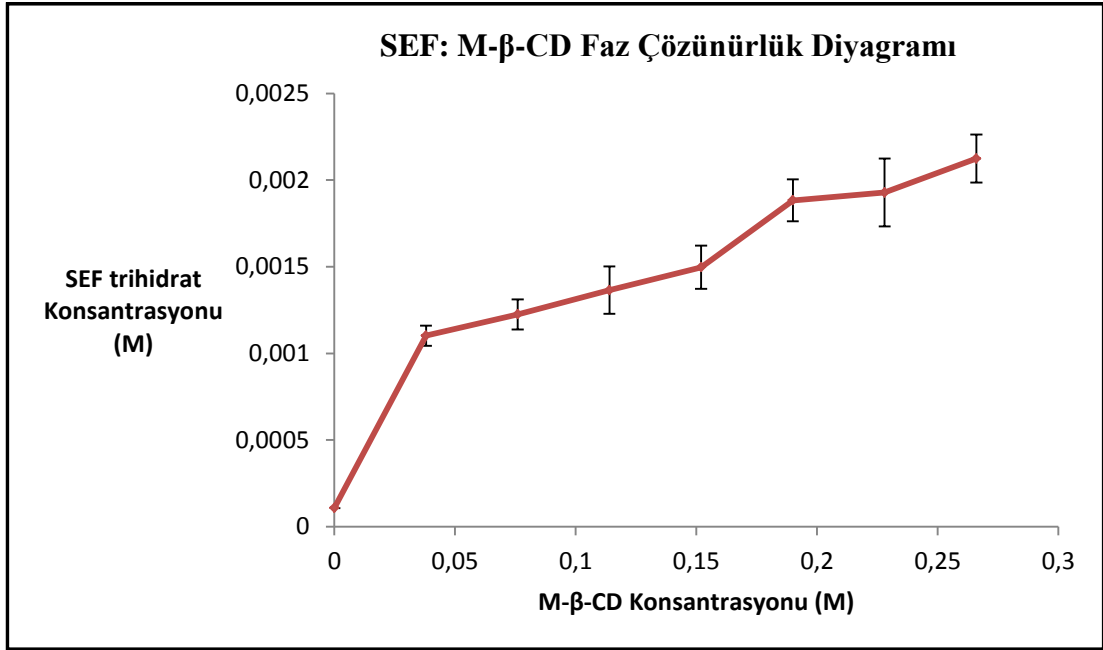
Tablo 4.6. SEF trihidrat miktar tayini yöntemi için stabilite sonuçları (n=6).

Ölçüm zamanı (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan konsantrasyon ($X \pm SS$)	% Geri kazanım	% VK
0	500	500,18 \pm 3,3	100,04	0,04
24	500	497,31 \pm 3,5	99,46	0,54

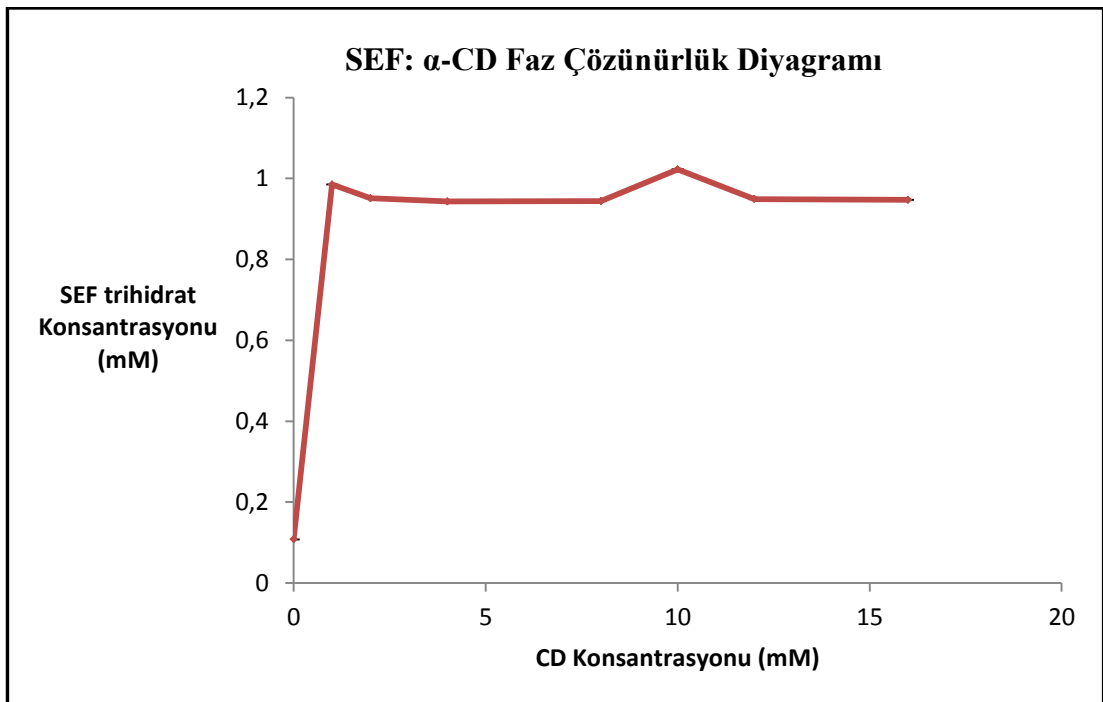
4.4. Faz Çözünürlük Çalışmaları

SEF trihidrat farklı konsantrasyonlardaki farklı siklodekstrin türevlerinin (α -CD, β -CD, γ -CD, M- β -CD ve HP- β -CD) fonksiyonu olarak çözünürlüğündeki değişim faz çözünürlük çalışmaları ile incelenmiştir. Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15'te 5 CD türevi için faz çözünürlük diyagramları verilmiştir. M- β -CD ve HP- β -CD için faz çözünürlük diyagramları A_L tipinde iken α -CD, β -CD ve γ -CD için faz çözünürlük diyagramları B tipindedir. A_L tipi diagram, ilaç çözünürlüğü CD konsantrasyonu ile orantılı olarak artan tip diyagram iken B tipi eğriler ise suda sınırlı çözünürlüğü göstermektedirler.

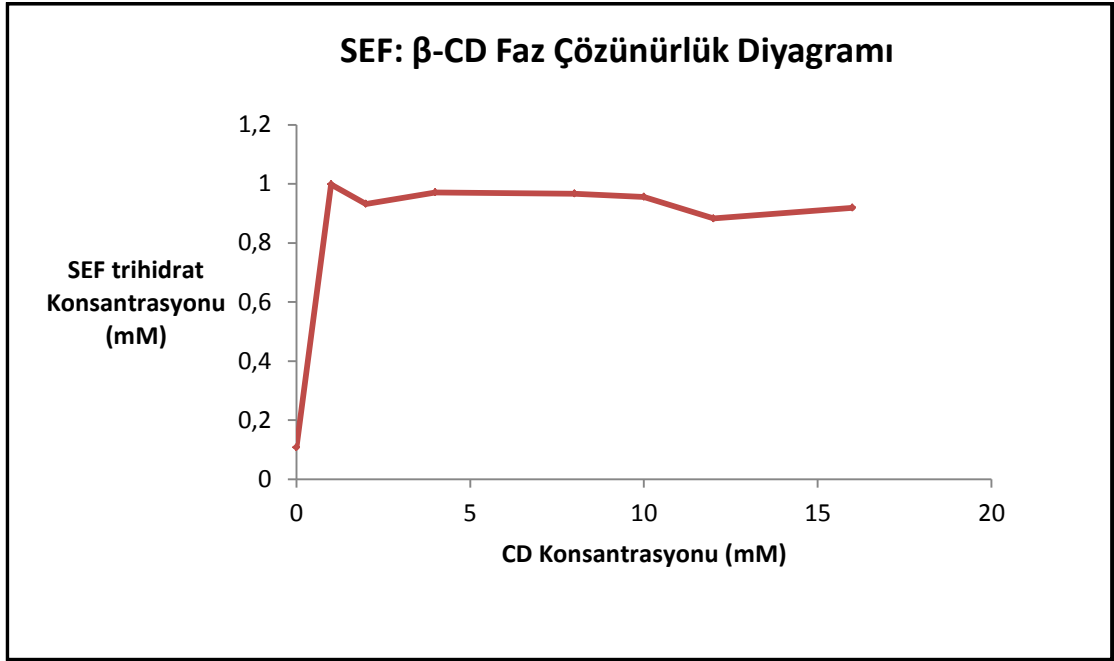
Şekil 4.11. SEF trihidratın HP- β -CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı (n=3, \pm SS).



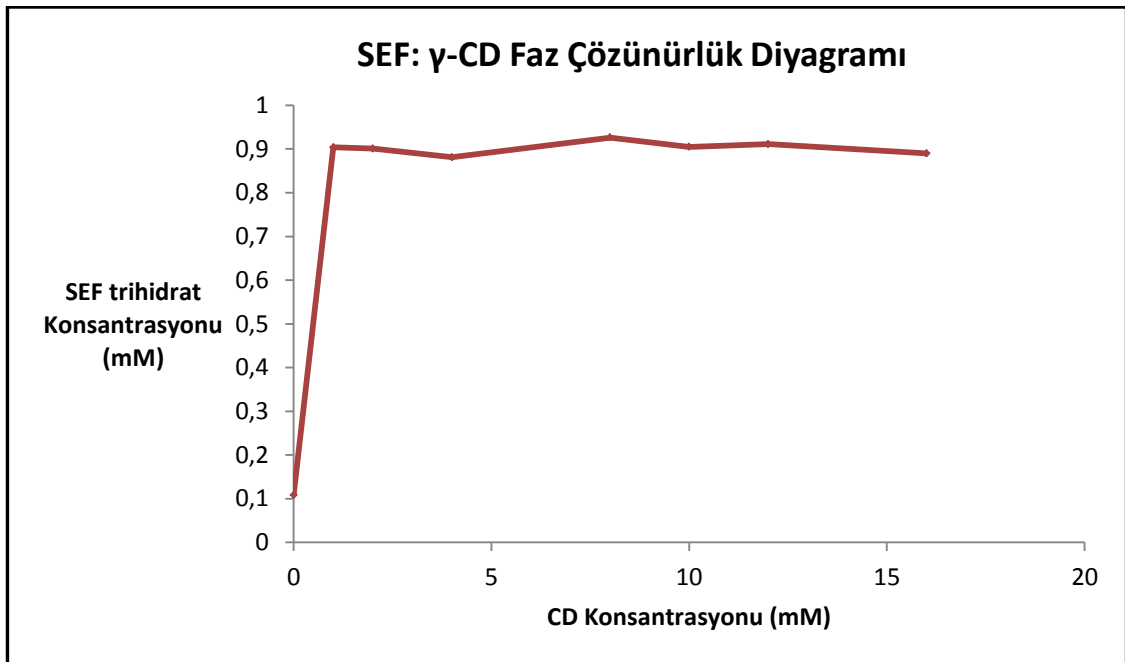
Şekil 4.12. SEF trihidratın M- β -CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı (n=3, \pm SS).



Şekil 4.13. SEF trihidratın α -CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı (n=3, \pm SS).



Şekil 4.14. SEF trihidrat β -CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı (n=3, \pm SS).



Şekil 4.15. SEF trihidratın γ -CD ile sudaki faz çözünürlük diyagramı (n=3, \pm SS).

Tablo 4.7’de verilmiş olan sonuçlar incelendiğinde, M- β -CD ve HP- β -CD için konsantrasyondaki artışla SEF trihidrat çözünürlüğünün arttığı, α -CD, β -CD ve γ -CD için ise belirli bir konsantrasyona kadar arttığı sonrasında sabit kaldığı görülmektedir. En yüksek çözünürlük artışı HP- β -CD ile sağlanmıştır. 1:1 kompleks tipi faz çözünürlük eğrisinin eğiminden yararlanılarak hesaplanılan asosiyasyon sabiti ($K_{1:1}$) değerleri Tablo 4.7’de gösterilmektedir. $K_{1:1}$ hesaplandıktan sonra siklodekstrinler için daha önce bahsedilen kompleks etkinliği (KE) hesaplanmıştır.

Tablo 4.7. SEF trihidratın çeşitli CD çözeltilerindeki çözünürlükleri.

Siklodekstrin	Siklodekstrin konsantrasyonu	SEF çözünürlüğü ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SS}$, n=3)	Çözünürlükteki artış katı
HP- β -CD	0	55,1	-
	% 5	978,4 \pm 31,40	17,76
	% 10	1054,7 \pm 34,70	19,14
	% 15	1115,0 \pm 15,19	20,24
	% 20	1430,2 \pm 101,33	25,96
	% 25	1473,9 \pm 13,49	26,75
	% 30	1644,6 \pm 73,55	29,85
	% 35	1781,4 \pm 122,58	32,33
	$K=23378,3 \text{ M}^{-1}$		
	KE=2,52		
	$y = 1,6558x + 0,5901$		
	$R^2 = 0,9933$		

Tablo 4.7. (Devam) SEF trihidratın çeşitli CD çözeltilerindeki çözünürlükleri

Siklodekstrin	Siklodekstrin konsantrasyonu	SEF çözünürlüğü ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SS}$, n=3)	Çözünürlükteki artış katı	
M- β -CD	0	55,1	-	
	% 5	838,9 \pm 29,33	15,23	
	% 10	932,5 \pm 44,40	16,92	
	% 15	1038,7 \pm 69,27	18,85	
	% 20	1139,8 \pm 63,40	20,69	
	% 25	1433,5 \pm 61,64	26,02	
	% 30	1467,5 \pm 99,42	26,62	
	% 35	1616,4 \pm 70,58	29,33	
	K=21287,4 M ⁻¹			
	KE=2,30			
y = 1,7698x + 0,4902				
R ² = 0,9994				
α -CD	0	55,1	-	
	1 mM	749,8 \pm 15,00	13,61	
	2 mM	723,6 \pm 9,65	13,13	
	4 mM	718,1 \pm 4,19	13,03	
	8 mM	718,7 \pm 25,09	13,04	
	10 mM	778,10 \pm 23,74	14,12	
	12 mM	722,7 \pm 18,53	13,12	
	16 mM	721,1 \pm 5,02	13,09	
	K=7394 M ⁻¹			
	KE=0,79			
y = 0,444x + 0,055				
R ² = 1				

Tablo 4.7. (Devam) SEF trihidratın β -CD ve γ -CD çözeltilerindeki çözünürlükleri

Siklodekstrin	Siklodekstrin konsantrasyonu	SEF çözünürlüğü ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SS}$, n=3)	Çözünürlükteki artış katı	
β -CD	0	55.1	-	
	1 mM	759,9 \pm 32,77	13,79	
	2 mM	710,2 \pm 8,84	12,89	
	4 mM	739,3 \pm 18,98	13,42	
	8 mM	736,5 \pm 14,20	13,37	
	10 mM	727,8 \pm 11,48	13,21	
	12 mM	672,1 \pm 7,14	12,20	
	16 mM	699,8 \pm 8,44	12,70	
	K=7606 M ⁻¹			
	KE = 0,82			
y = 0,451x + 0,055				
R ² = 1				
γ -CD	0	55,1	-	
	1 mM	687,7 \pm 1,64	12,48	
	2 mM	685,5 \pm 19,59	12,44	
	4 mM	670,3 \pm 5,51	12,16	
	8 mM	704,6 \pm 8,87	12,79	
	10 mM	688,6 \pm 6,92	12,50	
	12 mM	693,8 \pm 11,64	12,59	
	16 mM	677,1 \pm 5,17	12,29	
	K=6250 M ⁻¹			
	KE=0,67			
y= 0,403x + 0,055				
R ² = 1				

4.5. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Yapılan faz çözünürlük çalışmaları sonucunda, α -CD, β -CD ve γ -CD ile konsantrasyonun belirli bir konsantrasyona kadar arttığı ve sonrasında artış göstermediği görülmüştür. Bu nedenle, çalışmalara HP- β -CD ve M- β -CD ile devam edilmiştir. Fakat çözünme çalışmaları ve permeabilite çalışmalarında da α -CD, β -CD ve γ -CD denenerek, faz çözünürlük çalışması sonuçlarının güvenilirliği incelenmiştir.

4.5.1. İnküzyon Komplekslerinin FTIR Spektrumları

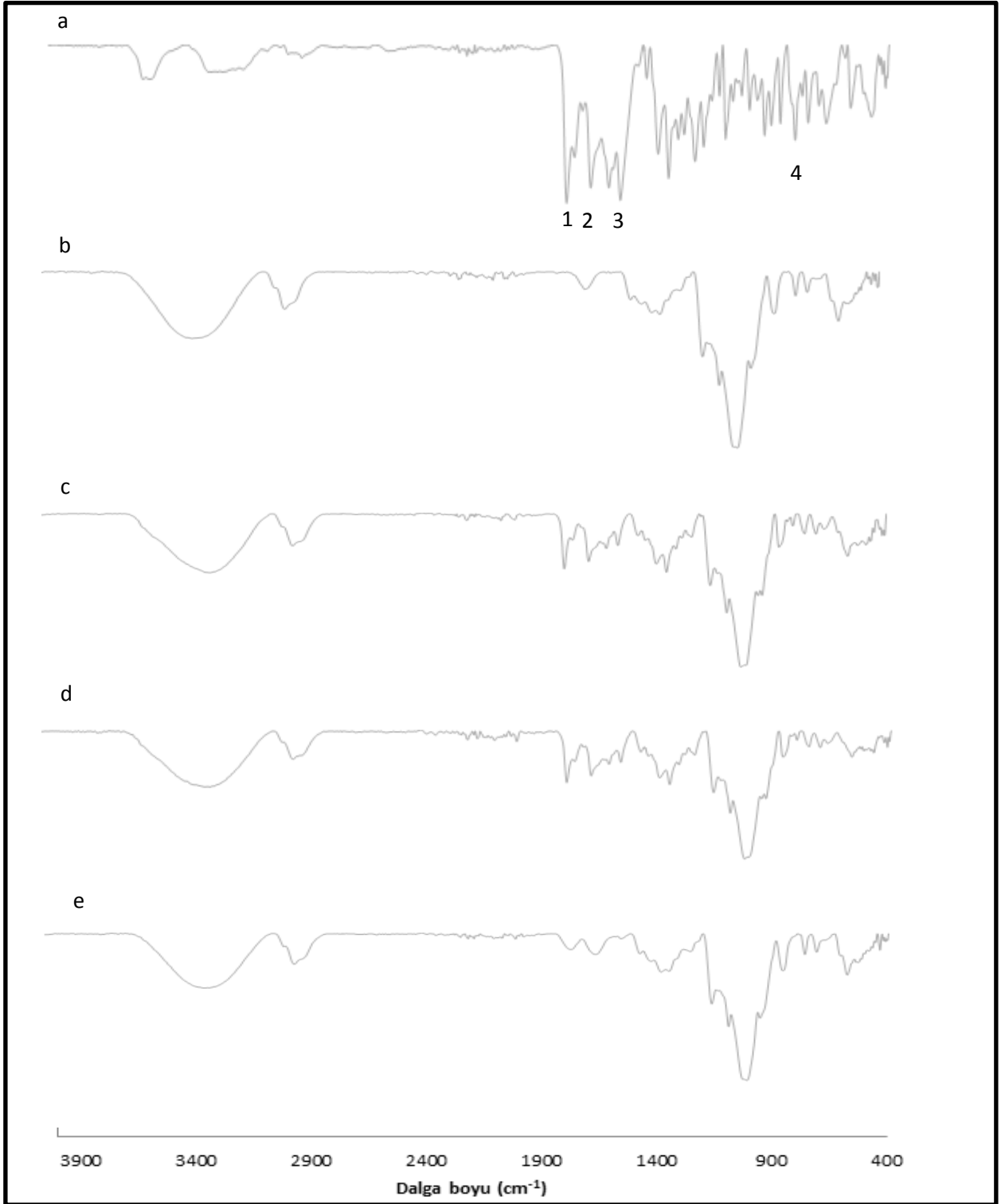
Bölüm 3'te açıklanan yöntem ile hazırlanan SEF trihidratın siklodekstrinler ile fiziksel karışımlarının ve inküzyon komplekslerinin FTIR spektrumları, Bruker IFS 66/S spektrofotometresinde, 4000-400 cm^{-1} dalga boyları arasında gerçekleştirilmiştir. FTIR analizi SEF:CD fiziksel karışımı ve inküzyon kompleksi oluşumuna bağlı olarak, SEF trihidrata ait karakteristik piklerdeki değişimin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Formülasyonların FTIR spektrumlarında SEF trihidrata ait aşağıdaki karakteristik piklerdeki değişiklikler incelenmiştir. Bu karakteristik pikler;

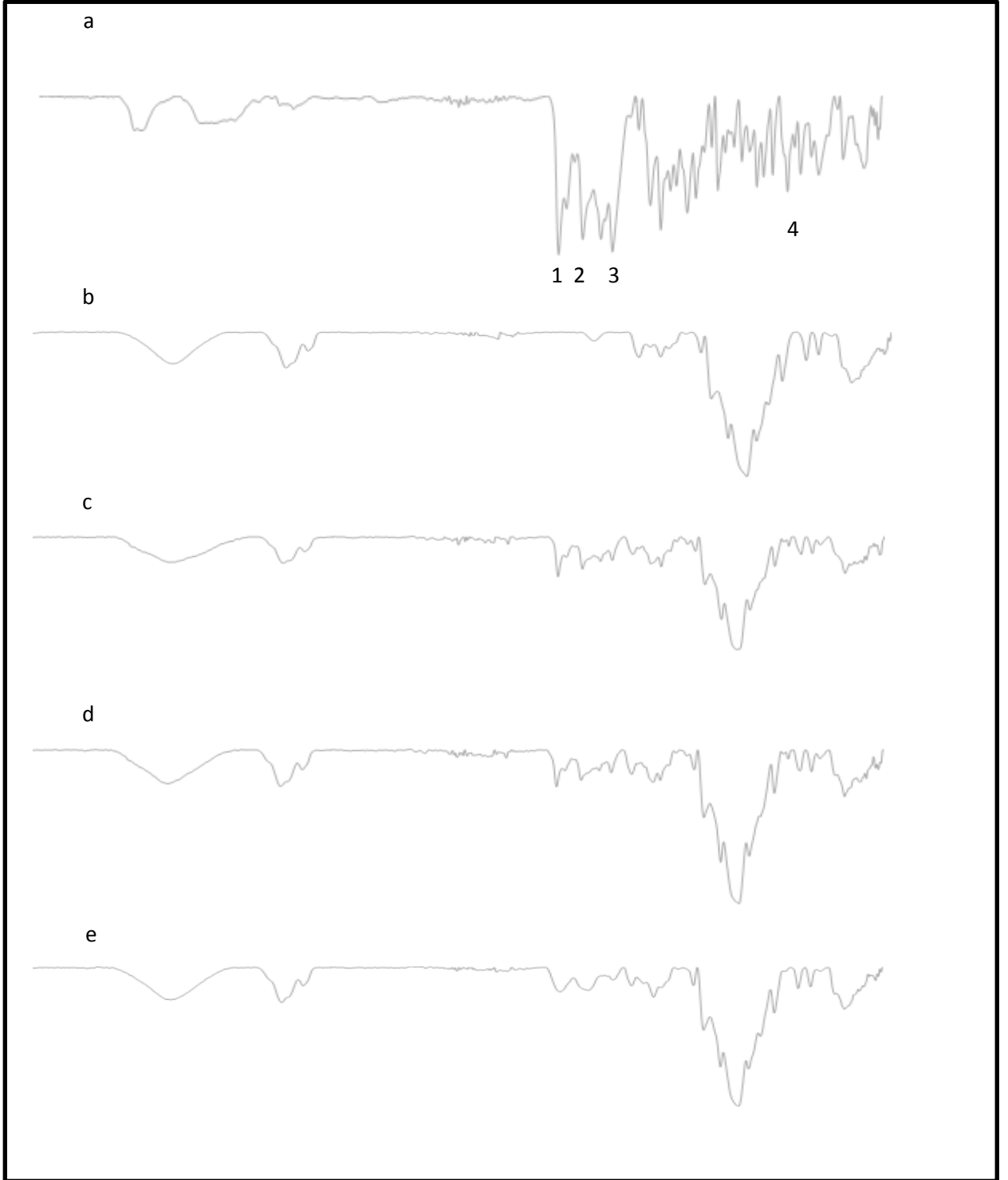
- 1650-1740 cm^{-1} C=O asit bağlarına ait gerilme titreşimleri
- 1640-1690 cm^{-1} C=O amid bağlarına ait gerilme titreşimleri
- 1590-1640 cm^{-1} C=C çifte bağ gerilme titreşimleri
- 710-570 cm^{-1} C-S bağına ait gerilme titreşimleridir.

HP- β -CD, M- β -CD ve bunların SEF trihidrat ile fiziksel karışım, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemleri ile oluşturulmuş inküzyon komplekslerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.

SEF trihidratın siklodekstrinlerle olan inküzyon komplekslerinde karakteristik piklerinde küçülme gözlenmiştir. FTIR sonuçları arasında inküzyon kompleksi hazırlama yöntemlerinden yoğurma yöntemi ile SEF trihidrata ait piklerin tamamen kaybolduğu görülmektedir. Fakat CD türevi açısından belirgin bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4.16. a:SEF trihidrat, b:HP-β-CD, c:SEF:HP-β-CD fiziksel karışımı, d:SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma), e: SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) FTIR spektrumları (1: C=O (asit) , 2: C=O (amid), 3: C=C, 4: C-S)



Şekil 4.17. a:SEF trihidrat, b:M-β-CD, c:SEF:M-β-CD fiziksel karışımı, d:SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma), e:SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) FTIR spektrumları (1: C=O (asit) , 2: C=O (amid), 3: C=C, 4: C-S)

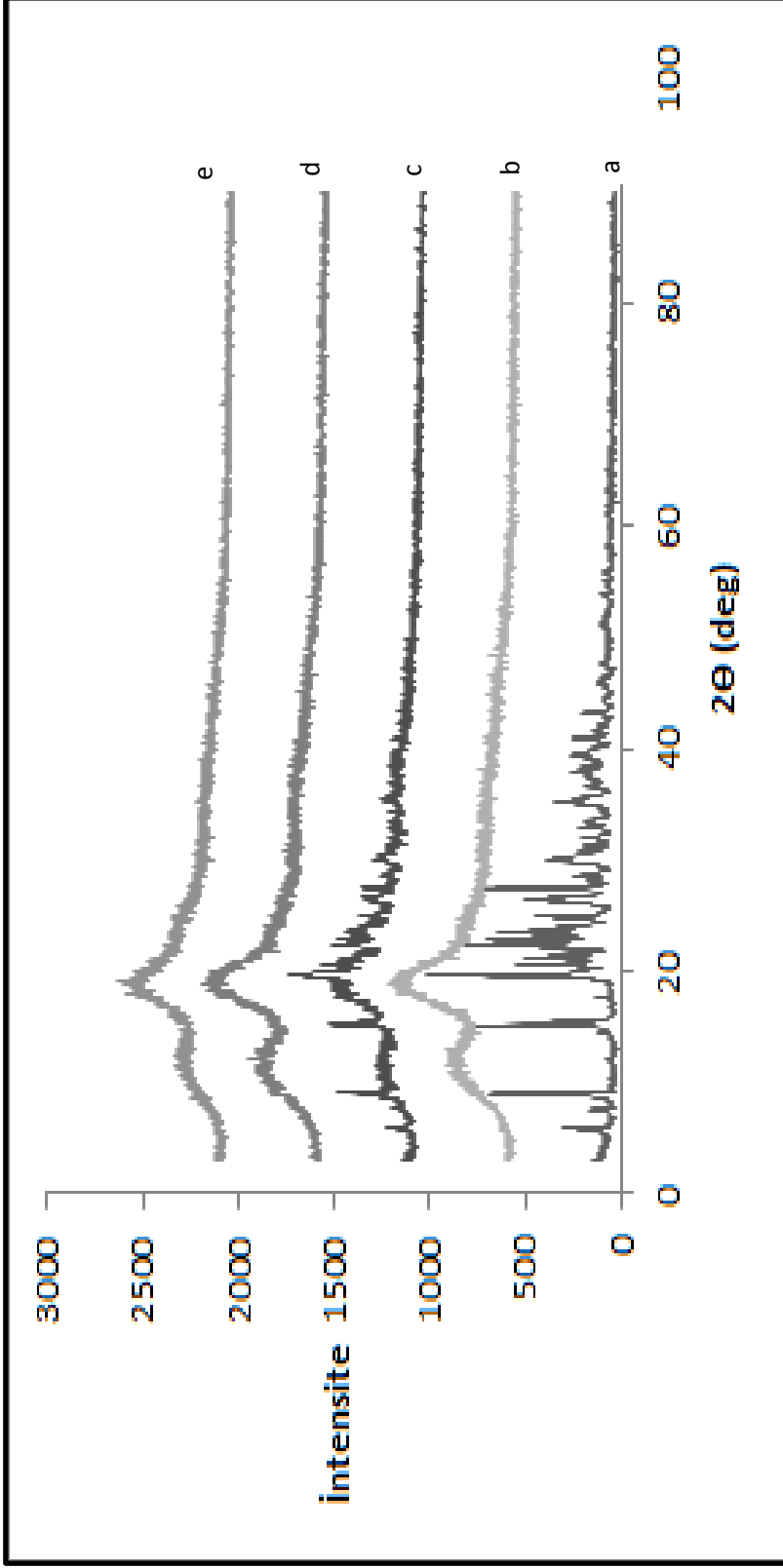
4.5.2. İnküzyon Komplekslerinin X-Işını Kırınımı Analizleri

Hazırlanan komplekslerin ve fiziksel karışımların X-ışını kırınımı analizleri Bölüm 3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

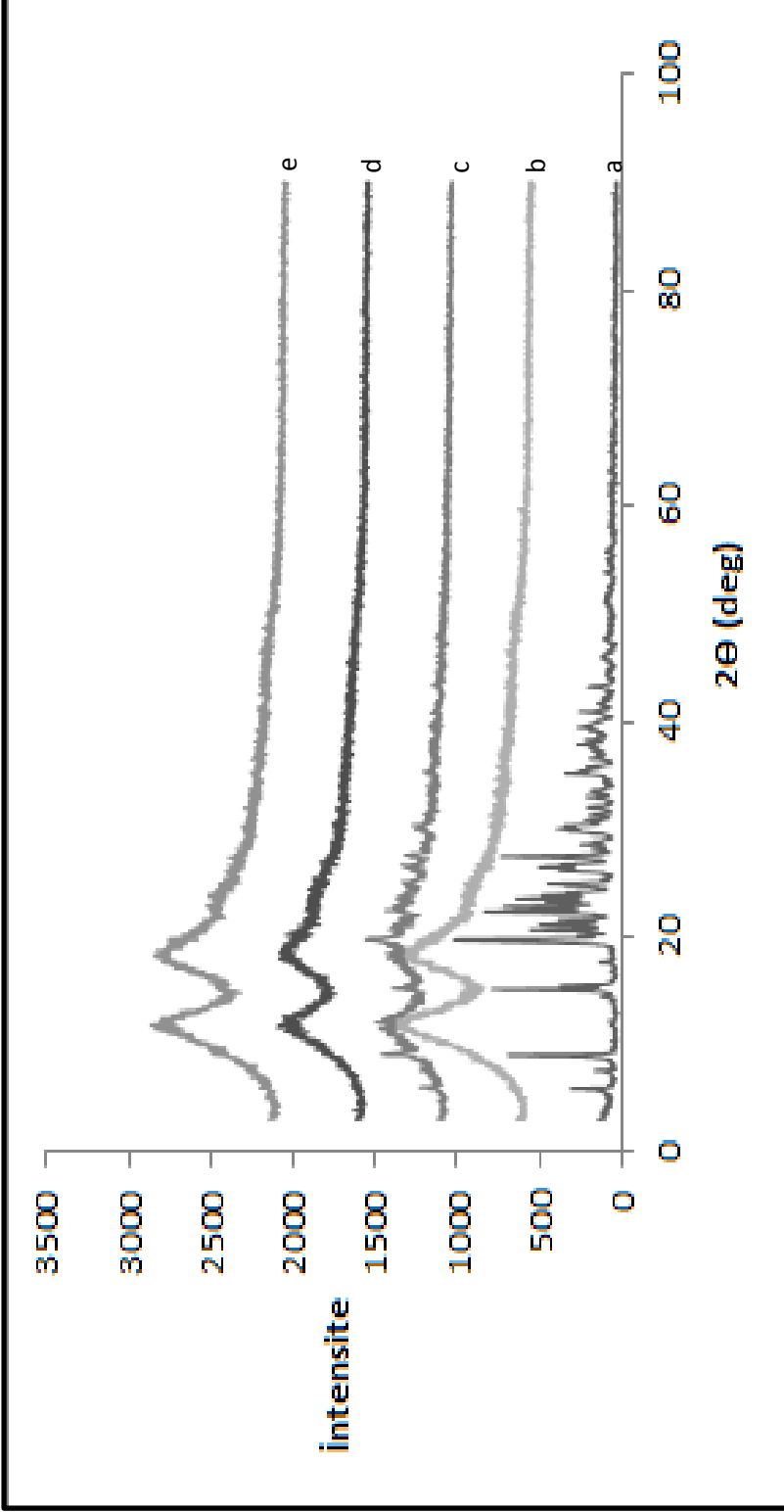
Bu analiz SEF trihidrat ile hazırlanan fiziksel karışım ve inküzyon komplekslerinde etkin maddenin kristal formunun bulunup bulunmadığının veya kristal yapıda azalma olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla hazırlanan formlasyonların X-ışını kırınımı kristalogramları Şekil 4.18 ve 4.19'da verilmiştir.

İlaca ait kristal yapı piklerinde, hazırlanan bütün CD inküzyon komplekslerinde ve fiziksel karışımlarda belirgin bir azalma görülmektedir. Fiziksel karışımdaki kristal yapı piklerindeki azalma, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemlerine göre daha azdır.



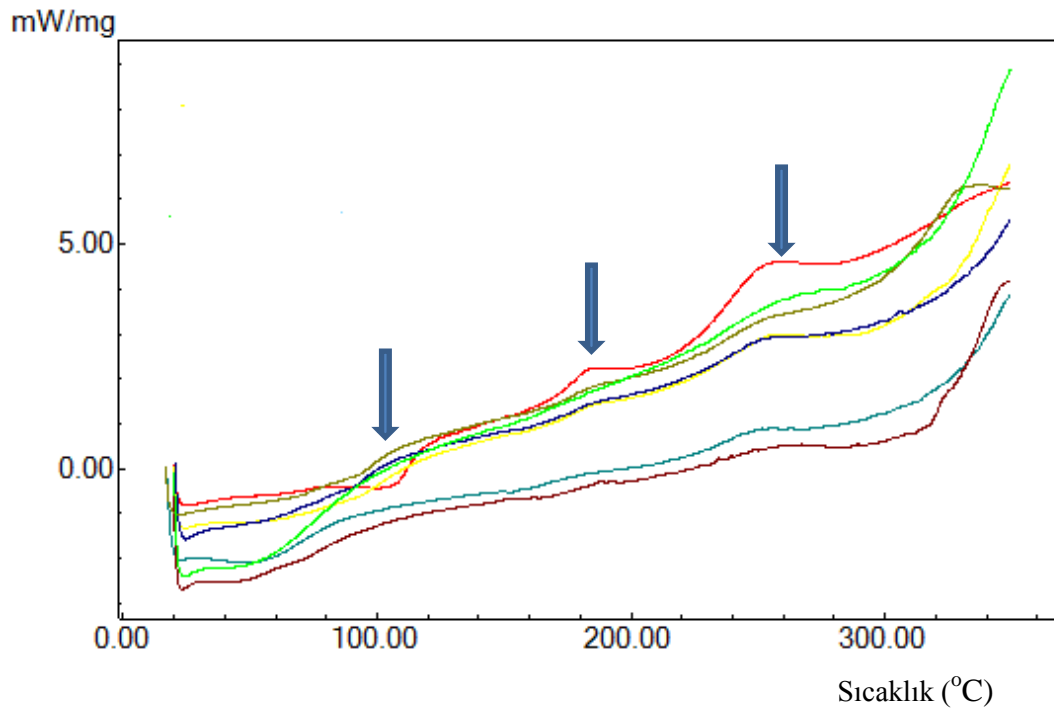
Şekil 4.18. a:SEF trihidrat, b:HP-β-CD, c:SEF:HP-β-CD fiziksel karışımı, d:SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma), e: SEF:HP-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) X-ışını kristalogramları



Şekil 4.19. a:SEF trihidrat, b:M-β-CD, c:SEF:M-β-CD fiziksel karışımı, d:SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi (birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma), e:SEF:M-β-CD inklüzyon kompleksi(yoğurma yöntemi) X-ışını kristalogramları

4.5.3. İnküzyon Komplekslerinin DSC Analizleri

Formülasyonların diferansiyel taramalı kalorimetrik analizleri Bölüm 3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, inküzyon kompleksi oluşumunun, SEF trihidratın erime noktası üzerine olan etkisinin incelenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. SEF trihidrat 104°C, 180°C ve 250°C'de 1 ekzotermik ve 2 endotermik pik vermektedir (158). Bu pikler Şekil 4.20'de gösterilmiştir. İkinci endotermik pik (250°C), SEF trihidratın literatürle uyumlu olan erime pikidir. Siklodekstrinler ve SEF trihidrat arasında fiziksel karışım, yoğurma ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemleriyle hazırlanan inküzyon komplekslerine ilişkin piklerde, SEF trihidrata ait erime pikinin kaybolduğu görülmektedir (155).



Şekil 4.20. Bütün inküzyon kompleksleri ve fiziksel karışımların DSC termogramları

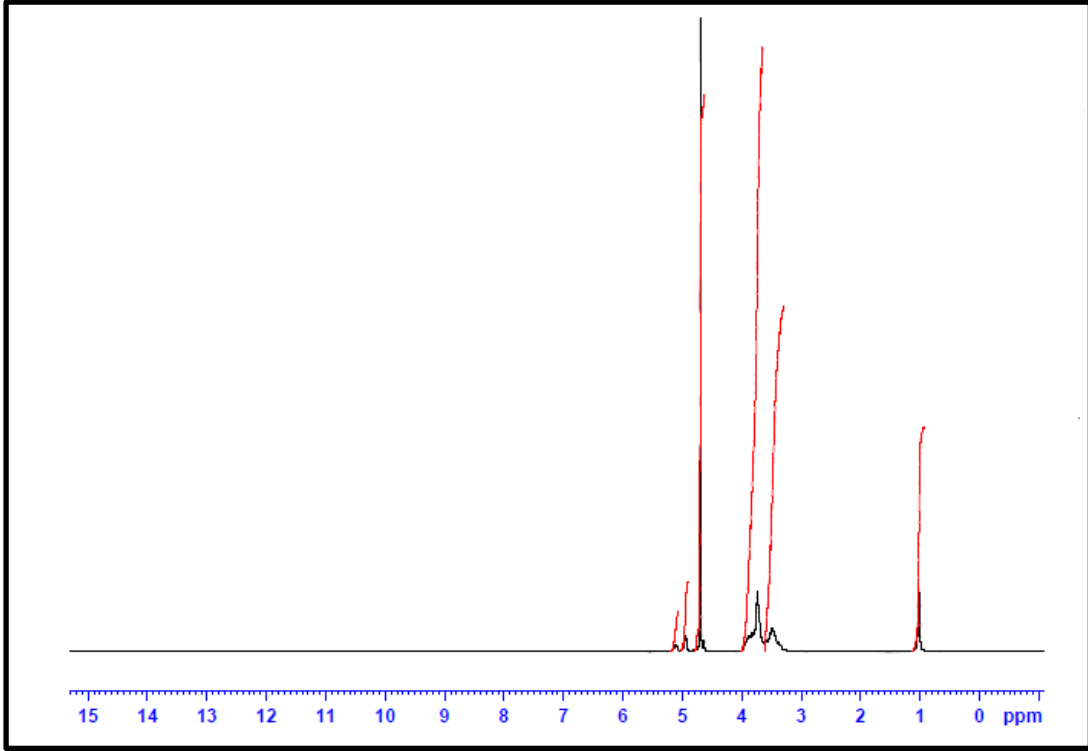
4.5.4. İnküzyon Komplekslerinin ¹H-NMR Spektrumu

SEF trihidrat, siklodekstrinler, fiziksel karışımlar ve inküzyon komplekslerinin ¹H-NMR spektrumları, Bölüm 3'te anlatıldığı şekilde

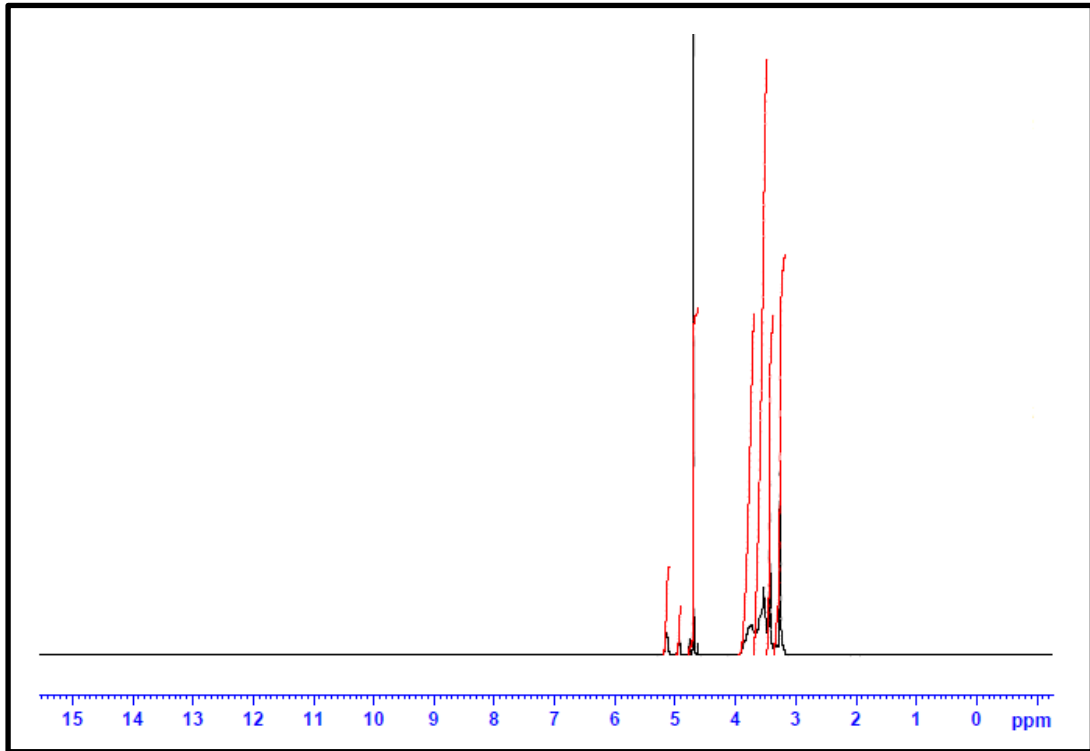
gerçekleştirilmiştir. Siklodekstrin yapısındaki 6 adet protonun, kompleks oluşumuna bağlı olarak spektrumdaki kaymaları incelenmiştir. Kavitenin iç kısmında yer alan H3 ve H5 protonlarındaki kaymalar, kompleks oluşumuyla ilgili önem arz etmektedir. Tablo 4.8’de siklodekstrin protonlarının inklüzyon kompleksi halinde ¹H-NMR spektrumunda kayma değerleri görülmektedir. SEF: HP-β-CD ve SEF: M-β-CD için de, H3 ve H5 protonlarında anlamlı kayma gözlenmiştir. H3 protonunda bu kaymanın her iki siklodekstrin türevi için de yoğurma yönteminde daha fazla olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.21 – Şekil 4.28’de HP-β-CD, M-β-CD, SEF: HP-β-CD fiziksel karışımı, SEF: HP-β-CD birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri, SEF: HP-β-CD yoğurma yöntemi ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri, SEF: M-β-CD fiziksel karışımı, SEF: M-β-CD birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri, SEF: M-β-CD yoğurma yöntemi ile hazırlanan inklüzyon komplekslerine ait ¹H-NMR spektrumları verilmiştir.

Tablo 4.8. Siklodekstrin protonlarının inklüzyon kompleksi halinde $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda kayma değerleri (ppm)

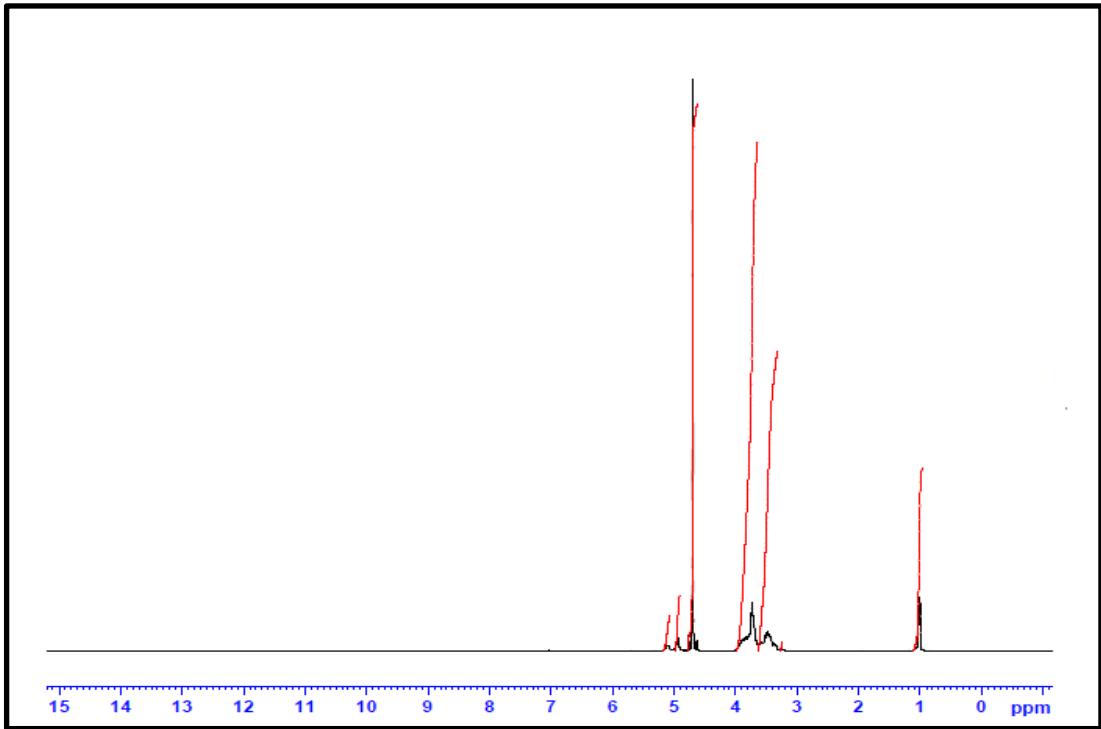
	HP-β-CD	SEF: HP-β-CD Birlikte Çöktürme Birlikte Dondurarak Kurutma	SEF: HP-β-CD Yoğurma
H1	5.114	5.113	5.102
H2	3.799	3.797	3.794
H3	3.895	3.893	3.891
H4	3.742	3.740	3.736
H5	3.862	3.860	3.857
H6	3.831	3.829	3.826
	M-β-CD	SEF: M-β-CD Birlikte Çöktürme Birlikte Dondurarak Kurutma	SEF: M-β-CD Yoğurma
H1	5.145	5.143	5.137
H2	3.594	3.595	3.595
H3	3.849	3.850	3.843
H4	3.561	3.561	3.547
H5	3.745	3.747	3.744
H6	3.674	3.675	3.670



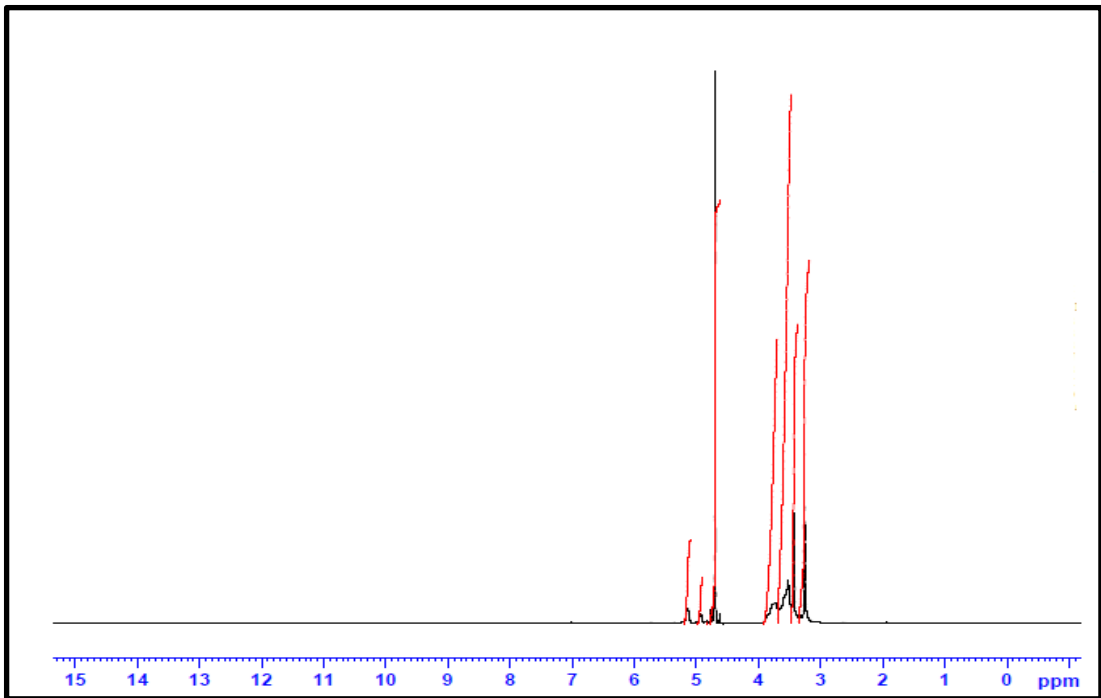
Şekil 4.21. HP- β -CD'e ait ^1H -NMR spektrumu (300 MHz, D_2O).



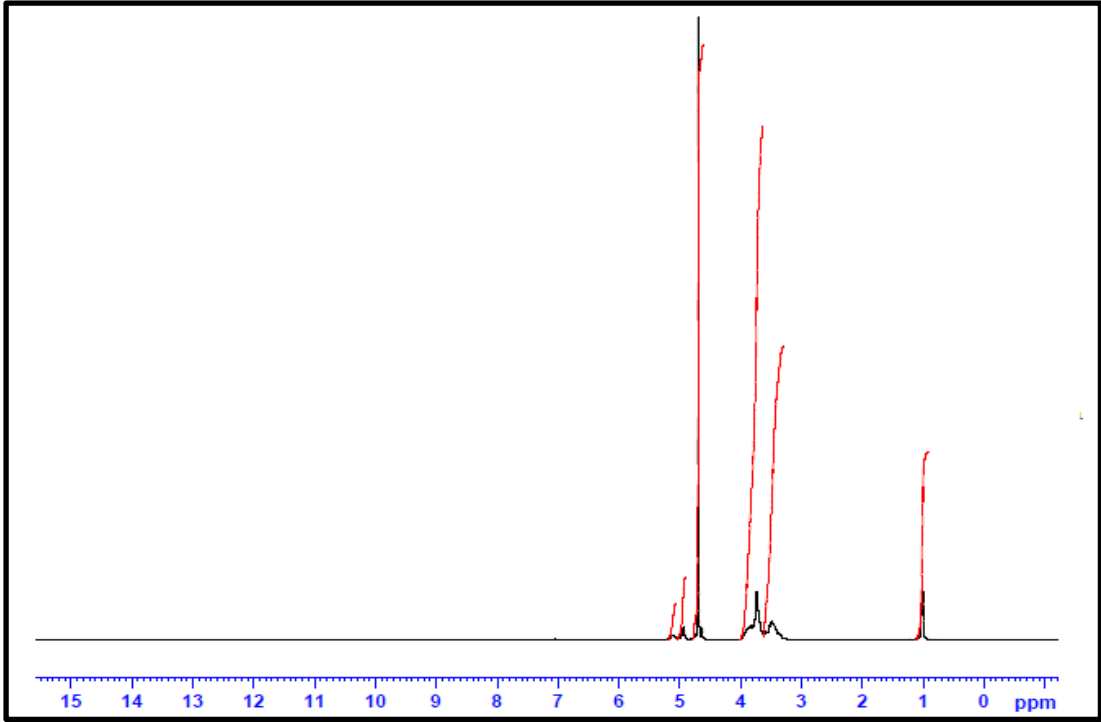
Şekil 4.22. M- β -CD'e ait ^1H -NMR spektrumu (300 MHz, D_2O).



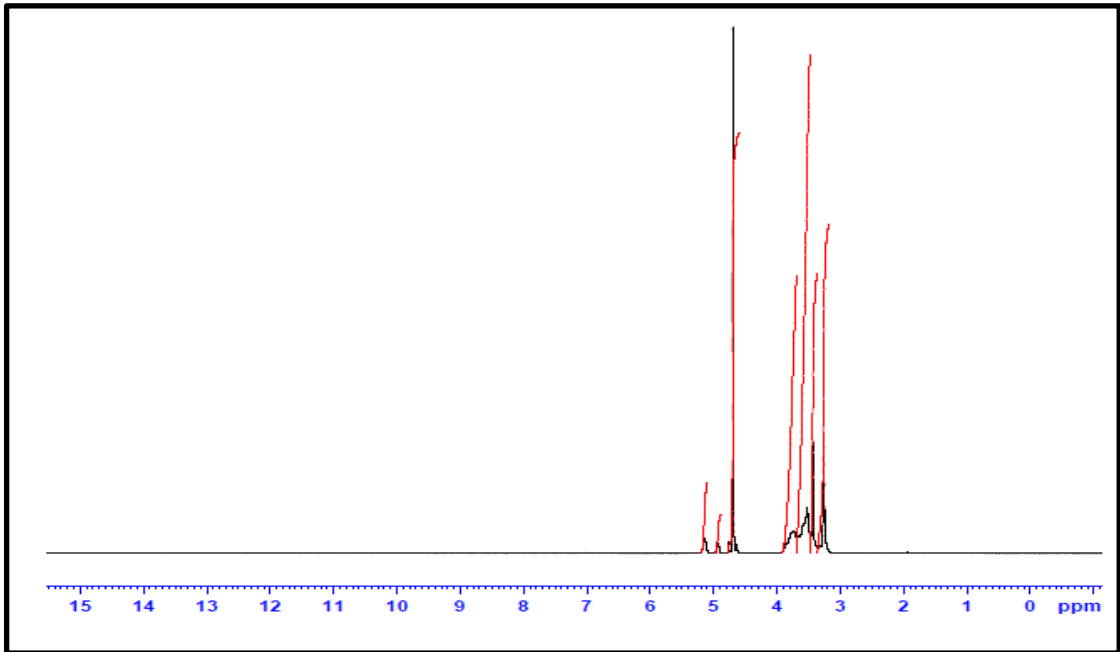
Şekil 4.23. SEF: HP-β-CD fiziksel karışımına ait ^1H -NMR spektrumu (300 MHz, D_2O).



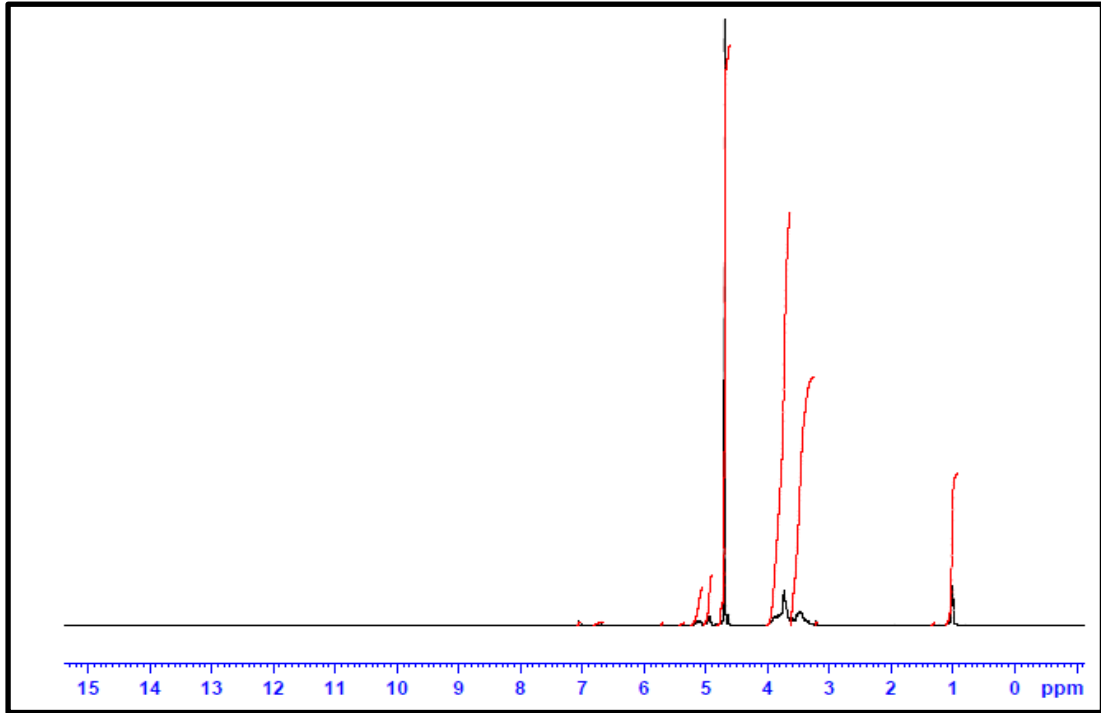
Şekil 4.24. SEF: M-β-CD fiziksel karışımına ait ^1H -NMR spektrumu (300 MHz, D_2O).



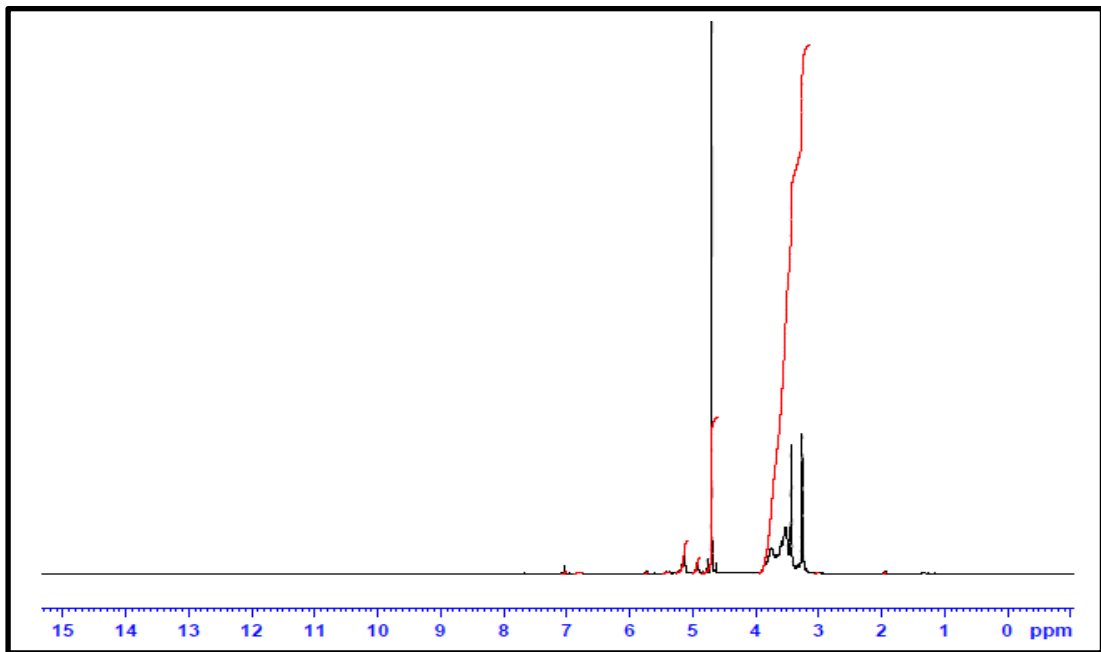
Şekil 4.25. SEF: HP- β -CD birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait ¹H-NMR spektrumu (300 MHz, D₂O).



Şekil 4.26. SEF: M- β -CD birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait ¹H-NMR spektrumu (300 MHz, D₂O).



Şekil 4.27. SEF:HP- β -CD yoğurma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait ¹H-NMR spektrumu (300 MHz, D₂O).

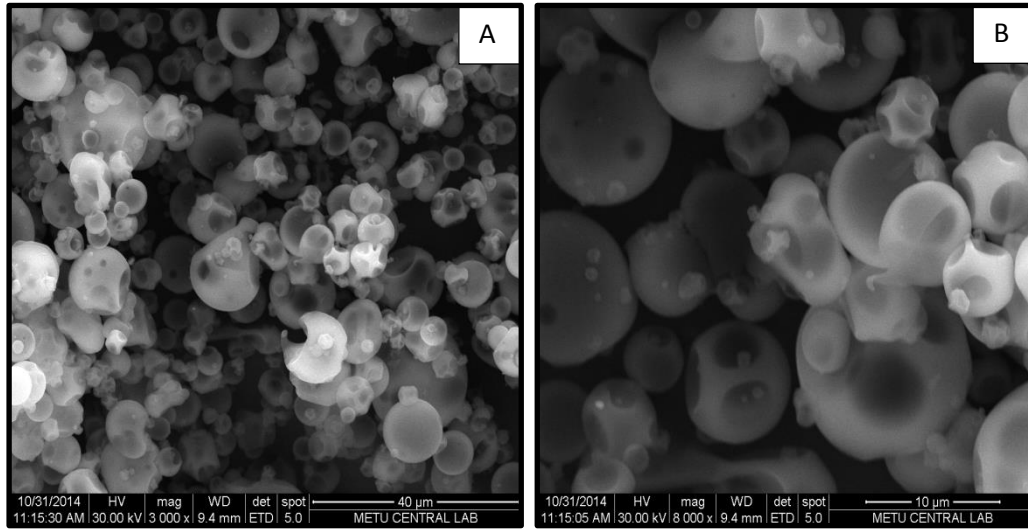


Şekil 4.28. SEF:M- β -CD yoğurma yöntemi ile hazırlanmış inklüzyon komplekslerine ait ¹H-NMR spektrumu (300 MHz, D₂O).

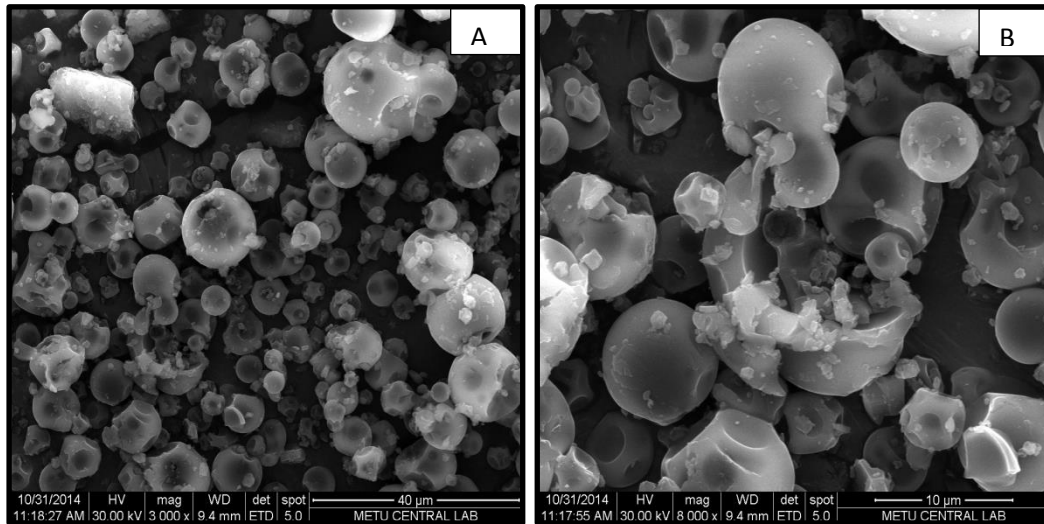
4.5.5. İnküzyon Komplekslerinin SEM Görüntülemesi

İnküzyon komplekslerinin SEM görüntülemesi Bölüm 3.2.1.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Siklodekstrinler, SEF:CD fiziksel karışımları ve inküzyon komplekslerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.29 - Şekil 4.36'da gösterilmiştir.

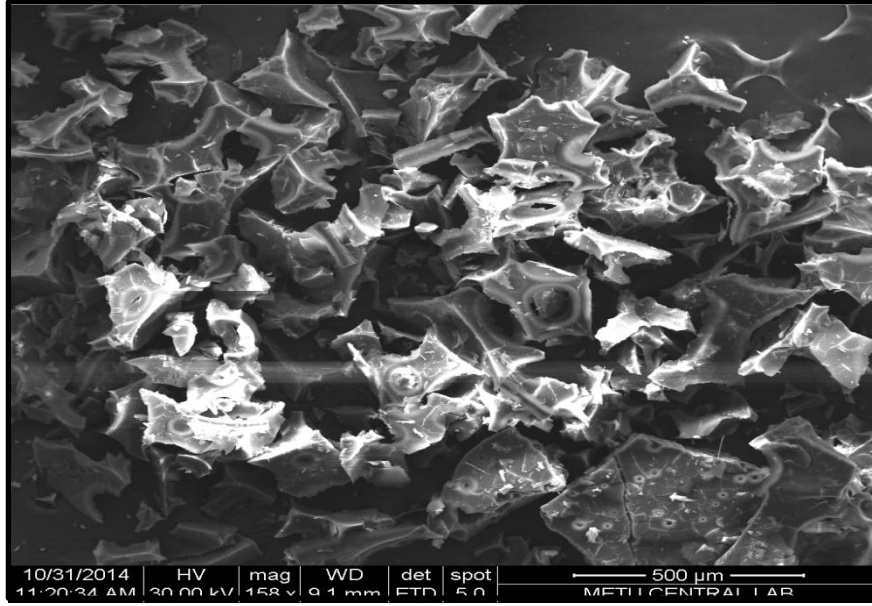
Siklodekstrinlerin amorf yapıları, SEM görüntülemesinde gözlenmiş, fiziksel karışım ve inküzyon komplekslerinde bu yapıdaki değişim incelenmiştir.



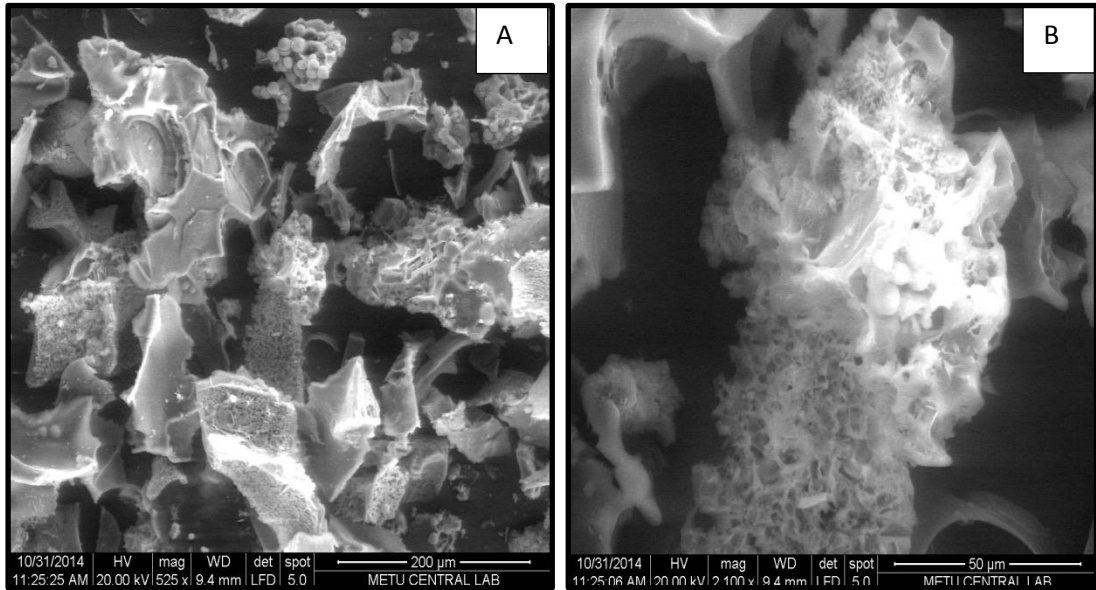
Şekil 4.29. HP-β-CD SEM görüntüsü (Ax3000; Bx8000).



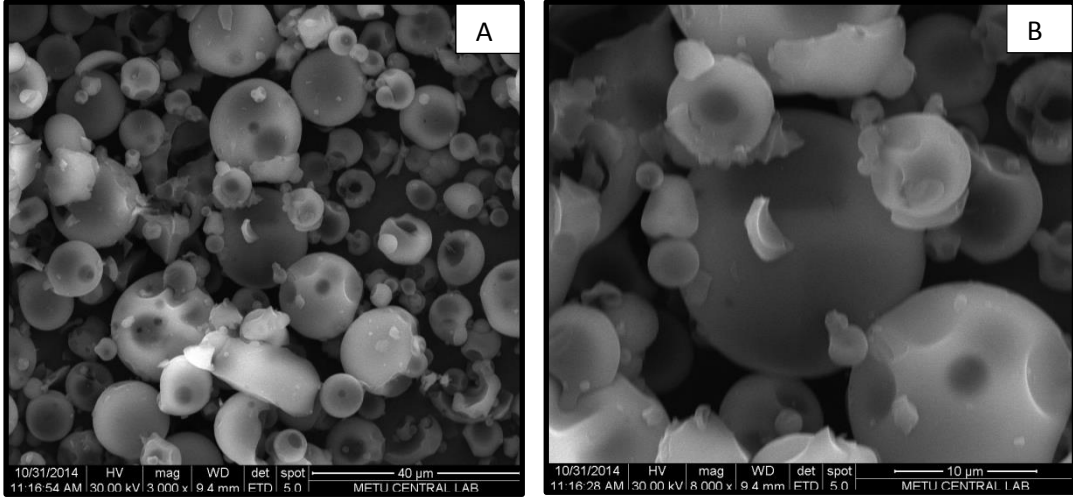
Şekil 4.30. SEF: HP-β-CD fiziksel karışımı SEM görüntüsü (Ax3000; Bx8000).



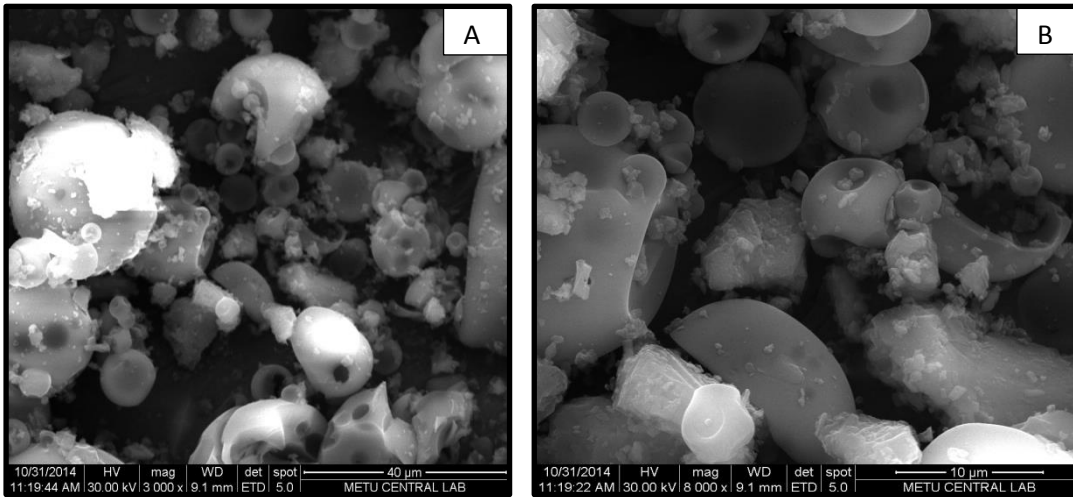
Şekil 4.31. Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan SEF: HP- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü.



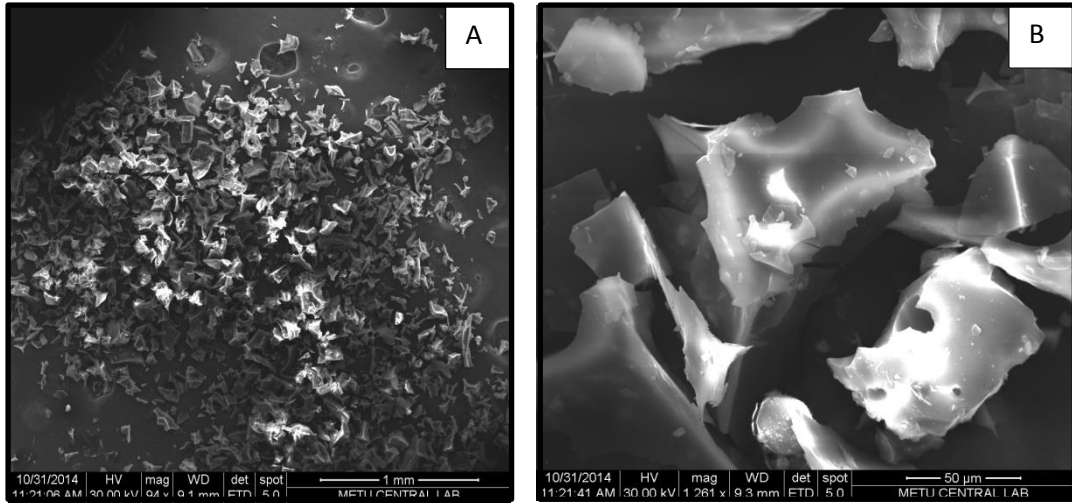
Şekil 4.32. Yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF: HP- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü (Ax525; Bx2100).



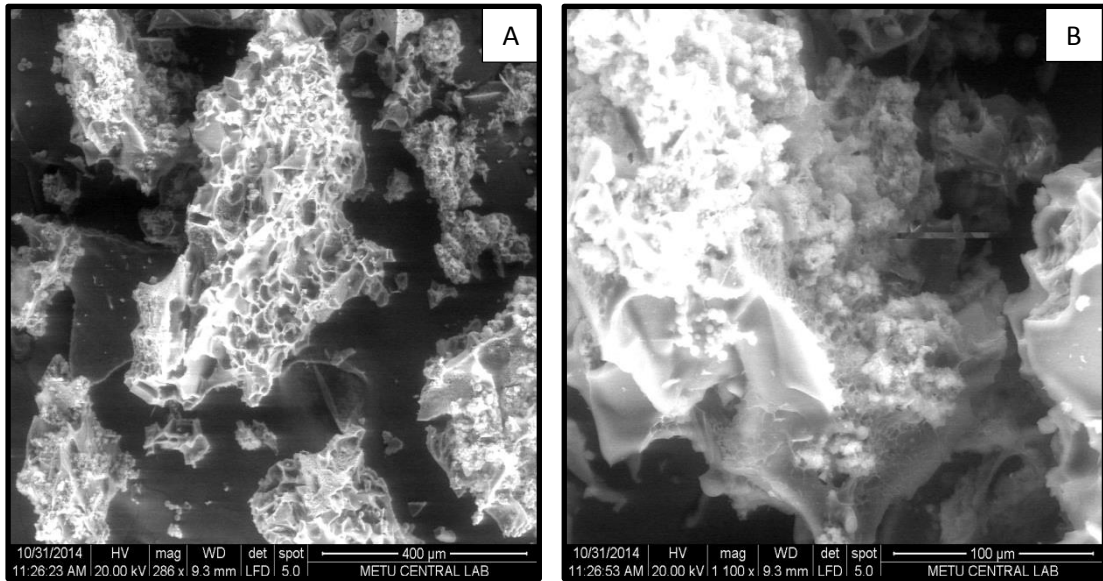
Şekil 4.33. M-β-CD SEM görüntüsü (Ax3000; Bx8000).



Şekil 4.34. SEF: M-β-CD fiziksel karışımı SEM görüntüsü (Ax3000; Bx8000).



Şekil 4.35. Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan SEF: M- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü (Ax98; Bx1200).



Şekil 4.36. Yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF: M- β -CD inklüzyon kompleksi SEM görüntüsü (Ax280; Bx1100).

SEM görüntülerinde, siklodekstrinlerin amorf yapıda oldukları gözlenebilmektedir. Fiziksel karışımlarda hem siklodekstrinin amorf yapısı, hem de SEF trihidratın kristal yapısı gözlenebilmektedir. Fakat inklüzyon komplekslerinde,

hem siklodekstrinlerin amorf yapısından uzak hem de SEF trihidratın kristal yapısından daha farklı görünen yeni bir yapı gözlenmektedir. Bu yeni oluşum inklüzyon kompleksi oluşumunun bir göstergesi olabilir. Birlikte çöktürme ve birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemleri arasında oluşan yapı açısından çok büyük farklılık gözlenmemiştir.

4.6. SEF trihidrat ve Formülasyonların Çözünme Deneyleri

Farmakope tarafından SEF trihidrat için verilen ve Bölüm 3'te anlatılan çözünme deneyi, α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD için gerçekleştirilmiştir.

SEF trihidratın çözünme profili, hazırlanan kompleksler ile kıyaslandığında, HP- β -CD ve M- β -CD ile hazırlanan formülasyonlarda SEF trihidratın çözünürlüğünde belirgin bir artış söz konusudur. Çözünmedeki artış açısından HP- β -CD, diğerlerine oranla daha iyi sonuç verirken; α -CD, β -CD ve γ -CD ile yapılan çözünme deneyleri SEF trihidratın kendi çözünürlüğünden daha düşük bulunmuştur.

Inklüzyon kompleksi hazırlama yöntemleri arasında karşılaştırma yapılacak olursa, bütün CD türevleri için en iyi artışın genel olarak yoğurma yöntemi ile sağlandığı gözlenmiştir. Tablo 4.9'da tozların çözünme deneylerine ilişkin veriler, Şekil 4.37 – Şekil 4.43'te ise çözünme profilleri verilmiştir.

Tablo 4.9. SEF ve farklı CD türevleri ile ve farklı yöntemlerle hazırlanan toz halde inklüzyon komplekslerinden zamana karşı çözünen SEF trihidrat miktarları (n=6).
(1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi.

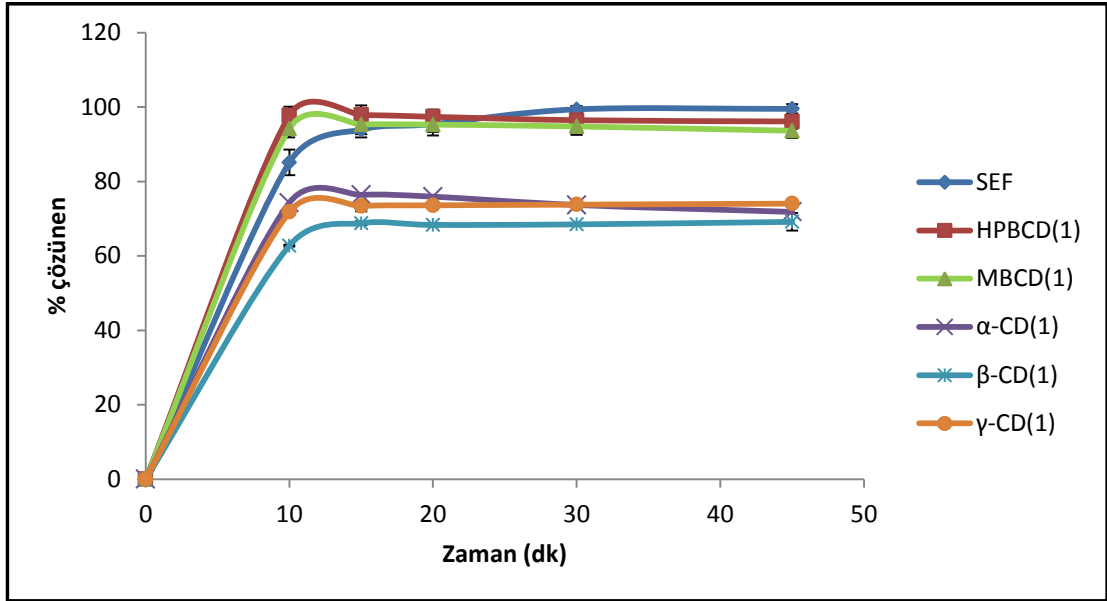
Zaman(dk)	Örnek	\bar{X} (mg)	SS	% VK
0	SEF trihidrat	0	0	0
10		380,93	15,43	4,05
15		420,25	9,05	2,15
20		430,08	13,69	3,18
30		444,85	3,91	0,88
45		444,34	5,61	1,26
0	HP- β -CD(1)	0	0	0
10		437,33	10,57	2,42
15		437,97	11,52	2,63
20		435,77	8,77	2,01
30		431,72	10,13	2,35
45		430,20	8,69	2,02
0	HP- β -CD(2)	0	0	0
10		446,43	25,09	5,62
15		448,13	23,01	5,13
20		445,47	20,29	4,55
30		444,17	20,91	4,71
45		439,34	18,52	4,22
0	M- β -CD(1)	0	0	0
10		421,54	17,13	4,06
15		426,39	13,85	3,25
20		426,28	16,39	3,84
30		424,11	15,54	3,66
45		418,95	16,07	3,84

Tablo 4.9. (Devam) SEF ve farklı CD türevleri ile ve farklı yöntemlerle hazırlanan toz halde inklüzyon komplekslerinden zamana karşı çözünen SEF trihidrat miktarları (n=6). (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi.

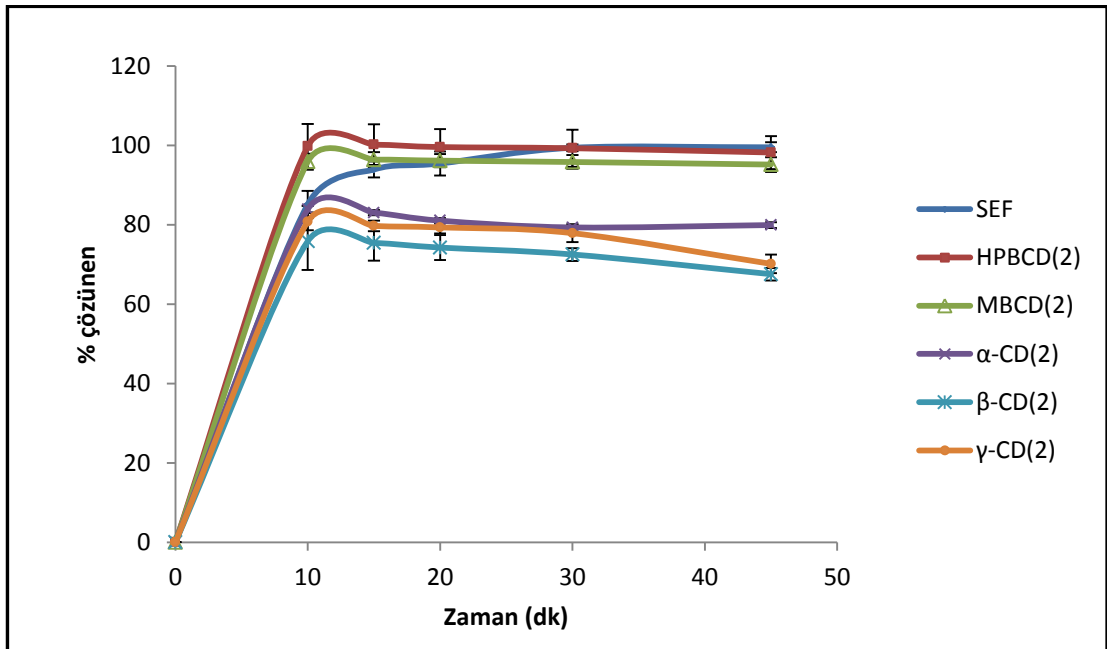
Zaman(dk)	Örnek	\bar{X} (mg)	SS	% VK
0	M- β -CD (2)	0	0	0
10		428,94	9,09	2,12
15		431,24	8,53	1,98
20		430,15	7,45	1,73
30		428,62	7,72	1,80
45		425,76	8,22	1,93
0	α -CD (1)	0	0	0
10		326,79	6,16	1,89
15		336,13	6,88	2,05
20		334,67	7,29	2,18
30		324,24	6,38	1,97
45		315,98	7,05	2,23
0	α -CD (2)	0	0	0
10		369,03	3,71	1,01
15		365,34	3,05	0,84
20		356,49	2,92	0,82
30		348,97	4,14	1,19
45		351,60	3,17	0,90
0	β -CD (1)	0	0	0
10		276,11	1,25	0,37
15		302,59	2,32	0,70
20		300,68	1,81	0,55
30		301,27	1,14	0,36
45		304,26	10,54	3,55

Tablo 4.9. (Devam) SEF ve farklı CD türevleri ile ve farklı yöntemlerle hazırlanan toz halde inklüzyon komplekslerinden zamana karşı çözünen SEF trihidrat miktarları (n=6). (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi.

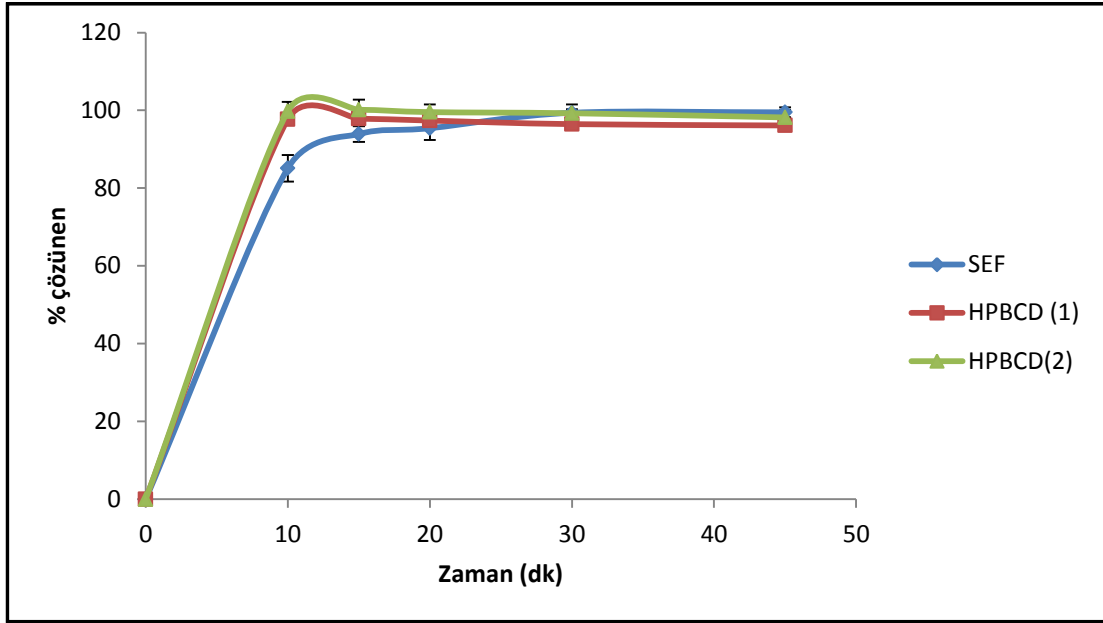
Zaman(dk)	Örnek	\bar{X} (mg)	SS	% VK
0	β -CD (2)	0	0	0
10		333,63	32,20	11,66
15		331,88	20,27	6,70
20		326,67	14,15	4,71
30		319,00	7,23	2,40
45		297,18	7,06	2,32
0	γ - CD (1)	0	0	0
10		315,91	1,70	0,48
15		323,07	4,94	1,41
20		323,81	0,69	0,20
30		324,66	1,19	0,35
45		325,84	1,31	0,43
0	γ - CD (2)	0	0	0
10		355,34	9,80	3,10
15		350,59	6,11	1,89
20		348,95	6,66	2,06
30		342,65	10,11	3,11
45		308,59	10,39	3,19



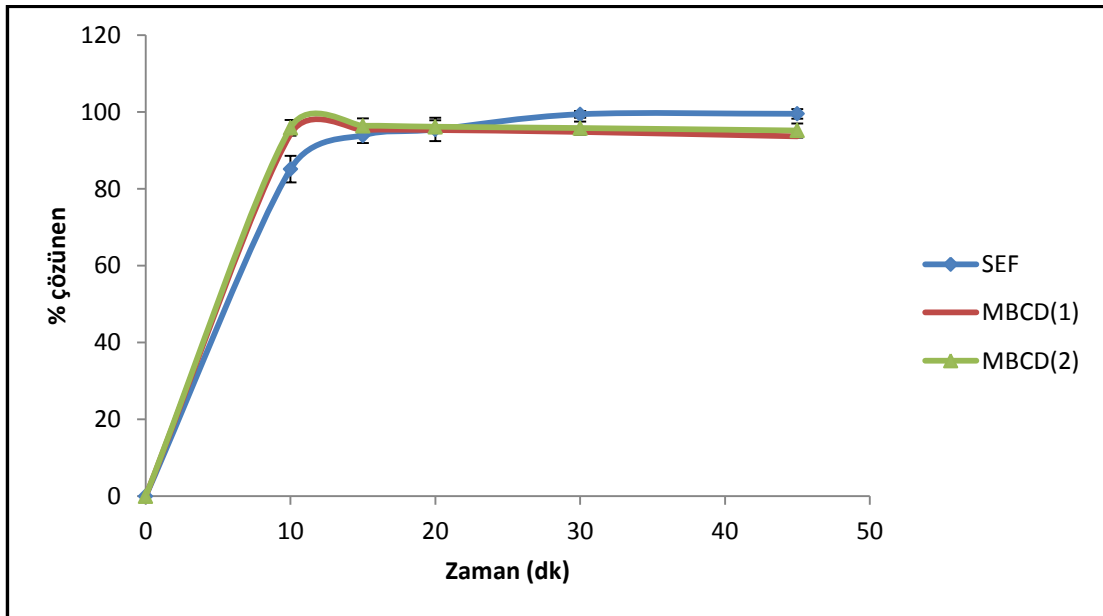
Şekil 4.37. 400 mg SEF, doğal siklodekstrinler ve türevleri ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünme profilleri. (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=6, ±SS).



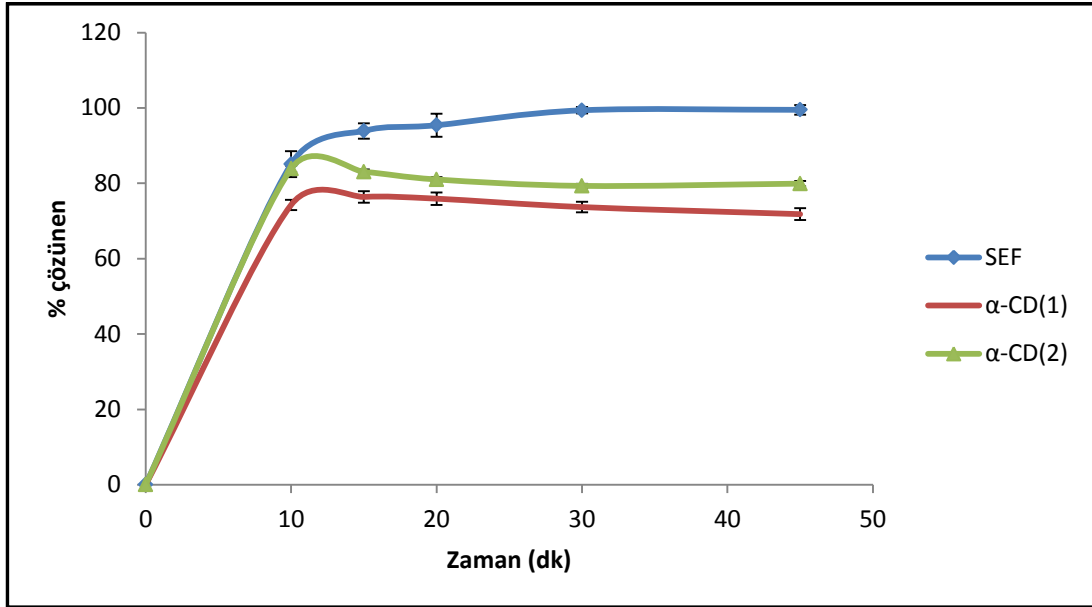
Şekil 4.38. 400 mg SEF, doğal siklodekstrinler ve türevleri ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünme profilleri. (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=6, ±SS).



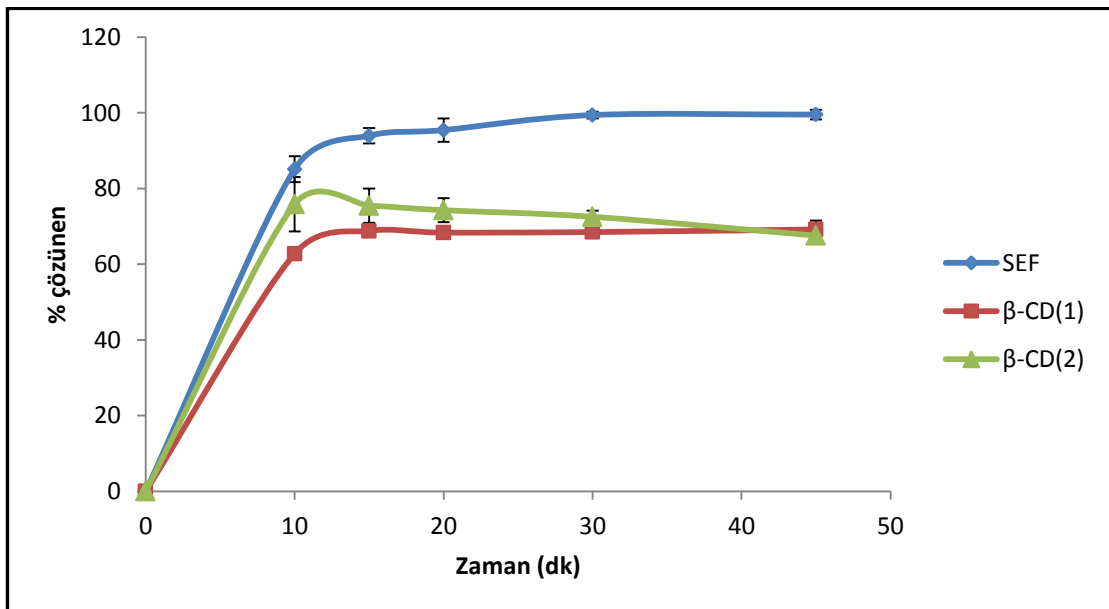
Şekil 4.39. 400 mg SEF, HP- β -CD ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=6, \pm SS).



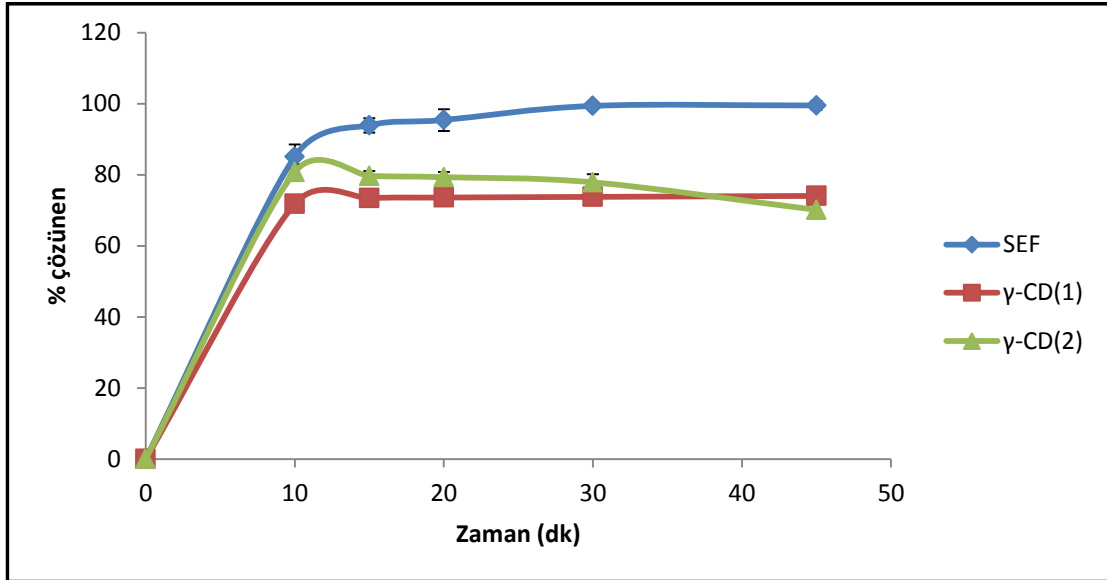
Şekil 4.40. 400 mg SEF, M- β -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=6, \pm SS)



Şekil 4.41. 400 mg SEF, α -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=6, \pm SS).



Şekil 4.42. 400 mg SEF, β -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=6, \pm SS).



Şekil 4.43. 400 mg SEF, γ -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri çözünme profilleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=6, \pm SS).

α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD ile SEF'in birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemleri ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünme profilleri incelenerek, en yüksek çözünürlük artışının HP- β -CD ve M- β -CD ile yoğurma yöntemi kullanılarak hazırlanan komplekslerde olduğu görülmüştür. Bu nedenle, tabletler üzerinde yapılacak olan çözünme deneylerinde, bu iki siklodekstrin türeviyle yoğurma yöntemi kullanılarak hazırlanan inklüzyon kompleksleri ile basılan tabletler kullanılmıştır.

4.7. Tabletlerin Çözünme Deneyleri

SEF trihidratın ticari preparatı olan referans tabletler ve yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD inklüzyon kompleksleri kullanılarak hazırlanan tabletlerin çözünme deneyleri, farmakopede SEF trihidrat tabletler için verilen yöntem kullanılarak Bölüm 3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Çözünme

ortamı olarak farmakopenin verdiği pH 7,2 fosfat tamponu ve distile su olmak üzere 2 farklı ortam kullanılmıştır.

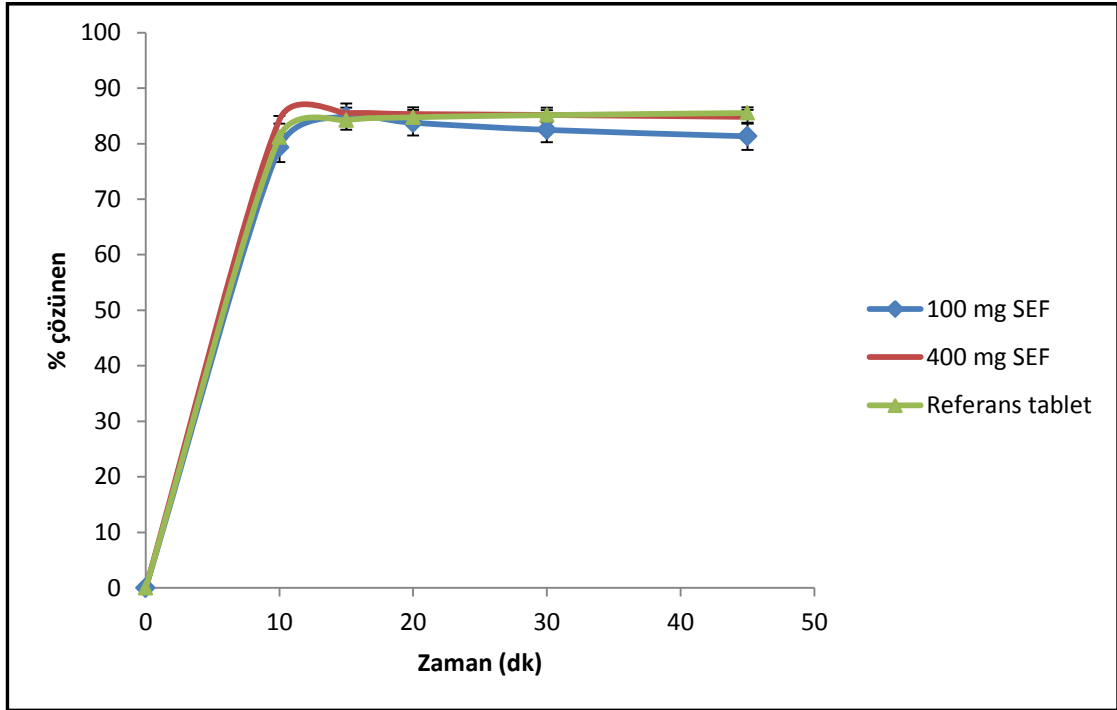
SEF trihidrat dozunun yüksek olması, siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşturduğunda bir tablet içerisinde bulunması gereken SEF:CD miktarının çok yüksek olması nedeniyle; SEF trihidratın normal dozunun (400 mg) 1/4'ü oranında (100 mg) çalışılmıştır. Bu aşamada, farmakopede verilen çözünme ortamının miktarı da aynı oranda azaltılmıştır. SEF trihidratın 1/4 oranında çalışılmasıyla çözünmenin değişip değişmeyeceğine, laboratuvar ortamında hazırlanan 400 mg SEF ve 100 mg SEF içeren tabletlerin çözünme hızlarının birbirleriyle kıyaslanması ile karar verilmiştir. Tablo 4.10 ve 4.11'de çözünme deneyleri sonucunda elde edilen bulgular verilmiştir. Şekil 4.44, Şekil 4.45 ve Şekil 4.46'da ise, hazırlanan tabletlerin ve referans tabletin distile su ve pH 7,2 fosfat tamponu ortamları için çözünme profilleri gösterilmiştir.

Tablo 4.10. SEF referans tablet, yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD tabletlerinden pH 7,2 fosfat tamponunda zamana karşı çözünen SEF miktarları (n=6).

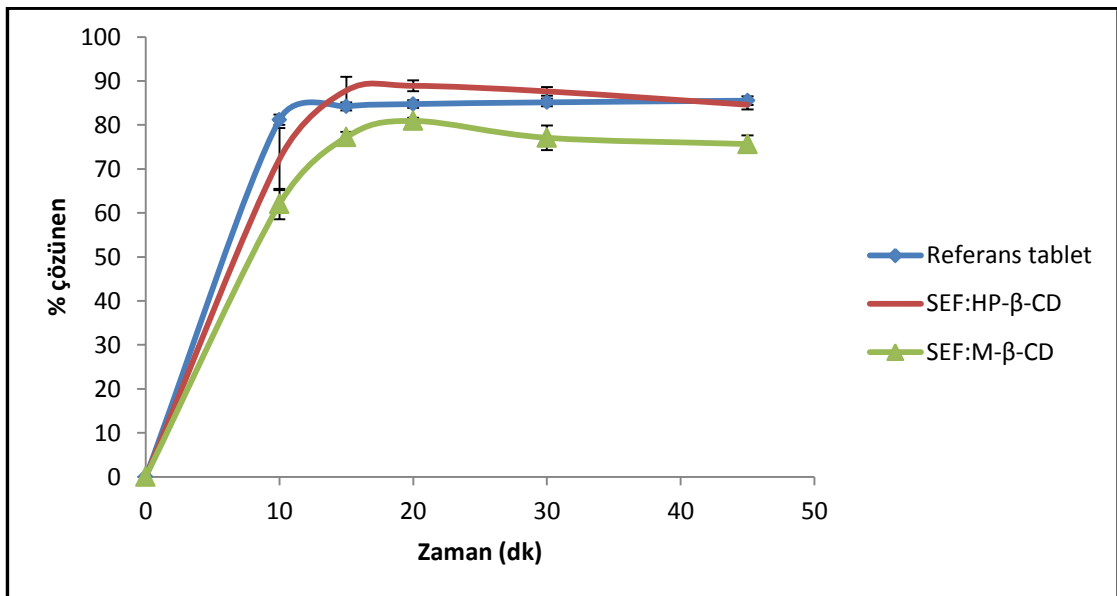
Zaman(dk)	Örnek	\bar{X} (mg)	SS	% VK
0	Referans tablet	0	0	0
10		363,27	5,17	1,42
15		376,73	4,04	1,07
20		379,20	3,84	1,01
30		380,97	3,91	1,03
45		382,65	4,50	1,18
0	400 mg SEF	0	0	0
10	tablet	377,16	3,15	0,84
15		382,51	4,55	1,19
20		381,78	5,53	1,45
30		381,12	5,79	1,52
45		379,51	5,54	1,46

Tablo 4.10. (Devam) SEF piyasa tableti (Referans tablet), yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD tabletlerinden pH 7,2 fosfat tamponunda zamana karşı çözünen SEF miktarları (n=6).

Zaman(dk)	Örnek	\bar{X} (mg)	SS	% VK
0	100 mg SEF	0	0	0
10	tablet	88,71	2,91	3,28
15		81,36	2,59	2,77
20		93,72	2,59	2,77
30		92,27	2,49	2,70
45		90,97	2,75	3,02
0	SEF:HP- β -CD	0	0	0
10		80,80	7,92	9,81
15		98,24	3,45	3,51
20		99,44	1,37	1,38
30		98,03	1,13	1,15
45		94,63	1,21	1,28
0	SEF:M- β -CD	0	0	0
10		69,36	3,88	5,60
15		86,37	1,82	2,11
20		90,52	0,82	0,91
30		86,23	3,15	3,65
45		84,63	2,20	2,60



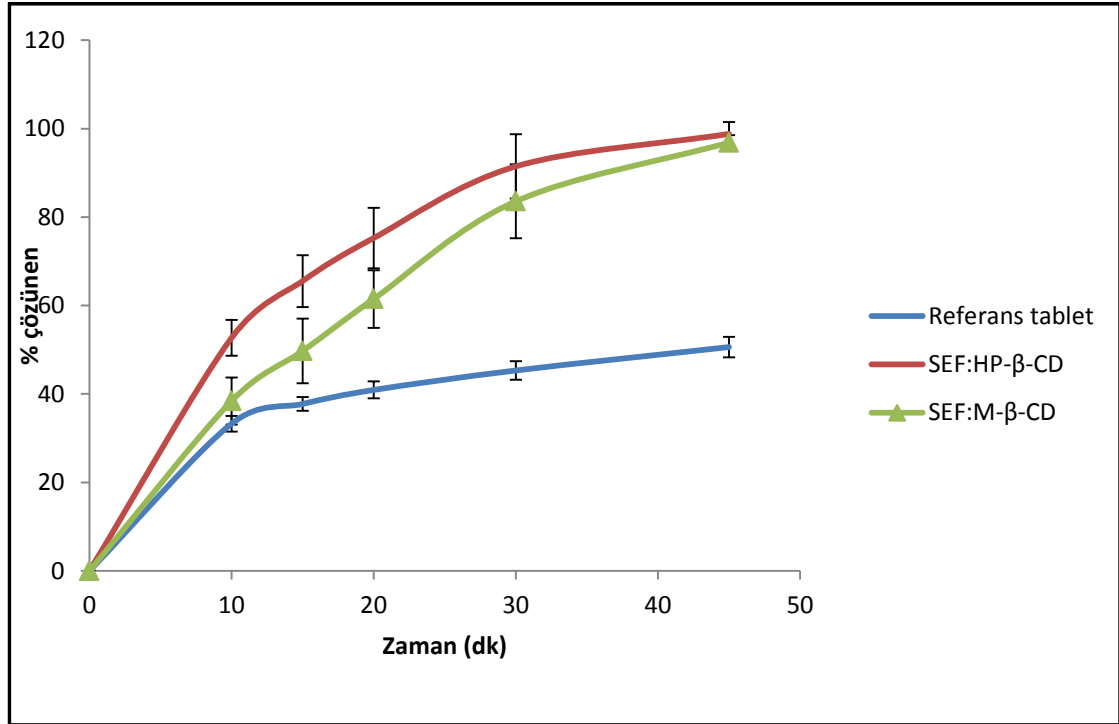
Şekil 4.44. Referans tablet, laboratuvar ortamında hazırlanan 400 mg SEF ve 100 mg SEF tabletlerin çözünme profilleri (pH 7,2 fosfat tamponu) (n=6, \pm SS).



Şekil 4.45. Referans tablet, SEF:HP-β-CD ve SEF:M-β-CD ile yoğurma yöntemi kullanılarak hazırlanan tabletlerin pH 7,2 fosfat tamponunda çözünme profilleri (n=6, \pm SS).

Tablo 4.11. SEF referans tablet, yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD tabletlerinden suda zamana karşı çözünen SEF miktarları (n=6).

Zaman(dk)	Örnek	\bar{X} (mg)	SS	% VK
0	Referans tablet	0	0	0
10		148,93	7,89	5,30
15		168,86	6,92	4,10
20		183,07	8,58	4,69
30		202,74	9,32	4,60
45		226,48	10,56	4,66
0	SEF:HP- β -CD	0	0	0
10		58,94	4,53	7,68
15		73,32	6,57	8,96
20		84,19	7,67	9,11
30		102,31	8,14	7,96
45		110,54	3,02	2,73
0	SEF:M- β -CD	0	0	0
10		42,97	5,96	13,86
15		55,61	8,17	14,70
20		68,77	7,26	10,56
30		93,48	10,07	10,77
45		108,33	1,88	1,74



Şekil 4.46. Referans tablet, SEF:HP-β-CD ve SEF:M-β-CD ile yoğurma yöntemi kullanılarak hazırlanan tabletlerin suda çözünme profilleri (n=6, ±SS).

Çözünme ortamı olarak su kullanıldığında, referans tabletin çözünme profili her iki siklodekstrin türevi için belirgin derecede artış göstermesine rağmen, pH 7,2 fosfat tamponunda yapılan çalışmada M-β-CD ile oluşturulan komplekslerin çözünürlüğünün referans tablettten daha düşük olduğu görülmektedir.

pH 7,2 fosfat tamponu ve su ortamlarında yapılan çözünme deneylerine ait referans tablet, SEF:HP-β-CD ve SEF:M-β-CD tablet çözünme hızlarına ait f1 ve f2 istatistikleri Tablo 4.12'de verilmiştir. 50'den büyük olan f2 değerleri için çözünme profilleri arasında fark olmadığı söylenir. 0-15 arasındaki f1 değerleri için çözünme profilleri arasında fark olmadığı söylenirken, bu değer 15'ten büyük olduğunda profiller birbirinden farklıdır.

Tablo 4.12. Referans tablet ve hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD tabletlere ait f_1 ve f_2 istatistikleri.

	Referans tablet- SEF:HP-β-CD tablet pH 7.2 Fosfat Tamponu Ortamı	Referans tablet- SEF:HP-β-CD tablet Su Ortamı
f_1	5	84
f_2	67	24

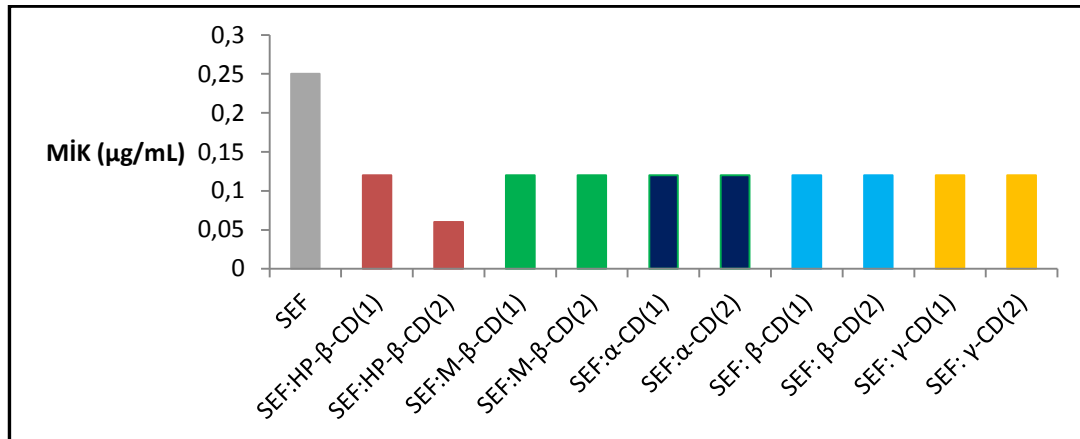
	Referans tablet- SEF:M-β-CD tablet pH 7.2 Fosfat Tamponu Ortamı	Referans tablet- SEF:M-β-CD tablet Su Ortamı
f_1	12	59
f_2	50	29

4.8. Antibakteriyel Etkinlik Testi

SEF trihidrat ve hazırlanan formülasyonlara ilişkin antibakteriyel etkinlik testi, Bölüm 3.2.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan test sonucu bulunan MİK değerleri, Tablo 4.13 ve Şekil 4.47’de verilmiştir.

Tablo 4.13. SEF trihidrat ve hazırlanan formülasyonların *E.coli*'ye karşı MİK değerleri. (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=3)

Formülasyon	<i>E. coli</i> (0,06-16 $\mu\text{g/mL}$)
SEF	0,25
SEF:HP- β -CD(1)	0,12
SEF:HP- β -CD(2)	0,06
SEF:M- β -CD(1)	0,12
SEF:M- β -CD(2)	0,12
SEF: α -CD(1)	0,12
SEF: α -CD(2)	0,12
SEF: β -CD(1)	0,12
SEF: β -CD(2)	0,12
SEF: γ -CD(1)	0,12
SEF: γ -CD(2)	0,12



Şekil 4.47. SEF trihidrat ve hazırlanan formülasyonların *E.coli*'ye karşı MİK değerleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=3).

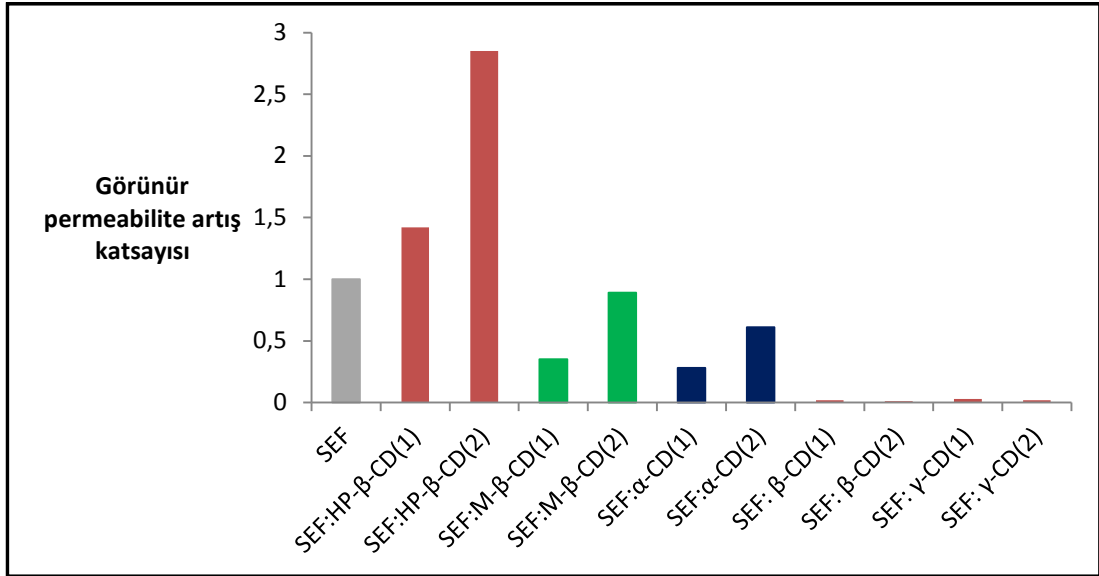
4.9. Caco-2 Hücreler ile SEF trihidrat Permeabilite Çalışmaları

SEF trihidrat ve hazırlanan komplekslerin apikalden bazolateral yüze geçişleri saptanarak, görünür permeabilite sabitleri (P_{app}) hesaplanmıştır. Tablo 4.15 ve Şekil 4.47'de P_{app} değerleri ve permeabiliteyi artırma oranları görülmektedir.

Tablo 4.14. SEF trihidrat ve SEF:CD komplekslerinin Caco-2 hücrelerden geçiş P_{app} değerleri değerleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=3).

Formülasyon	P_{app} ($\bar{X} \pm SS$, n=3) cm/s	Permeabilite artış katsayısı
SEF	$2,71(\pm 0,51) \times 10^{-6}$	1,00
SEF:HP- β -CD(1)	$3,85(\pm 1,66) \times 10^{-6}$	1,42
SEF:HP- β -CD(2)	$7,75(\pm 2,41) \times 10^{-6}$	2,85
SEF:M- β -CD(1)	$0,95(\pm 0,45) \times 10^{-6}$	0,35
SEF:M- β -CD(2)	$2,43(\pm 0,61) \times 10^{-6}$	0,89
SEF: α -CD(1)	$0,87(\pm 0,87) \times 10^{-6}$	0,28
SEF: α -CD(2)	$0,47(\pm 0,47) \times 10^{-6}$	0,61
SEF: β -CD(1)	$0,04(\pm 0,21) \times 10^{-6}$	0,02
SEF: β -CD(2)	$0,04(\pm 0,09) \times 10^{-6}$	0,01
SEF: γ -CD(1)	$0,09(\pm 0,13) \times 10^{-6}$	0,03
SEF: γ -CD(2)	$0,06(\pm 0,13) \times 10^{-6}$	0,02

Tablodaki değerler incelendiğinde yoğurma yöntemi ile hazırlanan HP- β -CD ile hazırlanan komplekslerin permeabilitesinin diğerlerine oranla daha yüksek bulunduğu görülmektedir. Yoğurma yöntemi, genel olarak siklodekstrinlerin çoğu ile permeabilitede; birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine göre daha fazla artışa neden olmuştur.



Şekil 4.48. SEF trihidrat ve SEF:CD komplekslerinin Caco-2 hücrelerden geçiş P_{app} değerleri değerleri (1) Birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma yöntemi (2) Yoğurma yöntemi (n=3).

5. TARTIŞMA

Söz konusu çalışmanın amacı, suda çözünürlüğü ve permeabilitesi düşük, buna bağlı olarak da biyoyararlanımı az olan (% 40), BCS’de Sınıf IV ilaç, SEF’in, siklodekstrin türevleri kullanılarak sudaki çözünürlüğünün iyileştirilmesidir. Siklodekstrinler, inklüzyon kompleksi oluşturarak suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünü artırmaktadır. SEF trihidratın oral kullanım amaçlı, suda çözünür inklüzyon komplekslerinin oluşturulmasıyla sudaki zayıf çözünürlüğünün iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Siklodekstrinler, çözünürlüğü artırmalarının yanı sıra intestinal permeabiliteyi de iyileştirerek ilacın biyoyararlanımı üzerine etkili olabilmektedir. Hücre kültürü çalışmaları ile SEF trihidratın permeabilite üzerine etkisinin incelenmesi de bu çalışmanın hedefleri arasındadır.

5.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Etkin maddenin saflığının kanıtlanabilmesi ve hazırlanan inklüzyon kompleksleri ile karakterizasyonlarının kıyaslanarak, kompleks oluşumuna karar verilebilmesi amacıyla, SEF trihidratın karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu doğrultuda; etkin maddenin FTIR spektrumu çekilmiş (Şekil 4.1), X-ışını kırınımı analizi ve (Şekil 4.2), diferansiyel taramalı kalorimetrik analizi gerçekleştirilmiş (Şekil 4.3), ¹H-NMR spektrumu çözümlenmiş (Şekil4.4) ve SEM görüntüleri (Şekil4.5) kaydedilmiştir. SEF trihidratın UV spektrumu (Şekil 4.6) da alınarak, miktar tayini yönteminde kullanılması uygun görülmüştür.

- FTIR Spektrumu: SEF trihidrata ilişkin FTIR spektrumu çözümlendiğinde, 1650-1740 cm⁻¹’de C=O asit bağlarına ait gerilme titreşimleri, 1640-1690 cm⁻¹’de C=O amid bağlarına ait gerilme titreşimleri, 1590-1640 cm⁻¹’de C=C çifte bağ gerilme titreşimleri, 710-570 cm⁻¹’de C-S bağına ait gerilme titreşimleri gözlenmiştir. Bu titreşimler literatür ile örtüşmektedir (161-163). SEF trihidrata spesifik bu titreşimlerin, siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksleri oluşturulduğunda tamamen kaybolması veya küçülmesi beklenmektedir.

- X-Işını Kırınımı Analizi: X-ışını kırınımı analiz sonuçları Şekil 4.2’de verilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, SEF trihidratın kristal yapısından kaynaklanan, son derece yoğun şekilde pik verdiği görülmektedir. Kristalogramlara bakıldığında, SEF trihidratın 2 teta açısı 20 – 40 derece arasında kristal pikler verdiği görülmektedir. Bu sonuçlar literatür ile uyum içerisindedir. Siklodekstrinlerle oluşturulan inklüzyon komplekslerinde ve fiziksel karışımlarında etkin maddenin kristal pikinin bulunup bulunmaması veya kristal pikinde azalma durumu incelenecektir (155,164).
- DSC Analizi: DSC analizi sonuçları Şekil 4.3’de verilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde SEF trihidratın 1 ekzotermik ve 2 tane endotermik pik verdiği gözlenmektedir. Bu pikler yaklaşık olarak sırasıyla, 104 °C, 180 °C ve 250 °C’de görülmüştür. İkinci endotermik pik olan ve yaklaşık 250 °C’de gözlenen pik, SEF trihidratın erime pikidir. SEF trihidratın diferansiyel taramalı kalorimetrik analizi ile ilgili elde edilen sonuçlar, literatürle uyum içerisindedir (158). Siklodekstrinlerle oluşturulan inklüzyon komplekslerinde, etkin maddenin erime pikinin kaybolması beklenmektedir.
- ¹H-NMR Analizi: SEF trihidrata ait ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.4’de verilmiştir. SEF trihidratın yapısında bulunan protonlar gösterilmiş ve literatürle karşılaştırarak uyumlu oldukları görülmüştür (165).
- SEM Görüntülemesi: SEF trihidrata ait SEM görüntüleri Şekil 4.5’de verilmiştir. SEM görüntüleri, X-ışını kırınımı analizini doğrulayarak SEF trihidratın kristal yapıda olduğunu ortaya koymaktadır.
- UV Analizi: SEF trihidratın UV spektrumunda maksimum pik, literatürle paralel şekilde 289 nm’de ölçülmüştür (160). Belirlenen dalga boyu, SEF trihidratın HPLC ile miktar tayininde kullanılmıştır.

5.2. SEF trihidratın Miktar Tayini

SEF trihidratın miktar tayini Bölüm 3’de verildiği şekilde 289 nm dalga boyunda, 6 farklı konsantrasyonla valide edilen HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Tez kapsamında yapılacak olan analizlere uygun olarak geniş bir aralıkta, 10 – 500 µg/mL konsantrasyonda çalışılmıştır. Analitik yöntem validasyonu parametrelerinden biri olan doğrusallık için r^2 değeri 1,00 olarak bulunmuştur. Bu değer 1’e yaklaştıkça, yöntemin güvenilirliği artmaktadır. İnküzyon kompleksi oluşumunda kullanılan siklodekstrinlerin (HP-β-CD, M- β-CD, α-CD, β-CD, γ-CD), hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HBSS’nin, tablet formülasyonunda kullanılan ekspiyanların (Avicel pH 102, Mısır nişastası ve Magnezyum stearat), çözünme ortamı olarak kullanılan pH 7,2 fosfat tamponunun ilacın tayini üzerinde etki yapmadıkları, özgünlük çalışması ile kanıtlanmıştır. Yöntem validasyonu kapsamında; kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik), doğruluk, gözlenebilirlik alt sınırı (LOD) ve tayin edilebilirlik sınırı (LOQ) incelenmiştir. Gözlenebilirlik alt sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 0,373 µg/mL (S/N=3) ve 1,24 µg/mL (S/N=10) olarak bulunmuştur. Bulunan değerler, çalışma kapsamında tayin edilecek olan SEF miktarlarının oldukça altında olduğundan, yöntem çalışma için uygundur. Yöntem validasyonu için yapılan deneyler ve elde edilen bulgular sonucunda, miktar tayini yönteminin hassas ve tekrarlanabilir olduğu söylenebilir (166,167).

Valide edilen HPLC yöntemi, faz çözünürlük çalışmalarında, çözünme tayininde ve Caco-2 hücrelerden geçiş çalışmalarında miktar tayini analizlerinde kullanılmıştır.

5.3. Faz Çözünürlük Çalışmaları

SEF trihidratın farklı konsantrasyonlardaki farklı siklodekstrinlerin (HP-β-CD, M- β-CD, α-CD, β-CD, γ-CD) fonksiyonu olarak çözünürlüğündeki değişimleri gösteren veriler Tablo 4.8 ve 4.9’da , faz çözünürlük diagramları ise Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15’te verilmiştir. SEF trihidratın tek başına olan çözünürlüğü incelendiğinde, çözünürlükteki artışın en fazla HP-β-CD ile sağlandığı

görülmektedir. HP- β -CD ile çözünürlük 32 kat artarken, M- β -CD ile 29 kat, α -CD ve β -CD ile 13 kat, γ -CD ile 12 kat artmıştır.

HP- β -CD ve M- β -CD'in SEF trihidratın çözünürlüğü üzerine etkileri, faz çözünürlük çalışmalarında hemen hemen aynı olmakla birlikte HP- β -CD'le çözünürlüğün daha fazla arttığı görülmektedir. En düşük artış ise doğal siklodekstrinlerle görülmektedir. Doğal siklodekstrinlerin çözünürlüğü, siklodekstrin türevlerine göre daha düşüktür. Bu durum intramoleküler hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. HP- β -CD ve M- β -CD ise β -CD'in çözünürlüğü artırılmış türevleridir. HP- β -CD'in, M- β -CD'e göre çözünürlüğü daha yüksektir (43,82). Bu nedenle, SEF trihidratın çözünürlüğü HP- β -CD ile daha fazla artmıştır diyebiliriz. Faz çözünürlük çalışmaları da bu durumu doğrular niteliktedir.

Faz çözünürlük diyagramlarının doğrusal kısımlarından yararlanılarak 1:1 asosiyasyon katsayısı $K_{1:1}$, SEF: HP- β -CD ve SEF: M- β -CD kompleksleri için hesaplanmıştır. SEF: HP- β -CD için $K_{1:1}$ 23378,3 M^{-1} , SEF: M- β -CD için $K_{1:1}$ 21287,4 M^{-1} olarak bulunmuştur. Asosiyasyon katsayısı, ilaç:CD kompleksleri için genellikle 0-100.000 M^{-1} arasında değişmektedir (168). SEF: HP- β -CD ve SEF: M- β -CD için bulunan değerler bu aralığa girmektedir. SEF: α -CD, SEF: β -CD ve SEF: γ -CD için $K_{1:1}$ asosiyasyon sabitleri ise sırasıyla 7394 M^{-1} , 7606 M^{-1} , 6250 M^{-1} olarak hesaplanmıştır. Asosiyasyon sabitinin sıfır olması, ilaç ile CD arasında inklüzyon kompleksi oluşmadığını göstermektedir. Asosiyasyon katsayısının artması, ilaç ile CD molekülü arasında etkileşimin arttığını ve daha dayanıklı komplekslerin oluştuğunu göstermektedir (169,170).

5.4. İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması

SEF:CD inklüzyon komplekslerinin hazırlanmasında HP- β -CD, M- β -CD, α -CD, β -CD, γ -CD kullanılmıştır. Kompleksler yoğurma (*kneading*) ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma (*coprecipitation-colyophilisation*) yöntemleri kullanılarak hazırlanmış, ayrıca SEF trihidratın HP- β -CD, M- β -CD için fiziksel karışımları da hazırlanmıştır.

SEF trihidratın HP- β -CD ve M- β -CD için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Fiziksel karışım, yoğurma yöntemi ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi;

- FTIR spektrumlarına göre, en etkin yöntemin yoğurma yöntemi olduğu görülmüştür. Yoğurma yönteminde SEF trihidrata spesifik piklerin tamamen yok olduğu gözlenmiştir. Fiziksel karışım ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemlerinde ise SEF trihidrata spesifik piklerin şiddetinde azalma görülmüştür.
- X-ışını kırınımı analizine göre; yoğurma yöntemi ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemleri arasında belirgin bir fark görülmemiştir.
- DSC termogramlarına göre kıyaslandıklarında; SEF trihidrata ait olan 1 ekzotermik 2 endotermik pikin, bütün fiziksel karışım ve inklüzyon komplekslerinde kaybolduğu görülmektedir.
- $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarına göre; yoğurma yöntemiyle siklodekstrinlerin H3 ve H5 protonlarında, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine göre daha fazla kayma gözlenmiştir.
- SEM görüntülerine göre; birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemi ve yoğurma yöntemi ile oluşturulan komplekslerde, hem siklodekstrinlerin amorf yapısından uzak hem de SEF trihidratın kristal yapısından daha farklı görünen yeni bir yapı gözlenmektedir. siklodekstrinlerin amorf yapıda oldukları gözlenebilmektedir. Fiziksel karışımlarda hem siklodekstrinin amorf yapısı, hem de SEF trihidratın kristal yapısı gözlenebilmektedir. Birlikte çöktürme ve birlikte dondurarak kurutma yöntemi ve yoğurma yöntemi arasında SEM görüntüleri açısından belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Bütün bu karakterizasyon çalışmaları sonucunda yoğurma (*kneading*) yönteminin, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma (*coprecipitation-colyophilisation*) yöntemine göre daha iyi sonuç verdiği söylenebilir. Ayrıca, yoğurma yöntemi, üretim verimi açısından da birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine üstünlük sağlamaktadır. Literatürde, hazırlama yönteminin ilaç:CD inklüzyon kompleksleri üzerine etkisi incelendiğinde, yoğurma yöntemi ve

birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemlerine ilişkin benzer sonuçlar görülmüştür. Ketoprofenin β -CD ve M- β -CD ile kurutma ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemleri ile oluşturulan inklüzyon komplekslerinin karakterizasyonları DSC, FTIR, X-ışını kırınımı analizi ve SEM ile yapılmıştır. Sonuç olarak, kristal yapı gösteren ketoprofen yapısının inklüzyon kompleksi oluşumuyla, her iki yöntemle amorf yapı gösterdiği gözlenmiştir. Gliklazid ve β -CD kullanılarak, hazırlama yönteminin, inklüzyon kompleksi oluşumuna etkisi incelenmiştir. Hazırlanan inklüzyon komplekslerinin karakterizasyonu FTIR ve X-ışını kırınımı analizi ile yapılmıştır. Sonuçta, yoğurma yönteminin birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine göre daha etkin olduğu görülmüştür (171,172).

5.5. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Karakterizasyon amacıyla hazırlanan kompleks ve fiziksel karışımların;

- FTIR spektrumları çekilmiş (Şekil 4.16, Şekil 4.17)
- X-ışını kırınımı analizi yapılmış (Şekil 4.18, Şekil 4.19)
- DSC analizleri yapılmış (Şekil 4.20)
- ¹H-NMR çözümülemesi yapılmış (Şekil 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28)
- SEM görüntüleri çekilmiştir (Şekil 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36)

SEF trihidrat için de aynı analizler yapılmış, ve sonuçlar SEF trihidratın karakterizasyon sonuçları ile kıyaslanarak kompleks oluşup oluşmadığı yorumlanmıştır.

Tüm karakterizasyon sonuçları için, fiziksel karışımlarda kompleks oluşumunun ihmal edilebilecek kadar düşük olduğu söylenebilir. Yoğurma (*kneading*) yönteminin, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma (*coprecipitation-colyophilisation*) yöntemine göre daha iyi sonuçlar verdiği, yine bütün karakterizasyon sonuçları incelendiğinde söylenebilecek ortak bir durumdur.

Fakat kullanılan ilaca göre, hazırlama yönteminin etkinliği değişmektedir. Varfarinle yapılan bir çalışmada, kompleksler evaporasyon, dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemleri ile hazırlanmış, kompleks oluşumunda en etkin yöntemin dondurarak kurutma olduğu görülmüştür (173). Yapılan başka bir çalışmada ise, karakterizasyon sonuçları yoğurma yönteminin birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine göre daha uygun olduğu göstermiştir (154). Yoğurma yöntemi, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine göre daha uygulanabilir, üretim veriminin daha yüksek olduğu, maliyeti daha düşük bir yöntemdir (171).

Her iki CD türevi için de kompleks oluşumu gözlenmiş, fakat en etkin kompleks oluşumu yoğurma (*kneading*) yöntemi ile hazırlanan SEF:HP- β -CD inklüzyon komplekslerinde görülmüştür. Tez kapsamında yapılacak olan çözünme deneyleri, antibakteriyel etkinlik tayini ve permeabilite çalışmaları da bu sonuçları doğrular nitelikte bulunmuştur.

5.5.1. İnküzyon Komplekslerinin FTIR Spektrumları

SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD inklüzyon kompleksi ve fiziksel karışımlarının FTIR spektrumlarına SEF trihidrat ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.16, Şekil 4.17'de verilmiştir. SEF trihidrat FTIR spektrumunda 1640-1740 cm^{-1} 'de gözlenen, SEF trihidrat yapısındaki C=O bağlarına ilişkin gerilme titreşimlerinin, 1590-1640 cm^{-1} 'de gözlenen C=C çifte bağlarına ilişkin gerilme titreşimleri ve 710-570 cm^{-1} 'de gözlenen C-S bağına ilişkin gerilme titreşimlerinin, siklodekstrinlerle oluşturulan fiziksel karışım ve inklüzyon komplekslerinde şiddetlerinin azaldığı, yoğurma yöntemiyle elde edilen komplekslerde ise neredeyse tamamen kayboldukları saptanmıştır. Bunun nedeni, SEF trihidratın siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşturmasıyla, ortamdaki serbest SEF trihidrat miktarının azalmasıdır (154).

C=O piklerindeki küçülmenin bir diğer nedeni ise SEF trihidratın siklodekstrinler ile etkileşmesi ile H bağı oluşumu olabilir. Yapılan bir çalışmada, karbonil gruplarının (C=O) hidrojen bağı oluşumuna bağlı olarak siklodekstrin yapısındaki gibi hidroksilik gruplardan etkilendiği gösterilmiştir (174).

SEF trihidrata ait FTIR spektrumu ve SEF:CD komplekslerinin FTIR spektrumları incelendiğinde $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ 'de ise SEF trihidrata ait NH_2 yapısından dolayı N-H gerilme titreşimleri görülmektedir. Siklodekstrinlerle kompleks oluşturduğunda ise, siklodekstrinlere ait ve aynı bölgede görülen O-H titreşimlerinin altında kaldığı ya da siklodekstrinlerle NH_2 yapısının olduğu kısımdan kompleks oluşturduğundan, SEF:CD komplekslerine ait FTIR spektrumlarında N-H titreşimleri kaybolmuştur. SEF trihidrata ait $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ 'de (parmak izi bölgesi) görülen piklerin, SEF:CD kompleksi halinde tamamen kaybolduğu görülmektedir. O bölgede asidik ve amidik C=O titreşimleri, C=C çifte bağ titreşimleri, C-S titreşimleri görülmektedir. Bu iki bilgi ışığında, SEF trihidrat ya tamamen siklodekstrin kavitesi içerisine girmiş, ya da tiyazol halkası dışında kalan kısımdan siklodekstrin kavitesi içerisine dahil olmuştur şeklinde yorumlanabilir.

SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD inklüzyon kompleksleri açısından değerlendirildiğinde ise, siklodekstrinler arasında FTIR spektrumları açısından çok büyük bir farklılık görülmemiştir.

5.5.2. Inklüzyon Komplekslerinin X-Işını Kırınımı Analizleri

X-ışını kırınımı analizi, hazırlanan inklüzyon kompleksleri ve fiziksel karışımlarda etkin maddenin kristal halde bulunup bulunmadığının ve kristal miktarında azalma olup olmadığının tespiti amacıyla yapılmıştır. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da hazırlanan komplekslerin, fiziksel karışımların ve SEF trihidratın tek başına verdiği kristalogramlar, siklodekstrin türevlerine göre gruplandırılarak verilmiştir.

Fiziksel karışımlar da dahil olmak üzere, SEF trihidratın 2 teta açısı $20 - 40$ derece arasında verdiği kristal piklerin küçüldüğü gözlenmektedir. Fiziksel karışımlarda bu küçülmenin daha az olduğu gözlenirken, yoğurma yöntemi ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinde kristal piklerin neredeyse tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Kristal piklerindeki bu azalma, siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşumunun bir göstergesidir (175). Fiziksel karışımda gözlenen, kristal piklerin şiddetindeki azalma, SEF trihidrat konsantrasyonunun siklodekstrin ile seyrelmiş olmasından kaynaklanabilir.

Norflurazon ve β -CD kullanılarak yapılan bir çalışmada, X-ışını kırınımı analiz sonuçları incelendiğinde, bu tez çalışmasına benzer nitelikte sonuçlar elde edilmiştir (176). İlaç etkin maddesine ilişkin kristal piklerin kaybolması, inklüzyon kompleksi oluşumu şeklinde yorumlanmıştır.

Kristal piklerindeki en belirgin azalmanın yoğurma yöntemi ile elde edildiği gözlenmiştir fakat siklodekstrin türevleri arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir .

5.5.3. Inklüzyon Komplekslerinin DSC Analizleri

Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, inklüzyon kompleksi oluşumuyla SEF trihidratın erime pikindeki değişikliklerin incelenmesi amacıyla test edilmiştir. SEF, Bölüm 4.4.3'te bahsedildiği üzere yaklaşık olarak sırasıyla, 104°C, 180°C ve 250°C'de 1 egzotermik ve 2 endotermik pik vermektedir. Inklüzyon komplekslerine ve fiziksel karışımlara ilişkin DSC termogramları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.20'de verilmiştir.

İlaç molekülleri siklodekstrin kavitesi içerisine girdiklerinde, erime, kaynama noktalarına ait piklerindeki kaybolma veya azalma, muhtemel bir ilaç:siklodekstrin etkileşiminin bir göstergesidir (155,177,178).

SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD ile her iki yöntemle (yoğurma, birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma) hazırlanan inklüzyon komplekslerine ait DSC termogramları incelendiğinde, SEF trihidrata ait olan 1 egzotermik 2 endotermik pikin, hemen hemen kaybolduğu gözlenmektedir. Fiziksel karışımlarda ise SEF trihidrat erime piklerinde küçülme gözlenmektedir. Bu sonuçlara göre, ilaç:siklodekstrin arasında bir etkileşme olduğu ve inklüzyon komplekslerinin oluşumu gerçekleştiği şeklinde yorumlanabilir (155,179).

5.5.4. Inklüzyon Komplekslerinin ¹H-NMR Spektrumu

Konuk molekül siklodekstrin kavitesi içerisine girdiğinde, siklodekstrin protonlarının NMR spektrumlarında kayma gözlenmektedir. Bu kaymalar, özellikle H3 ve H5 protonlarında olduğunda, inklüzyon kompleksi oluşumuyla yorumlanmaktadır (180,181). Tablo 4.10'da HP- β -CD ve M- β -CD'in ve hazırlanan inklüzyon komplekslerinin kayma değerleri verilmiştir.

Bu değerler incelendiğinde, her iki siklodekstrin için de yoğurma yöntemiyle H3 ve H5 protonlarındaki kaymanın, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, yoğurma yöntemi ile inklüzyon kompleksi oluşumunun, birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemine göre daha etkili olduğu şeklinde yorumlanabilir. HP- β -CD ve M- β -CD ile oluşturulan komplekslerin NMR spektrumları karşılaştırıldığında ise, HP- β -CD ile oluşturulan komplekslerin H3 ve H5 protonlarındaki kaymanın daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durumda, HP- β -CD ile yoğurma yöntemiyle hazırlanan komplekslerin daha etkin olduğu söylenebilir.

Literatürde, omeprazol, M- β -CD ve β -CD kullanılarak yapılan bir çalışmada, M- β -CD ile hazırlanan komplekslerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında daha fazla kayma görülmüştür. Bu durum, M- β -CD ile kompleks etkinliğinin daha fazla olduğu şeklinde yorumlanmıştır (182). Zolpidem, M- β -CD ve HP- β -CD kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise, HP- β -CD kullanılarak hazırlanan komplekslerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında daha fazla kayma görüldüğü gözlenmiştir (183).

5.5.5. Inklüzyon Komplekslerinin SEM Görüntüleri

SEF trihidrata, siklodekstrinlere, hazırlanan inklüzyon komplekslerine ve fiziksel karışımlara ilişkin SEM görüntüleri Şekil 4.29 – 4.36’da verilmiştir. SEM görüntülerinde, SEF trihidratın kristal yapıda olduğu görülmektedir. Siklodekstrinlerin amorf yapıda oldukları da SEM görüntüleri ile gözlenebilmektedir. Fiziksel karışımlarda hem siklodekstrinin amorf yapısı, hem de SEF trihidratın kristal yapısı gözlenebilmektedir. Bu da fiziksel karışımlarda inklüzyon kompleksi oluşmadığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Fakat inklüzyon komplekslerinde, hem siklodekstrinlerin amorf yapısından uzak hem de SEF trihidratın kristal yapısından daha farklı görünen yeni bir yapı gözlenmektedir. Bu yeni oluşum inklüzyon kompleksi oluşumunun bir göstergesi olabilir.

Birlikte çöktürme ve birlikte dondurarak kurutma yöntemi ve yoğurma yöntemi arasında, oluşan yapı açısından çok büyük farklılık gözlenmemiştir. Kullanılan siklodekstrinler arasında da SEM görüntüleri açısından belirgin bir farklılık görülmemiştir.

Literatür incelendiğinde, omeprazol ve M- β -CD ile yapılan bir çalışmada, fiziksel karışım ile CD partiküllerinin yüzeyine tutunmuş omeprazol kristalleri gözlenmiştir. Yoğurma ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yönteminde ise, bileşenlerin tek başlarına sahip oldukları şekillere benzemeyen ve kristalliği azalmış görüntüler elde edilmiştir (184). Ropivakain ve HP- β -CD kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise, SEM görüntüleri ile kompleks oluşumu ve komplekslerin morfolojisi gözlenebilmiştir. İnklüzyon kompleksi oluşumuyla, ilaç ve CD yapısına benzemeyen yapılar oluşmuş, bu da inklüzyon kompleksi oluşumu şeklinde yorumlanmıştır (185).

5.6. SEF ve Formülasyonların Çözünme Deneyleri

Çözünme, absorpsiyonun birinci basamağını oluşturmaktadır. Bu nedenle, çözünürlükteki değişikliklerin incelenmesi, absorpsiyon ve biyoyararlanım hakkında fikir edinmemizi sağlayacaktır. Bu amaçla, SEF trihidrat için Bölüm 3’de açıklanan çözünme deneyleri gerçekleştirilmiştir.

SEF trihidratın HP- β -CD, M- β -CD, α -CD, β -CD, γ -CD kullanılarak yoğurma (*kneading*) yöntemi ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma (*coprecipitation-colyophilisation*) yöntemi ile hazırlanan inklüzyon komplekslerine çözünme testi uygulanmıştır. Çözünme testi bulguları Tablo 4.11’de verilirken, çözünme profilleri Şekil 4.37 – 4.43’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde;

- Bütün siklodekstrinler için çözünürlükteki en fazla artış yoğurma yöntemi ile sağlanmıştır
- SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD ile çözünürlük SEF trihidratın kendi çözünürlük profilinden daha iyi bulunurken, doğal siklodekstrinlerle bu başarı sağlanamamış, çözünürlük daha düşük bulunmuştur.
- Siklodekstrinler her iki yöntem için de SEF trihidrat çözünürlüğünü artırmaları açısından sıralandığında aşağıdaki durum ile karşılaşmıştır.



Siklodekstrinlerin, hidrofobik ilaçların çözünürlüklerini, dolayısıyla absorpsiyon ve biyoyararlanımlarını artırdıkları bilinmektedir (183). Siklodekstrinlerle kompleks haline getirilen ilaç etkin maddelerinin çözünürlüklerinin artırılmasının temelinde etkin maddenin kristalizasyona yatkınlığının azalması ve çözünürlüğünün artması bulunmaktadır (186). Siklodekstrinlerin çözünmeyi artırıcı etkileri, sudaki yüksek çözünürlükleri, amorf yapıları, ıslanabilirliği artırmaları ve kompleks oluşturma etkinlikleri ile artış göstermektedir (56). Bu nedenle, siklodekstrin türevlerinin çözünürlük artırıcı etkileri, doğal siklodekstrinlere göre çok daha iyi bulunmuştur.

5.7. Tablet Formülasyonlarının Hazırlanması

SEF oral yoldan kullanılan sefalosporin grubu bir antibiyotiktir. Piyasada pek çok tablet ve süspansiyon tipi dozaj şekli mevcuttur. Bu çalışmada referans alınan ürün SEF'in ticari preparatıdır. Siklodekstrinler ile inklüzyon kompleksi oluşturularak, çözünürlüğün siklodekstrin türevleri tarafından iyileşmesinin çözünme testi ile gösterilmesinin ardından, SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD ile yoğurma yöntemi ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinden, tablet formülasyonu hazırlanmış, bu tablet formülasyonu referans tablet ile çözünme hızları ile ilgili olarak karşılaştırılmıştır.

SEF'in ticari preparatının formülasyonunda; mikrokristalize selüloz, prejelatinize nişasta, dibazik kalsiyum fosfat, magnezyum stearat, hidroksipropil metil selüloz, sodyum lauril sülfat ve titanyum dioksit bulunmaktadır.

Literatürde, flurbiprofenin çözünürlüğünün artırılması amacıyla, β -CD, HP- β -CD ve M- β -CD ile inklüzyon kompleksleri oluşturulmuş ve çözünürlük β -CD ile 16 kat M- β -CD ile 110 kat artırılmıştır (187). Selekoksible yapılan başka bir çalışmada ise β -CD ile çözünürlüğün 2 kat artırıldığı gösterilmiştir (188). Fenitoinle yapılan bir çalışmada ise HP- β -CD ile çözünürlüğün 8 kat arttığı (189), rapamisinle yapılan

başka bir çalışmada ise çözünürlüğün β -CD ile 5 kat artarken M- β -CD 270 kat arttığı gözlenmiştir (47).

Siklodekstrinler biyoyumludurlar ve çok yönlü çeşitli özelliklerinden dolayı çeşitli ilaç uygulamalarında kullanılabilirler. Oral ilaç uygulamasında, hidrofilik ve iyonize olabilen siklodekstrinler ani salım formülasyonları için uygun taşıyıcılarken, hidrofobik siklodekstrinler suda çözünürlüğü yüksek ilaçların salımını geciktirerek geciktirilmiş salım formülasyonlarında kullanılabilirler (115). Hidrofilik siklodekstrinler için pek çok farmakolojik gruptaki ilacın oral biyoyararlanımını düzelttikleri bildirilmiştir. HP- β -CD'in albendazol, ketoprofen, fenitoinin çözünürlük ve çözünme hızını artırdığı bilinmektedir (45).

SEF trihidratın çözünürlük ve dolayısıyla biyoyararlanımının artırılmasının amaçlandığı bu çalışmada SEF:HP- β -CD ve SEF:M- β -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri kullanarak tablet basılmıştır. Kompleksler karakterizasyon ve çözünme deney sonuçlarına göre en iyi yöntem olarak görünen yoğurma (*kneading*) yöntemi ile hazırlanmıştır. Formülasyonda avicel pH 102 seyeltici doldurucu, mısır nişastası dağıtıcı ve magnezyum stearat kaydırıcı olarak kullanılmıştır.

5.8. Tabletlerin Çözünme Deneyleri

SEF'in referans tablet ve hazırlanan SEF:HP- β -CD ve SEF: M- β -CD tabletlerin çözünme deneyleri Bölüm 3.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. SEF'in, USP 30 ve FDA tarafından kabul edilen yöntem kullanılarak çözünme testi gerçekleştirilmiştir. Farmakope ve FDA tarafından verilen çözünme ortamı, SEF için pH 7,2 fosfat tamponudur. Buna alternatif olarak, su ortamında da çözünme deneyleri yapılmıştır.

Çözünme testi;

- Kritik formülasyon ve üretim değişkenlerinin saptanmasında,
- En iyi formülasyonun seçilmesinde,
- Stabilitate çalışmaları sırasında oluşan değişikliklerin kontrolü,
- Kalite kontrol,

- Farmasötik dozaj formlarının benzerliğinin kıyaslanabilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır (190) .

Çözünme testi, bazı durumlarda biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik testlerinin yerini tutabilmektedir (Küçük ekipman veya formülasyon değişikliği, aynı ilacın farklı dozlarında, üretim yeri değişikliğinde, üretimin büyütülmesi durumunda) (191). Benzerlik faktörü, f_2 , FDA tarafından çözünme hız profillerinin karşılaştırılmasında tavsiye edilen, test ve referans ürüne ilişkin benzerliği inceleyen, bir karşılaştırma yöntemidir (192,193) . FDA ve EMA, iki çözünme profilinin f_2 benzerlik faktörü 50 ile 100 arasındaysa, karşılaştırılan iki ürünü benzer olarak nitelendirmektedir (194). Benzerlik faktörü (f_2) test ya da referans maddenin % 85'inden fazlasının çözünmesinden sonra da hassasiyet göstermektedir (193).

Söz konusu tez çalışması kapsamında, hazırlanan tablet formülasyonları ve SEF'in referans tabletinin çözünme profillerinin kıyaslanmasında hem f_1 farklılık faktörü hem de f_2 benzerlik faktörü kullanılmıştır. 0-15 arasındaki f_1 değerleri için çözünme profilleri arasında fark olmadığı söylenirken, bu değer 15'ten büyük olduğunda profiller birbirinden farklıdır (192).

SEF:HP- β -CD ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri ile basılan tabletlerin çözünme profilleri, referans tablet ile kıyaslandığında pH 7,2 fosfat tamponunda f_1 ve f_2 değerleri sırasıyla, 5 ve 67; su ortamında ise 84 ve 24 olarak bulunmuştur. SEF:M- β -CD için ise pH 7,2 fosfat tamponunda f_1 ve f_2 değerleri sırasıyla 12 ve 50, su ortamında ise 59 ve 29 olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere, pH 7,2 fosfat tamponunda f_1 ve f_2 değerlerine göre yorum yapıldığında, her iki CD türevi için de çözünme profillerinin referans tablet ile benzer olduğu söylenebilmektedir. Su ortamında ise, çözünme profillerinin birbirine benzemediği sonucuna ulaşılabilir. Bunun nedeni, referans tabletlerin, su ortamında çözünmemesine rağmen, CD ile oluşturulan komplekslerin, su ortamında da pH 7,2 fosfat tamponunda olduğu gibi çözünebilmesidir.

Burada, çözünme testi için *sink koşul* terimine değinmek gerekmektedir. Etkin madde için çözünme ortamı, çözünme deneyinin amacına göre farklılık göstermektedir. Sink koşul, ilacın doygun çözeltisinin hazırlanabilmesi için gerekli

olan ortam hacminin 3 katı hacimde ortam kullanılması gerektiğini ifade eder. SEF için farmakopede verilen yöntem, pH 7,2 fosfat tamponudur. Çözünme testi, su ortamında gerçekleştirildiğinde, sink koşul sağlanamamaktadır (195). Fakat, söz konusu çalışma kapsamında, SEF'in sudaki çözünürlüğünün artırılması amaçlandığından, çözünme deneyleri su ortamında da gerçekleştirilmiştir. pH 7.2 fosfat tamponunda ise CD kompleksleri için sink koşula ulaşılamaz.

5.9. SEF trihidratın Antibakteriyel Etkinlik Testi

SEF trihidratın ve hazırlanan formülasyonların Bölüm 3.8'de anlatıldığı şekilde antibakteriyel etkinlik testi yapılmış, MİK (minimum inhibe edici konsantrasyon, $\mu\text{g}/\text{mL}$) değerleri belirlenmiştir. MİK değerlerine ilişkin bulunan sonuçlar Bölüm 4.7'de verilmiştir. *Escherichia coli* üzerinde yapılan test sonucunda SEF trihidrata ilişkin MİK değeri literatürle uyumlu şekilde olması gereken aralıkta bulunmuştur (0,06 - 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (196) . SEF trihidratın ve hazırlanan formülasyonların MİK değerleri kıyaslandığında, inklüzyon kompleksi oluşumuyla SEF trihidratın antibakteriyel etkisinde azalma olmadığı söylenebilir. Yani siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşumu, SEF trihidratın antibakteriyel etkisini kaybettirmemekte aksine inklüzyon kompleksi oluşumu ile SEF trihidratın tek başına sahip olduğu MİK değerinden daha düşük değerlerde MİK değerlerine ulaşabilmektedir. Literatürde, itrakonazol ile itrakonazol:CD inklüzyon kompleksleri açısından MİK değerleri incelendiğinde, herhangi bir ilişki bulunamamıştır (197). Geniş spektrumlu bakteriyostatik bileşik trimetoprimle, β -CD ve HP- β -CD kullanılarak oluşturulan inklüzyon kompleksleri, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinlikleri açısından karşılaştırılmıştır. İlaç:CD inklüzyon komplekslerinde, MİK değerleri daha düşük bulunmuştur. Bu durum, inklüzyon komplekslerinin, ilacın antimikrobiyal aktivitesini artırdığı şeklinde yorumlanmıştır (198).

5.10. Caco-2 Hücreler ile SEF trihidrat Permeabilite Çalışmaları

BCS, ilaçların in vivo farmakokinetik performanslarının tahmin edilebilmesi amacıyla geliştirilmiş, ilaçların sudaki çözünürlüklerine ve intestinal permeabilitelerine göre sınıflandırıldıkları bir bilimsel çerçevedir (135,199). BCS'ye göre bir ilacın yüksek permeabilite gösterdiğini söyleyebilmek için % 90 veya daha fazlasının absorplanması gerekmektedir (134). Permeabilite tayini için insanlarda yapılan permeabilite çalışmaları, in vivo veya in situ hayvan modellerini, insan perfüzyon verilerini veya in vitro hücre kültürü modelleri üzerinde çalışılabilmektedir (136).

In vitro hücre kültürü çalışmalarında Caco-2 hücreler, MDCK hücreleri, LLC-PK1 hücreleri, 2/4/A1 hücreleri, TC-7 hücreleri, HT-29 hücreleri, IEC-18 gibi çeşitli hücrelerle çalışılabilmektedir (200).

Caco-2 hücreleri, yukarıda bahsedilen ve permeabilite çalışmalarında kullanılan hücreler arasında, çok iyi karakterize edilmiş olan bir hücre kültürü modelidir (146,201,202). Caco-2 hücreleri, kültür ortamında spontane olarak enterosit farklılaşmasına uğramaktadır. İlaçların intestinal permeabilite kabiliyetleri, Caco-2 hücre tek tabakalarından permeabilitesi ile körele olduğu için, Caco-2 hücreleri, insanlarda oral absorpsiyonun tahmin edilebilmesi için kullanılabilir.

Bu tez çalışması kapsamında; α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD ile birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemleri ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri ile Caco-2 hücrelerden permeabilite çalışması yapılmıştır. SEF trihidratın Caco-2 hücre kültürü çalışmalarında, literatürde çalışılan dozu olan 1 mM ile çalışılmıştır (203). Her siklodekstrin türevi için birlikte çöktürme-birlikte dondurarak kurutma ve yoğurma yöntemleriyle hazırlanan inklüzyon kompleksleri HBSS'de çözülüp, apikal yüze 0,5 mL olarak uygulanmış, bazolateral yüze 1 mL HBSS elenmiştir. SEF trihidrat ve inklüzyon komplekslerinin apikalden bazolaterale geçiş görünür permeabilite katsayıları P_{app} , Tablo 4.16 ve Şekil 4.48'de gösterilmiştir. SEF trihidrat P_{app} katsayısı SEF:HP- β -CD komplekslerinin P_{app}

katsayısı ile karşılaştırıldığında, özellikle yoğurma yöntemi ile permeabilitede gözle görülür bir artış sağlandığı gözlenmektedir.

Söz konusu çalışmada, faz çözünürlük ve çözünme deneyleri α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD ile denenmiştir. Siklodeskrinlerin SEF'in çözünürlüğünü sulu ortamda 2 katına kadar çıkardığı gözlenmiştir. Özellikle yoğurma yöntemi ile elde edilen SEF: HP- β -CD inklüzyon kompleksleri ile hem çözünme çalışmaları hem de Caco-2 permeabilite çalışmalarında en iyi sonuçlar elde edilmiştir. α -CD, β -CD ve γ -CD'in faz çözünürlük diagramları B tipi bulunmuş, ayrıca çözünürlük ve permeabiliteyi iyileştirmedikleri de gözlenmiştir. Faz çözünürlük çalışmalarından da görüldüğü üzere, ilacın çözünürlüğünü bir noktaya kadar artırmış sonrasında bir artış görülmemiştir. α -CD, β -CD ve γ -CD, intramoleküler hidrojen bağları nedeniyle çözünürlükleri siklodekstrin türevlerine göre daha düşük olan siklodekstrinlerdir (82). Bu da çözünme profillerinin neden HP- β -CD ve M- β -CD çözünme profilinin altında kaldığının gerekçesi olarak sunulabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

SEF, 3. kuşak sefalosporinlere dahil olan BCS'de Sınıf IV bir ilaçtır. Bu nedenle çözünürlüğü ve permeabilitesi düşüktür. Çözünürlük, bir ilacın absorpsiyonu ve biyoyararlanımında en önemli basamaklardan biridir. Bu tez çalışması kapsamında;

- SEF'in çözünürlük ve permeabilitesinin artırılması amacıyla 5 siklodekstrin (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD ve M- β -CD) denenmiştir. Siklodekstrinlerin, konuk moleküllerin hidrofobik kısımlarını internal kavileri içerisine hapsederek inklüzyon kompleksi oluşturma özelliklerinden yararlanılmıştır. Inklüzyon kompleksi oluşumu için 2 yöntem (yoğurma ve birlikte çöktürme birlikte dondurarak kurutma yöntemleri) denenmiştir.
- Hazırlanan komplekslerin karakterizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan formülasyonların FTIR spektrumu kaydedilmiş, X-ışını kırınımı analizi yapılmış, diferansiyel taramalı kalorimetrik (DSC) analizi gerçekleştirilmiş, ¹H-NMR çözümü yapılmış ve SEM görüntüleri elde edilmiştir.
- Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, inklüzyon kompleksi hazırlanmasında en uygun yöntemin yoğurma yöntemi olduğu görülmüştür.
- Yoğurma yöntemi ile hazırlanan SEF: HP- β -CD ve SEF: M- β -CD inklüzyon komplekslerinden hazırlanan tablet formülasyonları ile SEF referans preparatının çözünme profilleri karşılaştırılmıştır. Çözünürlükteki en yüksek artış SEF: HP- β -CD inklüzyon kompleksleri ile sağlanmıştır.
- SEF'in antibakteriyel etkinliğinin, inklüzyon kompleksi oluşumuyla kaybolmadığının gösterilmesi amacıyla E.coli üzerinde MİK ölçümü gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak hazırlanan inklüzyon komplekslerinde SEF'in etkinliğinin kaybolmadığı görülmüştür.
- Çözünürlüğü ve çözünme hızı siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşumu ile artırılan SEF'in intestinal absorpsiyonunda artış olup olmadığının gösterilmesi amacıyla, gastrointestinal ilaç absorpsiyonu için önemli bir çalışma modeli olan Caco-2 hücrelerden geçişleri incelenmiştir. Caco-2

hücrelerden geçiş çalışmaları, SEF:HP- β -CD inklüzyon kompleksi oluşumu ile in vitro permeasyonun da artırıldığı görülmüştür.

SEF'in siklodekstrinlerle, özellikle de HP- β -CD ile inklüzyon kompleksinin oluşturulması ile çözünürlüğün ve in vitro permeasyonun artırılabilirdiği gösterilmiştir.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, şimdiye kadar elde edilen olumlu verilerin ışığında, SEF:CD inklüzyon kompleksi oluşumunun biyoyararlanım üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla in vivo deneyler yapılarak, çalışmanın ilerletilebileceği düşünülmektedir. Elde edilen veriler, bütün CD'ler ve CD türevleri için olmasa da, SEF:CD kompleksleşmesi ile in vitro ortamda yapılan çözünme deney sonuçları, in vivo biyoyararlanımın artabileceği doğrultusunda umut vaad etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Page, M.G. (2012). Beta-lactam antibiotics. Antibiotic Discovery and Development (s. 79-117): Springer
2. Shaw, S.P. (2009). Chapter 195 - Penicillins and Cephalosporins. C. S. Deborah, Dvm, V. Dac & B. M. V. S. D. A. C. V. Kate Hopper (Ed.). Small Animal Critical Care Medicine (s. 828-829). Saint Louis: W.B. Saunders
3. Saxon, A., Beall, G.N., Rohr, A.S.,Adelman, D.C. (1987) Immediate hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics. *Annals of internal medicine*, 107 (2), 204-215.
4. Suárez, C.,Gudiol, F. (2009) [Beta-lactam antibiotics]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, 27 (2), 116-129.
5. Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F.,Mobashery, S. (2010) The future of the β -lactams. *Current opinion in microbiology*, 13 (5), 551-557.
6. Scholar, E. (2007). Cephalosporins. S. J. E. Editors-in-Chief: & B. B. David (Ed.). xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference (s. 1-4). New York: Elsevier
7. A Tamura, R.O., T Yoshida, H Yamamoto, S Kondo, M Inoue, S Mitsuhashi. (1988) In vitro and in vivo antibacterial activities of ME1207, a new oral cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 32 (9), 1421-1426.
8. Maddison, J.E., Watson, A.D.J.,Elliott, J. (2008). Chapter 8 - Antibacterial drugs. E. M. Jill, B. V. D. P. F. MRCVS, W. P. Stephen, B. S. B. M. M. MACVSc & B. P. M. I. M. David B Church (Ed.). Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition) (s. 148-185). Edinburgh: W.B. Saunders
9. Mallick, S., Mondal, A.,Sannigrahi, S. (2008) Kinetic measurements of the hydrolytic degradation of cefixime: effect of Captisol complexation and water-soluble polymers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60 (7), 833-841.

10. Brahmaiah, B., Nama, S., Rao, C.B. (2013) Enhancement of Dissolution Rate of Cefixime Trihydrate by using various Solid dispersion Techniques. *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*, 4 (3), 140-147.
11. Organization, W.H. (2006). Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms (Rapor No): Technical Report Series.
12. Markham, A., Brogden, R.N. (1995) Cefixime. *Drugs*, 49 (6), 1007-1022.
13. Castle, S.S. (2007). Cefixime. S. J. Enna & D. B. Bylund (Ed.). *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (s. 1-5). New York: Elsevier
14. Genvresse, I., Carbon, C. (1993) Cefixime. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 3 (1), 1-16.
15. Martindale, W., Parfitt, K., Britain, R.P.S.o.G. (1999). *Martindale: the complete drug reference: Pharmaceutical press London*.
16. Del Rosso, J.Q. (2003) Oral cephalosporin antibiotics: an overview of clinical pharmacology and dermatologic applications. *Cutis*, 71 (2), 153-157.
17. Brogden, R.N., Campoli-Richards, D.M. (1989) Cefixime. *Drugs*, 38 (4), 524-550.
18. Faulkner, R.D., Yacobi, A., Barone, J.S., Kaplan, S.A., Silber, B.M. (1987) Pharmacokinetic profile of cefixime in man. *The Pediatric infectious disease journal*, 6 (10), 963-970.
19. Faulkner, R., Bohaychuk, W., Lanc, R., Haynes, J., Desjardins, R., Yacobi, A. ve diğerleri. (1988) Pharmacokinetics of cefixime in the young and elderly. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 21 (6), 787-794.
20. Talebpour, Z., Pourabdollahi, H., Rafati, H., Abdollahpour, A., Bashour, Y., Aboul-Enein, H.Y. (2013) Determination of Cefixime by a Validated Stability-Indicating HPLC Method and Identification of its Related Substances by LC-MS/MS Studies. *Sci Pharm*, 81 (2), 493-503.
21. Khan, A., Iqbal, Z., Khan, M.I., Javed, K., Khan, A., Ahmad, L. ve diğerleri. (2011) Simultaneous determination of cefdinir and cefixime in human plasma

- by RP-HPLC/UV detection method: Method development, optimization, validation, and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 879 (24), 2423-2429.
22. Shah, P.B.,Pundarikakshudu, K. (2006) Spectrophotometric, difference spectroscopic, and high-performance liquid chromatographic methods for the determination of cefixime in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC international*, 89 (4), 987-994.
 23. Jain, R., Gupta, V.K., Jadon, N.,Radhapyari, K. (2010) Voltammetric determination of cefixime in pharmaceuticals and biological fluids. *Analytical biochemistry*, 407 (1), 79-88.
 24. Honda, S., Taga, A., Kakehi, K., Koda, S.,Okamoto, Y. (1992) Determination of cefixime and its metabolises by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 590 (2), 364-368.
 25. XXII, U.P.,XVII, N. (1990) US Pharmacopeial convention. *Rockville, Md*, 1788-1789.
 26. Liu, G., Sha, R., Gao, S., Shen, Y.,Wang, S. (1992) [Determination of cefixime in human plasma and urine using high performance liquid chromatography column switching technique]. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica*, 28 (3), 216-221.
 27. Kurkov, S.V.,Loftsson, T. (2013) Cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics*, 453 (1), 167-180.
 28. Duchêne, D. (2011) Cyclodextrins and their inclusion complexes. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, 1-18.
 29. Bender, M.L.,Komiyama, M. (1978). Cyclodextrin chemistry (c. 820): Springer-Verlag Berlin.
 30. J Otero-Espinar, F.,Blanco-Mendez, J. (2014) Editorial (Thematic Issue: Natural & Synthetically-Modified Cyclodextrins and Polymers in Drug Delivery Systems). *Current topics in medicinal chemistry*, 14 (4), 463-464.

31. Brewster, M.E., Loftsson, T. (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (7), 645-666.
32. Loftsson, T., Brewster, M.E. (2010) Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62 (11), 1607-1621.
33. Nitalikar, M.M., Sakarkar, D.M., Jain, P.V. (2012) The cyclodextrins: a review. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 10 (1), 01-06.
34. Çirpanli, Y., Bilensoy, E., Lale Doğan, A., Çaliş, S. (2009) Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73 (1), 82-89.
35. Laza-Knoerr, A., Gref, R., Couvreur, P. (2010) Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 18 (9), 645-656.
36. Davis, F., Higson, S. (2011) Cyclodextrins. *Macrocycles: Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications*, 190-254.
37. Irie, T., Uekama, K. (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of pharmaceutical Sciences*, 86 (2), 147-162.
38. Gould, S., Scott, R.C. (2005) 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): a toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*, 43 (10), 1451-1459.
39. Antlsperger, G., Schmid, G. (1996). Toxicological comparison of cyclodextrins [Bildiri]. Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins.
40. Szente, L., Szejtli, J., Kis, G.L. (1998) Spontaneous opalescence of aqueous γ -Cyclodextrin solutions: Complex formation or self-aggregation? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87 (6), 778-781.
41. Thompson, D.O. (1997) Cyclodextrins—enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 14 (1).

42. Bilensoy, E. (2011). Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics, and biomedicine: current and future industrial applications: John Wiley & Sons.
43. Loftsson, T., Brewster, M.E. (2011) Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63 (9), 1119-1135.
44. Zhang, X., Zhang, C., Sun, G., Xu, X., Tan, Y., Wu, H. ve diğeri. (2012) Cyclodextrins and Their Derivatives in the Resolution of Chiral Natural Products: a Review. *Instrumentation Science & Technology*, 40 (2-3), 194-215.
45. Rasheed, A., Kumar, A., Sravanthi, V. (2008) Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review. *Sci Pharm*, 76, 567-598.
46. Loftsson, T., Brewster, M.E. (2012) Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101 (9), 3019-3032.
47. Rouf, M.A., Vural, I., Bilensoy, E., Hincal, A., Erol, D.D. (2011) Rapamycin-cyclodextrin complexation: improved solubility and dissolution rate. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70 (1-2), 167-175.
48. Liu, L., Guo, Q.-X. (2002) The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 42 (1-2), 1-14.
49. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *Aaps Pharmscitech*, 6 (2), E329-E357.
50. Albers, E., Muller, B.W. (1995) Cyclodextrin derivatives in pharmaceuticals. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 12 (4), 311-337.
51. Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., Masson, M. (2005) Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 302 (1), 18-28.

52. Memisoglu-Bilensoy, E., Bochot, A., Trichard, L., Duchene, D., Hincal, A. (2005) Amphiphilic cyclodextrins and microencapsulation. *Microencapsulation-2nd and Revised Edition*, 269-295.
53. Aigner, Z., Berkesi, O., Farkas, G., Szabó-Révész, P. (2012) DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 62-67.
54. Manolikar, M., Sawant, M. (2003) Study of solubility of isotretinoin by its complexation with β -cyclodextrin. *Chemosphere*, 51 (8), 811-816.
55. Santos, E.H., Kamimura, J.A., Hill, L.E., Gomes, C.L. (2014) Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Science and Technology*.
56. Fernandes, C.M., Teresa Vieira, M., B Veiga, F.J. (2002) Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine–cyclodextrins inclusion compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15 (1), 79-88.
57. Takahashi, A.I., Veiga, F.J.B., Ferraz, H.G. (2012) A Literature Review Of Cyclodextrin Inclusion Complexes Characterization-Part Iii: Differential Scanning Calorimetry And Thermogravimetry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research*, 12 (1).
58. Singh, R., Bharti, N., Madan, J., Hiremath, S. (2010) Characterization of cyclodextrin inclusion complexes—a review. *J. Pharm. Sci. Technol.*, 2 (3), 171-183.
59. Huang, L., Allen, E., Tonelli, A.E. (1999) Inclusion compounds formed between cyclodextrins and nylon 6. *Polymer*, 40 (11), 3211-3221.
60. Leuner, C., Dressman, J. (2000) Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (1), 47-60.

61. Mallick, S., Pattnaik, S., Swain, K., De, P.K. (2007) Current perspectives of solubilization: Potential for improved bioavailability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33 (8), 865-873.
62. Becket, G., Schep, L.J., Tan, M.Y. (1999) Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 179 (1), 65-71.
63. Vavia, P.R., Adhage, N.A. (1999) Inclusion complexation of nimesulide with β -cyclodextrins. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25 (4), 543-545.
64. Moyano, J., Ginés, J., Arias, M., Rabasco, A. (1995) Study of the dissolution characteristics of oxazepam via complexation with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 114 (1), 95-102.
65. Uekama, K., Fujinaga, T., Otagiri, M., Seo, H., Tsuruoka, M. (1981) Enhanced bioavailability of digoxin by gamma-cyclodextrin complexation. *Journal of Pharmacobio-dynamics*, 4 (9), 735-737.
66. Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J. ve diğerleri. (2007) γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (2), 245-255.
67. Moriwaki, C., Costa, G., Ferracini, C., de Moraes, F., Zanin, G., Pineda, E. ve diğerleri. (2008) Enhancement of solubility of albendazole by complexation with β -cyclodextrin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25 (2), 255-267.
68. Arima, H., Yunomae, K., Miyake, K., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K. (2001) Comparative studies of the enhancing effects of cyclodextrins on the solubility and oral bioavailability of tacrolimus in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (6), 690-701.
69. Loftsson, T., Stefansson, E. (1997) Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 23 (5), 473-481.

70. Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konráðsdóttir, F. (2007) Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (10), 2532-2546.
71. Uekama, K. (2004) Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52 (8), 900-915.
72. Acartürk, F., Çelebi, N. (2011) Cyclodextrins as bioavailability enhancers. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, 45-64.
73. Dahan, A., Miller, J.M. (2012) The solubility–permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. *The AAPS journal*, 14 (2), 244-251.
74. Loftsson, T., Sigfússon, S., Sigurdsson, H., Másson, M. (2003) The effects of cyclodextrins on topical delivery of hydrocortisone: the aqueous diffusion layer. *STP pharma sciences*, 13 (2), 125-131.
75. Irie, T., Wakamatsu, K., Arima, H., Aritomi, H., Uekama, K. (1992) Enhancing effects of cyclodextrins on nasal absorption of insulin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 84 (2), 129-139.
76. Loftsson, T., Masson, M. (2001) Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics*, 225 (1), 15-30.
77. Veiga, F., Figueiras, A.R., Vieira, A. (2011) Oral Drug Delivery with Cyclodextrins. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, 177-196.
78. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6 (2), E329-357.
79. Benet, L.Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J.A., Wachter, V.J. (1999) Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 62 (1), 25-31.
80. Arima, H., Yunomae, K., Morikawa, T., Hirayama, F., Uekama, K. (2004) Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of

- dimethyl- β -cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research*, 21 (4), 625-634.
81. Yunomae, K., Arima, H., Hirayama, F., Uekama, K. (2003) Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells. *FEBS letters*, 536 (1), 225-231.
 82. Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T. (1998) Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical reviews*, 98 (5), 2045-2076.
 83. Matsuda, H., Arima, H. (1999) Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36 (1), 81-99.
 84. Loftsson, T., Sigurdardóttir, A.M. (1996). Cyclodextrins as skin penetration enhancers [Bildiri]. Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins.
 85. Babu, R., Pandit, J. (2004) Effect of cyclodextrins on the complexation and transdermal delivery of bupranolol through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 271 (1), 155-165.
 86. Loftsson, T., Brewster, M.E., Másson, M. (2004) Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *American Journal of Drug Delivery*, 2 (4), 261-275.
 87. Rajewski, R.A., Stella, V.J. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85 (11), 1142-1169.
 88. Nicolazzi, C., Venard, V., Le Faou, A., Finance, C. (2002) In vitro antiviral efficacy of the ganciclovir complexed with β -cyclodextrin on human cytomegalovirus clinical strains. *Antiviral Research*, 54 (2), 121-127.
 89. Ueda, H., Ou, D., Endo, T., Nagase, H., Tomono, K., Nagai, T. (1998) Evaluation of a sulfobutyl ether β -cyclodextrin as a solubilizing/stabilizing agent for several drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24 (9), 863-867.

90. Lutka, A., Koziara, J. (1999) Interaction of trimeprazine with cyclodextrins in aqueous solution. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 57 (5), 369-374.
91. Lutka, A. (2002) Investigation of interaction of promethazine with cyclodextrins. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 59 (1), 45-52.
92. Li, J., Guo, Y., Zografi, G. (2002) The solid-state stability of amorphous quinapril in the presence of β -cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (1), 229-243.
93. Brewster, M.E., Loftsson, T., Estes, K.S., Lin, J.-L., Fridriksdóttir, H., Bodor, N. (1992) Effect of various cyclodextrins on solution stability and dissolution rate of doxorubicin hydrochloride. *International journal of Pharmaceutics*, 79 (1), 289-299.
94. Kang, J., Kumar, V., Yang, D., Chowdhury, P.R., Hohl, R.J. (2002) Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability, and cytotoxicity of camptothecin, an antineoplastic agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15 (2), 163-170.
95. Babu, R.J., Pandit, J. (1999) Effect of aging on the dissolution stability of glibenclamide/ β -cyclodextrin complex. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 25 (11), 1215-1219.
96. CWIERTNIA, B., HLADON, T., STOBIECKI, M. (1999) Stability of Diclofenac Sodium in the Inclusion Complex with β -Cyclodextrin in the Solid State. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 51 (11), 1213-1218.
97. Uekama, K., Fujinaga, T., Hirayama, F., Otagiri, M., Kurono, Y., Ikeda, K. (1982) Effects of cyclodextrins on the acid hydrolysis of digoxin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 34 (10), 627-630.
98. Sortino, S., Giuffrida, S., De Guidi, G., Chillemi, R., Petralia, S., Marconi, G. ve diğ erleri. (2001) The Photochemistry of Flutamide and its Inclusion Complex with β -Cyclodextrin. Dramatic Effect of the Microenvironment on the Nature and on the Efficiency of the Photodegradation Pathways¶]. *Photochemistry and Photobiology*, 73 (1), 6-13.

99. De Boer, A.G. (1994). Drug absorption enhancement: Concepts, possibilities, limitations and trends (c. 3): Peterson's.
100. Behl, C., Pimplaskar, H., Sileno, A., Demeireles, J., Romeo, V. (1998) Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Advanced drug Delivery Reviews*, 29 (1), 89-116.
101. Merkus, F.W., Verhoef, J.C., Romeijn, S.G., Schipper, N.G. (1991) Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats. *Pharmaceutical Research*, 8 (5), 588-592.
102. Dawood, M. (1999) Efficacy and Safety of Piroxicam- beta-Cyclodextrin(PBCD, Brexidol registered)--Comparison Studies with Ibuprofen, Naproxen Sodium and Placebo in the Relief of Moderate or Severe Abdominal Pain Associated with Primary Dysmenorrhea. *Journal of New Developments in Clinical Medicine*, 17 (4), 273.
103. Merkus, F., Verhoef, J., Marttin, E., Romeijn, S., Van der Kuy, P., Hermens, W. ve diğ erleri. (1999) Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36 (1), 41-57.
104. Taylor, K. (2002) Pulmonary drug delivery.
105. Loftssona, T., Järvinen, T. (1999) Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36 (1), 59-79.
106. Siefert, B., Keipert, S. (1997) Influence of alpha-cyclodextrin and hydroxyalkylated β -cyclodextrin derivatives on the in vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCl solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (6), 716-720.
107. Stevens, D.A. (1999) Itraconazole in cyclodextrin solution. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 19 (5), 603-611.
108. Uekama, K., Imai, T., Maeda, T., Irie, T., Hirayama, F., Otagiri, M. (1985) Improvement of dissolution and suppository release characteristics of flurbiprofen by inclusion complexation with heptakis (2, 6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74 (8), 841-845.

109. Masahiko, K., Fumitoshi, H., Kaneto, U. (1987) Improvement of oral and rectal bioavailabilities of carmofur by methylated β -cyclodextrin complexations. *International Journal Of Pharmaceutics*, 38 (1), 191-198.
110. Arima, H., Uekama, K. (2007). *Cyclodextrins and Other Enhancers in Rectal Delivery*: CRC Press, Boca Raton, FL.
111. Harris, D., Robinson, J.R. (1992) Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81 (1), 1-10.
112. Hoon, T.J., Dawood, M.Y., Khan-Dawood, F.S., Ramos, J., Batenhorst, R.L. (1993) Bioequivalence of a 17β -Estradiol Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex in Postmenopausal Women. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 33 (11), 1116-1121.
113. Brown, G.A., Martini, E.R., Roberts, B.S., Vukovich, M.D., King, D.S. (2002) Acute hormonal response to sublingual androstenediol intake in young men. *Journal of Applied Physiology*, 92 (1), 142-146.
114. Yoo, S.D., Yoon, B.M., Lee, H.S., Lee, K.C. (1999) Increased bioavailability of clomipramine after sublingual administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (11), 1119-1121.
115. Hirayama, F., Uekama, K. (1999) Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36 (1), 125-141.
116. Minami, K., Hirayama, F., Uekama, K. (1998) Colon-specific drug delivery based on a cyclodextrin prodrug: Release behavior of biphenylacetic acid from its cyclodextrin conjugates in rat intestinal tracts after oral administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87 (6), 715-720.
117. Wang, Y.J. (1996). *Formulation, characterization, and stability of protein drugs* (c. 9): Springer.
118. Sayani, A.P., Chien, Y.W. (1995) Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae. *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13 (1-2), 85-184.

119. Redenti, E., Pietra, C., Gerloczy, A., Szente, L. (2001) Cyclodextrins in oligonucleotide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53 (2), 235-244.
120. O'Driscoll, C., Darcy, R. (2003) Cyclodextrin constructs for delivery of gene therapeutic agents.
121. Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., Mura, P. (2005) Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 298 (1), 55-67.
122. Lee, E.S., Kwon, M.J., Lee, H., Kim, J.J. (2007) Stabilization of protein encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method. *International Journal Of Pharmaceutics*, 331 (1), 27-37.
123. Yu, H., Wei, H., Hou, D., Zhang, A.-y., Feng, Z.-g. (2007) Composite hydrogels filled with inclusion complexes made from β -cyclodextrins with poly (propylene glycol) bisamine. *Current Applied Physics*, 7, e116-e119.
124. Trapani, A., Laquintana, V., Denora, N., Lopodota, A., Cutrignelli, A., Franco, M. ve diğeri. (2007) Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30 (1), 64-74.
125. Maestrelli, F., Garcia-Fuentes, M., Mura, P., Alonso, M.J. (2006) A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 63 (2), 79-86.
126. Evrard, B., Bertholet, P., Guéders, M., Flament, M.-P., Piel, G., Delattre, L. ve diğeri. (2004) Cyclodextrins as a potential carrier in drug nebulization. *Journal of Controlled Release*, 96 (3), 403-410.
127. Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A., Quaglia, F., La Rotonda, M.I. (2006) Cyclodextrins in the production of large porous particles: development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28 (5), 423-432.

128. Sajeesh, S., Sharma, C.P. (2006) Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 325 (1), 147-154.
129. De Rosa, G., Larobina, D., Immacolata La Rotonda, M., Musto, P., Quaglia, F., Ungaro, F. (2005) How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system. *Journal of Controlled Release*, 102 (1), 71-83.
130. Del Valle, E.M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39 (9), 1033-1046.
131. Ensign, L.M., Cone, R., Hanes, J. (2012) Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (6), 557-570.
132. Gaucher, G., Satturwar, P., Jones, M.-C., Furtos, A., Leroux, J.-C. (2010) Polymeric micelles for oral drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 76 (2), 147-158.
133. Türkoğlu, M. (2004) Tabletler. *Farmasötik Teknoloji, Temel Konular ve Dozaj Şekilleri İstanbul, Piksel Bilişim Matbaacılık Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti*, 349-362.
134. Yu, L.X., Amidon, G.L., Polli, J.E., Zhao, H., Mehta, M.U., Conner, D.P. ve diğerleri. (2002) Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*, 19 (7), 921-925.
135. Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P., Crison, J.R. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12 (3), 413-420.
136. Food, Administration, D. (2000) Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. *Food and Drug Administration, Rockville, MD*.

137. Gürsoy, A.Z. (2004). *Farmasötik Teknoloji, Temel Konular ve Dozaj Şekilleri* (c. 2).
138. Chavda, H., Patel, C., Anand, I. (2010) Biopharmaceutics classification system. *Systematic Reviews In Pharmacy*, 1 (1), 62.
139. Tehler, U., Fagerberg, J.H., Svensson, R., Larhed, M., Artursson, P., Bergström, C.A. (2013) Optimizing Solubility and Permeability of a Biopharmaceutics Classification System (BCS) Class 4 Antibiotic Drug Using Lipophilic Fragments Disturbing the Crystal Lattice. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56 (6), 2690-2694.
140. Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchartd, R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96 (3), 736-749.
141. Bailey, C.A., Bryla, P., Malick, A.W. (1996) The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22 (1), 85-103.
142. Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., Tokuda, H. (2000) Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10 (3), 195-204.
143. Estudante, M., Morais, J.G., Soveral, G., Benet, L.Z. (2013) Intestinal drug transporters: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (10), 1340-1356.
144. Giacomini, K.M., Huang, S.-M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L., Chu, X. ve diğerleri. (2010) Membrane transporters in drug development. *Nature reviews Drug discovery*, 9 (3), 215-236.
145. Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2012) Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 280-289.
146. Artursson, P., Karlsson, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal

- epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175 (3), 880-885.
147. Kvrns, R., Usman, S., Sarheed, O., Shah, F. (2014) Intestinal Permeability Studies Employing Cell Culture Models-Critical Issues Involved. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (7), 3226-3235.
148. Shabir, G.A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987 (1), 57-66.
149. Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A. ve diğerleri. (1992) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81 (3), 309-312.
150. Riley, C.M., Rosanske, T.W. (1996). Development and validation of analytical methods (c. 3): Elsevier.
151. Tomiyama, N., Tsuji, H., Watanabe, M., Takeda, M., Harada, T., Kobayashi, H. (2000) High-performance liquid chromatographic method for determination of DDT and its degradation products in rat plasma, liver and brain: validation and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 748 (2), 361-368.
152. Swartz, M.E., Krull, I.S. (1997). Analytical method development and validation: CRC Press.
153. ICHHT, G. (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). *IFPMA: Geneva*.
154. Yavuz, B., Bilensoy, E., Vural, İ., Şumnu, M. (2010) Alternative oral exemestane formulation: Improved dissolution and permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 398 (1-2), 137-145.
155. Varia, U.R.K. (2010) Effect of cyclodextrin inclusion complex on dissolution behaviour of cefixime.

156. Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49 (11), 1749-1755.
157. Paul, Y. (2011) Formulation, Evaluation And Study Of Effect Of Hydrophilic Polymers On Release Rate Of Cefixime Floating Tablets Yash Paul¹, Manoj Kumar¹ And Bhupinder Singh².
158. Kalavathy, D., Panduranga, K., Prakash Rao, B. (2013) Preparation and Evaluation of Dispersible Tablets of A Model Antibiotic Drug. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research*, 18 (1).
159. Dhoka, M., Vaidya, P.D., Pande, A.V., Arora, A.A. (2010) Development and validation of analytical method for estimation of cefixime in swab samples. *International journal of ChemTech Research CODEN (USA)*, 2, 1918-1923.
160. Jadhav, R.V., Game, M., Iche, P.P., Bobade, T.S. (2013) Development and validation of analytical method for estimation of cefixime in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Journal of Chemical & Pharmaceutical Research*, 5 (4).
161. Jadhav, P., Petkar, B., Pore, Y., Kulkarni, A., Burade, K. (2013) Physicochemical and molecular modeling studies of cefixime-l-arginine-cyclodextrin ternary inclusion compounds. *Carbohydrate Polymers*, 98 (2), 1317-1325.
162. Bonthagarala, B., Nama, S., Nuthakki, S., Sudarshan, D. Formulation And Evaluation Of Extended Release Alginate Beads Of Cefixime. *In Vitro*, 10, 100.
163. Reddy, K.H., Reddy, M.M. (2012) In-vitro formulation and evaluation of cefixime liposome formulation. *Int J Pharm Bio Sci*, 2 (2), 198-207.
164. Arora, S., Sharma, P., Irchhaiy, R., Khatkar, A., Singh, N., Gagoria, J. (2010) Development, characterization and solubility study of solid dispersion of Cefixime trihydrate by solvent evaporation method. *International Journal of Drug Development & Research*, 2, 424-430.

165. Sankaranarayana Pillai, M., Pushpa Latha, S. (2012) Designing of some novel metallo antibiotics tuning biochemical behaviour towards therapeutics: Synthesis, characterisation and pharmacological studies of metal complexes of cefixime. *Journal of Saudi Chemical Society*.
166. Group, I.E.W. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) [Bildiri]. Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
167. Brown, R., Caphart, M., Faustino, P., Frankewich, R., Gibbs, J., Leutzinger, E. ve diğerleri. (2001) Analytical procedures and method validation: Highlights of the FDA's draft guidance. *LC GC North America*, 19 (1), 74-79.
168. Higuchi, T., Connors, K.A. (1965) Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum*, 4 (2), 117-212.
169. Szejtli, J. (1988). Cyclodextrin technology (c. 1): Springer.
170. Carrier, R.L., Miller, L.A., Ahmed, I. (2007) The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, 123 (2), 78-99.
171. Mura, P., Faucci, M., Parrini, P., Furlanetto, S., Pinzauti, S. (1999) Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen–cyclodextrin binary systems. *International journal of pharmaceutics*, 179 (1), 117-128.
172. Sapkal, N., Kilor, V., Bhursari, K., Daud, A. (2007) Evaluation of some methods for preparing gliclazide- β -cyclodextrin Inclusion complexes. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 6 (4), 833-840.
173. Zingone, G., Rubessa, F. (2005) Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. *International journal of pharmaceutics*, 291 (1), 3-10.
174. Otero-Espinar, F., Anguiano-Igea, S., Garcia-Gonzalez, N., Vila-Jato, J., Blanco-Mendez, J. (1992) Interaction of naproxen with β -cyclodextrin in solution and in the solid state. *International journal of pharmaceutics*, 79 (1), 149-157.

175. Williams III, R.O., Mahaguna, V., Sriwongjanya, M. (1998) Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 46 (3), 355-360.
176. Villaverde, J., Morillo, E., Pérez-Martínez, J.I., Gines, J.M., Maqueda, C. (2004) Preparation and characterization of inclusion complex of norflurazon and β -cyclodextrin to improve herbicide formulations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (4), 864-869.
177. Al-Marzouqi, A.H., Elwy, H.M., Shehadi, I., Adem, A. (2009) Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49 (2), 227-233.
178. Yap, K., Liu, X., Thenmozhiyal, J., Ho, P. (2005) Characterization of the 13-cis-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. *European journal of pharmaceutical sciences*, 25 (1), 49-56.
179. Naidu, N.B., Chowdary, K., Murthy, K., Satyanarayana, V., Hayman, A., Becket, G. (2004) Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35 (1), 75-86.
180. Djedaïni, F., Lin, S.Z., Perly, B., Wouessidjewe, D. (1990) High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a β -cyclodextrin: indomethacin inclusion complex. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 (7), 643-646.
181. Zheng, Y., Haworth, I.S., Zuo, Z., Chow, M.S., Chow, A.H. (2005) Physicochemical and structural characterization of Quercetin- β -Cyclodextrin Complexes. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94 (5), 1079-1089.
182. Figueiras, A., Carvalho, R.A., Ribeiro, L., Torres-Labandeira, J.J., Veiga, F.J. (2007) Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -

- cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67 (2), 531-539.
183. Trapani, G., Latrofa, A., Franco, M., Pantaleo, M.R., Sanna, E., Massa, F. ve diğeri. (2000) Complexation of Zolpidem with 2-hydroxypropyl- β -, methyl- β -, and 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin: Effect on aqueous solubility, dissolution rate, and ataxic activity in rat. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89 (11), 1443-1451.
184. Figueiras, A., Ribeiro, L., Vieira, M.T., Veiga, F. (2007) Preparation and physicochemical characterization of omeprazole: methyl-beta-cyclodextrin inclusion complex in solid state. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57 (1-4), 173-177.
185. de Araujo, D.R., Tsuneda, S.S., Cereda, C., Del GF Carvalho, F., Preté, P.S., Fernandes, S.A. ve diğeri. (2008) Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33 (1), 60-71.
186. Szejtli, J. (1994) Medicinal applications of cyclodextrins. *Medicinal research reviews*, 14 (3), 353-386.
187. Cirri, M., Rangoni, C., Maestrelli, F., Corti, G., Mura, P. (2005) Development of fast-dissolving tablets of flurbiprofen-cyclodextrin complexes. *Drug development and industrial pharmacy*, 31 (7), 697-707.
188. Rawat, S., Jain, S.K. (2004) Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57 (2), 263-267.
189. Savolainen, J., Järvinen, K., Matilainen, L., Järvinen, T. (1998) Improved dissolution and bioavailability of phenytoin by sulfobutylether- β -cyclodextrin ((SBE)7m- β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) complexation. *International Journal of Pharmaceutics*, 165 (1), 69-78.
190. Gohel, M.C., Panchal, M.K. (2002) Refinement of Lower Acceptance Value of the Similarity Factor f_2 in Comparison of Dissolution Profiles.

191. Leeson, L.J. (1995) In vitro/in vivo correlations. *Drug information journal*, 29 (3), 903-915.
192. FDA, U. (1997) Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate-release solid oral dosage forms. *Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*.
193. Shah, V.P., Tsong, Y., Sathe, P., Liu, J.-P. (1998) In vitro dissolution profile comparison—statistics and analysis of the similarity factor, f₂. *Pharmaceutical Research*, 15 (6), 889-896.
194. Costa, P., Sousa Lobo, J.M. (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (2), 123-133.
195. Gowthamarajan, K., Singh, S.K. (2010) Dissolution testing for poorly soluble drugs: a continuing perspective. *Dissolution Technologies*, 17 (3), 24-32.
196. Knapp, C.C., Sierra-Madero, J., Washington, J.A. (1988) Antibacterial activities of cefpodoxime, cefixime, and ceftriaxone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32 (12), 1896-1898.
197. Groll, A.H., Wood, L., Roden, M., Mickiene, D., Chiou, C.C., Townley, E. ve diğ erleri. (2002) Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of cyclodextrin itraconazole in pediatric patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (8), 2554-2563.
198. Sun, H.-K., Seshadri, M., Lingard, S., Monaghan, W., Faoagali, J., Chan, E. ve diğ erleri. (2011) Antibacterial Activity of β -Cyclodextrin and 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Trimethoprim Complexes. *American Journal of Microbiology*, 2 (1), 1.
199. Wu, C.-Y., Benet, L.Z. (2005) Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical research*, 22 (1), 11-23.
200. Balimane, P.V., Chong, S. (2005) Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug discovery today*, 10 (5), 335-343.

201. Artursson, P. (1990) Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 8 (4), 305-330.
202. Rubas, W., Cromwell, M., Shahrokh, Z., Villagran, J., Nguyen, T.N., Wellton, M. ve diğeri. (1996) Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85 (2), 165-169.
203. Shimizu, R., Sukegawa, T., Tsuda, Y., Itoh, T. (2008) Quantitative prediction of oral absorption of PEPT1 substrates based on in vitro uptake into Caco-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 354 (1-2), 104-110.