

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

**NAPROKSEN İÇEREN FARKLI TRANSDERMAL
MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ
İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Farmasötik Teknoloji Programı
Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı
Neslihan Üstündağ**

**Danışman
Doç. Dr. H. Yeşim Karasulu**

**İZMİR
2008**

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

**NAPROKSEN İÇEREN FARKLI TRANSDERMAL
MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ
İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Farmasötik Teknoloji Programı
Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı
Neslihan Üstündağ**

**Danışman
Doç. Dr. H. Yeşim Karasulu**

**İZMİR
2008**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan: Doç.Dr. H. Yeşim KARASULU
(Danışman)

.....

Üye :Doç. Dr. Şebnem APAYDIN

.....

Üye :Prof. Dr. Gökhan ERTAN

.....

Üye :Prof. Dr. Özgen ÖZER

.....

Üye :Doç. Dr. Işık ÖZGÜNEY

.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

21.01.2009

ÖNSÖZ

Çalışmalarım süresince bilgi ve becerilerinden yararlandığım, her zaman manevi desteğini esirgemeyen, yüksek lisans projemi baştan sona tamamlamama yardımcı olan tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. H. Yeşim Karasulu'ya,

Değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bana yol gösteren yardımcı danışman hocam Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Müdürü Sayın Doç. Dr. Şebnem Apaydın'a,

Çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Prof. Dr. Tamer Güneri'ye,

İn-vivo çalışmalarım bana yardımlarını esirgemeyen ve karşılaştığım sorunlara çözüm bulmama yardımcı olan Sayın Doç. Dr. N. Ülkü Karabay'a,

Tezimin yazım ve istatistiksel değerlendirme aşamalarında bana yardımcı olan ve her konuda bana olan desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Mehmet Ali Ege'ye,

Lisans ve yüksek lisans eğitiminde beraber olduğum ve tez çalışmalarım sırasında anlayış gösteren ve her zaman desteğini gördüğüm ev arkadaşım Sayın Derya Çiçek'e,

Çalışmalarım süresince yardımları ve destekleri ile her zaman yanımda olan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma yardımları için en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Beni hayatım boyunca destekleyen, fedakarlık ve sevgilerini esirgemeyen canım anneme, babama, kardeşim Ufuk Üstündağ'a ve Mehmet Evren Okur'a çok teşekkür ederim.

İzmir, 2008

Ecz. Neslihan ÜSTÜNDAĞ

İçindekiler

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ	III
ÖNSÖZ	IV
İçindekiler.....	V
Şekiller Listesi	X
Tablolar Listesi	XII
BÖLÜM I	1
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Emülsiyonlar	3
1.1.1 Emülsiyonların Tanımı ve Genel Özellikleri	3
1.1.2 Emülgatörler (Yüzey Etkin Maddeler (YEM), Surfaktanlar)	3
1.1.3 Emülsiyon Oluşum Teorileri (30, 119).....	4
1.1.4 Emülgatörlerin (YEM'lerin) Emülsiyon Oluşturma Mekanizmaları (30, 34, 57, 119).....	5
1.1.5 Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB)	5
1.1.6 Emülsiyonların Fiziksel Stabilitesi (118, 119).....	6
1.1.7 Emülsiyon Çeşitleri	7
1.1.7.A. Uygulama Yollarına Göre Emülsiyon Çeşitleri (30, 119).....	7
1.1.7.B. Damlacık Büyüklüklerine Göre Emülsiyon Çeşitleri (5, 67, 77, 118).....	7
1.1.8 Mikroemülsiyonlar	8
1.1.8.1 Mikroemülsiyon Tanımı	8
1.1.8.2 Mikroemülsiyonların Avantajları	10
1.1.8.3 Mikroemülsiyonların Yapısı	12
1.1.8.4 Mikroemülsiyonların Faz Çalışmaları (2, 31, 34, 85, 94).....	14
1.1.8.5 Mikroemülsiyon Oluşum Teorileri	16
1.1.8.5.1 Karışım Film Teorisi	16
1.1.8.5.2 Çözünürlük Teorisi	17
1.1.8.5.3 Termodinamik Teori	17
1.1.8.6 Mikroemülsiyonların Karakteristik Özellikleri	18
1.1.8.6.1 Optik Özellikleri	18
1.1.8.6.1.1 Saydamlık	18
1.1.8.6.1.2 Tindal Etki	18
1.1.8.6.2 Damlacık Özellikleri	18
1.1.8.7 Mikroemülsiyonların Veriliş Şekilleri (31, 62, 71, 72, 112, 119).....	19
1.1.8.7.1 Mikroemülsiyonların Topikal Olarak Uygulanması	19
1.2 Transdermal Sistemler (1, 13, 19, 29, 37, 39, 55, 74 , 86, 87, 97, 106, 119) ..	22
1.2.1 Deri	23
1.2.1.1 Hipodermis	24
1.2.1.2 Dermis	24
1.2.1.3 Epidermis	24
1.2.2 Deriden Geçiş (1, 37, 48, 53, 65, 74)	24
1.2.2.1 Deriden Geçişin Kinetiği (1, 37)	25
1.2.2.1.1 Biyolojik Faktörler	26
1.2.2.1.2 Derinin Fizyolojik Durumu, Deri Hidratasyonu	26
1.2.2.1.3 Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri	26
1.2.2.1.4 Formülasyon ve Kullanılan Yardımcı Maddelerin Etkisi	26
1.2.2.3 Deriden Geçişin Arttırılması (1, 15, 37, 53, 90, 119).....	26

1.2.2.3.1 Penetrasyon Arttırıcılar	27
1.2.2.4 Transdermal Preparatların Denetimi (21, 37)	27
1.3 Ağrı.....	27
1.3.1 Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Ağrı Kesici Etki Mekanizmaları.....	28
1.4 İnflamasyon (16, 80)	29
1.4.1 Anti-İnflamatuvar İlaçlar (16).....	30
1.4.1.1 Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)	30
1.4.1.1.1 NSAİİ'ların Etkileri (8, 10, 70, 82 , 106).....	30
1.4.1.1.2 NSAİİ'ların Avantajları (52)	31
1.4.1.1.3 NSAİİ'ların Sınıflandırılması ve Özellikleri (3, 4).....	31
1.4.1.1.4.1 Propiyonik Asit Türevleri (16, 36, 82, 106)	31
1.5 Model Etkin Madde Naproksen (NP) Hakkında Genel Bilgiler.....	32
1.5.1 Naproksen'nin Fiziksel Özellikleri (7, 12, 15, 82, 83, 84, 108, 109, 113, 124)	32
Kapalı formülü: $C_{14}H_{14}O_3$	32
1.5.2 Etki Mekanizması (4, 82, 84, 97, 102, 113).....	33
1.5.3 Farmakokinetiği (82, 113)	33
1.5.4 Endikasyonları (82, 83, 97, 113, 125)	33
1.5.5 Kontrendikasyonları (82, 113)	34
1.5.6 Yan etkileri (82, 113).....	34
1.5.7 Maksimum doz sınırları (82, 113).....	35
1.5.8 Naproksenin Ticari Preparatları (113).....	35
1.5.8.1 Naproksenin Türkiye'de Kullanıldığı Müstahzarlar	35
1.5.8.1.1 Jel	35
1.5.8.1.2 Supozituvar	35
1.5.8.1.3 Tablet.....	35
1.5.8.2 Naproksenin Dünyadaki Müstahzarları	35
BÖLÜM II.....	37
DENEYSEL BÖLÜM.....	37
ÇALIŞMANIN GENEL PLANI	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler	39
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler	39
2.2 Yöntem ve Deneyler.....	40
2.2.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan NP'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	40
2.2.1.1 NP'nin Infrared (IR) Analizi	40
2.2.1.2 NP'nin Ultraviyole (UV) Analizi	40
2.2.1.3 NP'nin Ergime Noktası Tayini.....	40
2.2.1.4 NP'nin Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayini.....	40
2.2.2 NP'nin UV ile Miktar Tayini İçin Standart Eğrisi Çizimi.....	41
2.2.2.1 Analitik Yöntem Validasyonu (104).....	41
2.2.2.1.1 Doğrusallık	41
2.2.2.1.2 Kesinlik.....	42
2.2.2.1.2.1 Tekrarlanabilirlik.....	42
2.2.2.1.2.2 Tekrar Elde Edilebilirlik	42
2.2.2.1.3 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik.....	42
2.2.2.1.4 Seçicilik	43

2.2.2.1.5	Günler Arası Geçerlilik	43
2.2.2.1.6	Stabilite (Kararlılık)	43
2.2.3	Formülasyon Çalışmaları	44
2.2.3.1	Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmaları.....	44
2.2.3.1.1	Formülasyonda Kullanılacak Maddelerin Seçimi.....	44
2.2.3.1.2	Mikroemülsiyon Formülasyonlarını Belirlemek için Yapılan Çalışmalar	44
2.2.3.1.3	Üçgen Faz Diyagramının Çizimi	53
2.2.3.1.4	NP ile Formülasyon Çalışmaları.....	54
2.2.3.1.4.1	0.5 N NaOH çözeltisinin hazırlanması	54
2.2.4	İn-vitro Geçiş Çalışmaları.....	54
2.2.5	Ex-vivo Geçiş Çalışmaları	55
2.2.5.1	HPLC ile Standart Eğri Çizimi.....	55
2.2.5.2	HPLC Yöntem Validasyonu (18, 40, 42, 61, 66, 84, 89, 96, 100, 124)	56
2.2.5.2.1	Doğrusallık	56
2.2.5.2.2	Keskinlik	56
2.2.5.2.2.1	Tekrar Edilebilirlik (Enjeksiyon Tekrarı)	56
2.2.5.2.2.2	Tekrar Elde Edilebilirlik	57
2.2.5.2.3	Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik.....	57
2.2.5.2.4	Özgünlük, Seçicilik	57
2.2.5.2.5	LOD ve LOQ	57
2.2.5.3.	Mikroemülsiyon Formülasyonlarından ve Ticari Preparattan Ex-vivo Geçiş Çalışmaları	58
2.2.6	NP'nin Sentetik ve Doğal Membrandan Geçiş Sonuçlarının Matematiksel Olarak Değerlendirilmesi	59
2.2.7	Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	59
2.2.7.1	Mikroemülsiyonların Fiziksel Görünüşü	59
2.2.7.2	Mikroemülsiyonların Tipi	60
2.2.7.3	Mikroemülsiyonların Santrifüj Edilmesi	60
2.2.7.4	Mikroemülsiyonların pH Ölçümleri	60
2.2.7.5	Mikroemülsiyonların Elektrik İletkenliği Ölçümleri.....	60
2.2.7.6	Mikroemülsiyonların Dansite Ölçümleri	60
2.2.7.7	Mikroemülsiyonların Refraktif İndisi Ölçümleri	61
2.2.7.8	Mikroemülsiyonların Viskozitesinin Ölçümleri.....	61
2.2.7.9	Mikroemülsiyonların Damlacık (partikül) Büyüklüğünün Saptanması	61
2.2.7.11	Mikroemülsiyonların Stabilite Çalışmaları	61
2.2.8	İn-Vivo Çalışmalar	61
2.2.8.1	Antiinflamatuvar Aktivite Çalışmaları	62
2.2.8.2	Analjezik Aktivite Çalışmaları.....	67
2.2.8.2.1	Tail Flick Testi.....	67
2.2.8.2.2	Hot Plate Testi	69
2.2.9	İstatistiksel Çalışmalar	70
BÖLÜM III		71
3. BULGULAR		71
3.1	Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Naproksen'in Özelliklerine Ait Bulgular	71
3.1.1	NP'nin Infrared (IR) Analizi Bulguları	71

3.1.2 NP'nin UV Analizi Bulguları	71
3.1.3 NP'nin Ergime Noktasına Ait Bulgular.....	72
3.1.4 NP'nin Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayinine Ait Bulgular.....	72
3.2 NP'nin UV ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi.....	72
3.2.1 Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular	73
3.2.1.1 Doğrusallık Sonuçları	73
3.2.1.2 Kesinlik	73
3.2.1.2.1 Tekrar Edilebilirlik Sonuçları.....	73
3.2.1.2.2 Tekrar Elde Edilebilirlik Sonuçları.....	74
3.2.1.3 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik Sonuçları.....	74
3.2.1.4 Seçicilik	75
3.2.1.5 Günler Arası Geçerlilik	75
3.2.1.6 Stabilite Sonuçları.....	75
3.3 Formülasyonlar Çalışmalarına Ait Bulgular.....	76
3.3.1 Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	76
3.3.1.1 F3-1 Formülasyonuna Ait Bulgular.....	77
3.3.1.2 F6-1 Formülasyonuna Ait Bulgular.....	78
3.3.1.3 F10-1 Formülasyonuna Ait Bulgular	79
3.3.1.4 F12-1 Formülasyonuna Ait Bulgular	80
3.3.1.5 F15 Formülasyonuna Ait Bulgular	81
3.3.1.6 F19 Formülasyonuna Ait Bulgular	82
3.3.1.7 F22 Formülasyonuna Ait Bulgular	83
3.3.1.8 F25 Formülasyonuna Ait Bulgular	84
3.3.1.9 F29 Formülasyonuna Ait Bulgular	85
3.4 Geliştirilen NP Mikroemülsiyonların ve Ticari Preparatın İn-vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular.....	86
3.4.1 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve Ticari Preparatın Nitro Selüloz Membrandan Geçiş Çalışmasının Bulguları.....	86
3.4.2 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve Ticari Preparatının Selüloz Membrandan Geçiş Çalışmasının Bulguları.....	88
3.5 Geliştirilen NP Mikroemülsiyonların ve Ticari Preparatın Ex-vivo Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular.....	89
3.5.1 HPLC ile Kalibrasyon Eğri Çizimi Bulguları	89
3.5.2 HPLC Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	90
3.5.2.1. Doğrusallık Sonuçları	90
3.5.2.2 Kesinlik Sonuçları	91
3.5.2.2.1 Tekrar Edilebilirlik Sonuçları.....	91
3.5.2.2.2 Tekrar Elde Edilebilirlik Sonuçları.....	91
3.5.2.3 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik Sonuçları.....	92
3.5.2.5 Özgünlük Tayini Sonuçları	93
3.5.2.5 LOD ve LOQ Sonuçları	94
3.5.3. Formülasyonlardan Ex-vivo Geçiş Çalışması Bulguları	94
3.5.3.1 Mikroemülsiyon Formülasyonundan Ex-vivo Geçiş Çalışması.....	94
3.6 Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerinin Belirlenmesi.....	95
3.6.1 Mikroemülsiyonların Fiziksel Görünümü	95
3.6.2 Mikroemülsiyonların Tipi.....	96
3.6.3 Mikroemülsiyonların Santrifüj Sonrası Sonuçları.....	96
3.6.4 Mikroemülsiyonların pH Ölçüm Sonuçları	96
3.6.5 Mikroemülsiyonların Elektrik İletkenliği Ölçüm Sonuçları.....	96
3.6.6 Mikroemülsiyonların Dansite Ölçüm Sonuçları	96

3.6.7. Mikroemülsiyonların Refraktif İndisi Ölçüm Sonuçları.....	96
3.6.8 Mikroemülsiyonların Viskozite Ölçüm Sonuçları	97
3.6.9 Mikroemülsiyonların Faz Değişim Sıcaklığı Sonuçları	97
3.6.10 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Damlacık Büyüklüğü Ölçüm Sonuçları.....	99
3.6.11. Mikroemülsiyonun Stabilite Çalışmaları	101
3.7 İn-Vivo Çalışma Sonuçları	103
3.7.1 Antiinflamatuvar Aktivite Çalışmaları	103
3.7.2 Analjezik Aktivite Çalışmaları.....	105
3.7.2.1 Tail Flick Çalışmaları	105
3.7.2.2 Hot Plate Çalışmaları	106
Dakika	107
3.8 İstatistiksel Çalışma Sonuçları	107
BÖLÜM IV	109
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	109
4.1.Genel Değerlendirme	109
4.2 NP'nin Özelliklerinin Belirlenmesi.....	110
4.3 Kullanılacak Yardımcı maddelerin Seçimi ve Formülasyon Geliştirme Çalışmaları.....	111
4.4 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve Ticari Preparatın Sentetik ve Doğal Membrandan Geçiş Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	113
4.5 Formülasyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi	115
4.6 İn-Vivo Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	115
4.7 Sonuç	117
ÖZET	118
NAPROKSEN İÇEREN FARKLI TRANSDERMAL MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR.....	118
ABSTRACT	119
STUDIES ON IN VITRO – IN VIVO EVALUATION OF DIFFERENT TRANSDERMAL MICROEMULSION FORMULATIONS CONTAINING NAPROXEN	119
YARARLANILAN KAYNAKLAR	120
ÖZGEÇMİŞ.....	132

Şekiller Listesi

Şekil 1 : Fazlarına göre emülsiyon tipleri	7
Şekil 2 : Winsor sınıflandırma sistemine göre su-yağ-YEM karışımının üçgen faz diyagramının şematik gösterimi: L1, normal miseller yada yağ/su (Y/S) mikroemülsiyonu, L2, ters miseller veya su/yağ (S/Y) mikroemülsiyonları, D, anizotropik lamelar likit kristal fazı.	13
Şekil 3 : S/Y, Y/S ve bikontinyus mikroemülsiyonlarının yapısı ve görünüşü (76, 77, 85)	14
Şekil 4 :Üçgen faz diyagramında; yağ fazı içindeki su küreleri, yağ içindeki su silindirleri, lamel yapılar, su fazı içindeki yağ damlacıkları gibi mikroemülsiyonların oluşturduğu ve kapladığı alanlar.....	15
Şekil 5 : Düşük sıcaklıktaki Y/S sistemlerin, sıcaklığın etkisiyle eşit konsantrasyonlu geçişli mikroemülsiyonlara ve daha yüksek sıcaklıkta S/Y sistemlerine geçişinin şematik gösterimi.	16
Şekil 6 : Derinin yapısı.....	23
Şekil 7 : Deriden geçiş yollarının şematik görünüşü	25
Şekil 8 : Siklooksijenaz enzim tipleri	29
Şekil 9: Naproksenin kimyasal formülü.....	32
Şekil 10: Sol pençeye karagenin enjeksiyonu	63
Şekil 11: Sıçanlara formülasyonların uygulanması	64
Şekil 12: Formülasyon uygulanmış sıçanların görüntüsü	64
Şekil 13: Su pletismometresi.....	65
Şekil 14: Sol pençenin ölçümü	65
Şekil 15: Sağ pençeye SF çözeltisi enjeksiyonu.....	66
Şekil 16: Sağ pençenin ölçümü	66
Şekil 17: Tail Flick	68
Şekil 18: Sıçanlarda latens değerlerinin belirlenmesi.....	68
Şekil 19: Hot plate	69
Şekil 20: Sıçanlarda reaksiyon zamanının belirlenmesi	70
Şekil 21 : NP'nin infrared spektrumu	71
Şekil 22 : NP'nin UV spektrumu.....	72
Şekil 23 : NP'nin UV'de 263 nm dalga boyunda pH 7.4 tamponunda çizilen kalibrasyon eğrisi	73
Şekil 24: İPM-Labrafil M:Labrasol-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı	77
Şekil 25 : İPM-Cremophor EL:Span 80-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı	78
Şekil 26 : İPM-Cremophor EL:Labrafil M-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı	79
Şekil 27 : İPM-Span 80:Labrasol-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı	80
Şekil 28 : İPM-Labrafil M:Labrasol-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı	81
Şekil 29 : İPM-Cremophor EL:Span 80-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı.....	82
Şekil 30 : İPM-Cremophor EL:Labrafil M-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı.....	83
Şekil 31: İPM-Span 80:Labrasol-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı.....	84

Şekil 32 : İPM-Cremophor EL:Labrafil M -İPA ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı.....	85
Şekil 33: M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 ve ticari preparatına (T) ait nitro selüloz membrandan geçiş grafiği.....	88
Şekil 34: M3, M4, M7, M8, M9 ve ticari preparatına (T) ait selüloz membrandan geçiş grafiği	89
Şekil 35: NP'nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisi	90
Şekil 36 :Etkin madde NP'nin kromatogramı	90
Şekil 37 : Etkin madde yüklü olmayan mikroemülsiyon formülasyonunun kromatogramı.....	93
Şekil 38 : Etkin madde yüklü mikroemülsiyon formülasyonunun kromatogramı	93
Şekil 39: : M3, M4, M7, M8, M9 ve ticari preparatına ait sıçan derisinden geçiş grafiği	95
Şekil 40: M3 formülasyonunun faz değişim grafiği.....	97
Şekil 41: M4 formülasyonunun faz değişim grafiği.....	98
Şekil 42: M7 formülasyonunun faz değişim grafiği.....	98
Şekil 43: M8 formülasyonunun faz değişim grafiği.....	98
Şekil 44: M9 formülasyonunun faz değişim grafiği.....	99
Şekil 45: M3'ün damlacık büyüklüğü grafiği	100
Şekil 46: M4'ün damlacık büyüklüğü grafiği	100
Şekil 47: M7'nin damlacık büyüklüğü grafiği	100
Şekil 48 : M8'in damlacık büyüklüğü grafiği	101
Şekil 49: M9'un damlacık büyüklüğü grafiği	101
Şekil 50 : Antiinflamatuvar aktivite sonuçları	105
Şekil 51: Tail flick çalışması sonucu	106

Tablolar Listesi

Tablo 1: HLB değeri ile emülgatör kullanımı arasındaki ilişki.....	6
Tablo 2 :Mikroemülsiyonlar ile makroemülsiyonların karşılaştırılması	10
Tablo 3 : Enzim alt tipleri ve vücutta bulundukları yerler	28
Tablo 4 : NSAİİ'lerin grupları.....	31
Tablo 5 : YEM olarak Labrafil M ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	45
Tablo 6: YEM olarak Cremophor EL ve Span 80, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	46
Tablo 7: YEM olarak Cremophor EL ve Labrafil M, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	47
Tablo 8: YEM olarak Span 80 ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	48
Tablo 9: YEM olarak Labrafil M ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	49
Tablo 10: YEM olarak Cremophor EL ve Span 80, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	50
Tablo 11: YEM olarak Cremophor EL ve Labrafil M, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	51
Tablo 12: YEM olarak Span 80 ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	52
Tablo 13: YEM olarak Cremophor EL ve Labrafil M, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri.....	53
Tablo 14 : pH 7.4 fosfat tamponu kullanarak çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi	73
Tablo 15 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar edilebilirlik bulguları.....	74
Tablo 16 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar elde edilebilirlik bulguları.....	74
Tablo 17 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları	75
Tablo 18 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait stabilite sonuçları	76
Tablo 19 : Geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonlarının tipi, HLB değerleri ve miktarları	86
Tablo 20 : NP içeren mikroemülsiyon ve ticari preparatlarının nitro selüloz membrandan geçiş çalışmalarına ait sonuçlar ve hesaplamalar	87
Tablo 21 : NP içeren mikroemülsiyon ve ticari preparatlarının selüloz membrandan geçiş çalışmalarına ait sonuçlar ve hesaplamalar.....	89

Tablo 22 : NP'nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar edilebilirlik bulguları.....	91
Tablo 23 : NP'nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar elde edilebilirlik bulguları.....	92
Tablo 24 : NP'nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları.....	92
Tablo 25 : NP içeren mikroemülsiyon ve ticari preparatının sıçan derisinden geçişine ait sonuçlar ve hesaplamalar	95
Tablo 26 : Mikroemülsiyon formülasyonların elektirik iletkenliği, vizkozite, pH, refraktif indisi dansite ve faz değişim sıcaklığı ölçümüne ait veriler (t=0 anında)	97
Tablo 27: M3-M4-M7-M8-M9 formülasyonlarının polidispersite indeksi, Z-average ve damlacık büyüklüğü değerleri.....	99
Tablo 28 : Mikroemülsiyon formülasyonlarının stabilite sonuçları	102
Tablo 29: Sağ pençe hacim ölçümü sonuçları.....	104
Tablo 30: Hot plate sonuçları	107

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Çalışmamızdaki amacımız, günümüzde topikal olarak kullanılan ticari naproksen dozaj şekillerine alternatif, yeni bir dozaj şekli önermektir. Bunun için transdermal yol ile kullanılabilen, naproksen (NP) içeren mikroemülsiyon dozaj formülasyonlarının geliştirilmesi planlanmıştır.

Transdermal yol uygulama kolaylığı açısından hem oral hem de parenteral yola oranla daha üstündür. Çalışmamızda naproksen formülasyonları için, taşıyıcı sistem olarak mikroemülsiyon dozaj şekli seçilmiştir. Çünkü ilaçların transdermal uygulanmaları için mikroemülsiyonların avantajları üç ana mekanizma ile açıklanabilir. Birincisi mikroemülsiyon sistemler hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddeleri çözme kabiliyetine sahiptir ve etkin maddelerin deri boyunca termodinamik aktivitesini arttırabilir. İkincisi, mikroemülsiyon yapısında bulunan bileşenler deriden geçişi artırıcı maddeler gibi davranarak stratum korneum yapısını etkileyerek deriden etkin maddenin geçişini arttırabilir. Üçüncüsü, etkin maddenin ara yüzeyde bulunması nedeniyle kontrollü bir salım elde edilebilir.

Çalışmamızda NP'nin piyasada mevcut olan topikal preparatı ile geliştireceğimiz NP içeren yeni mikroemülsiyon formülasyonlarının in-vitro, ex-vivo ve iv-vivo etkinlikleri karşılaştırılacaktır. Bu amaçla formülasyon çalışmalarında değişik yüzey etkin maddeler (YEM) ve yardımcı yüzey etkin maddeler (YYEM) kullanılarak çeşitli S/Y ve Y/S mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilecektir. Difüzyon hüceleri kullanılarak in vitro ortamda etkin maddenin nitro selüloz membrandan ve selüloz membrandan geçişi, ex-vivo ortamda ise; erkek sıçan karın derisinden etkin maddenin geçişi incelenecektir. İn vitro ve ex vivo geçiş çalışmalarının değerlendirilmesi sonucunda ideal olarak seçilen bir S/Y ve bir Y/S

tipi formülasyon ile ticari preparatın sıçanlardaki antiinflamatuvar ve analjezik etkileri karşılaştırılarak, değerlendirilecektir.

Yukarıda bahsettiğimiz gibi çalışmalarımız formülasyon geliştirme, in-vitro, ex-vivo ve in vivo olmak üzere dört aşamada planlanmıştır. Günümüzde, maliyetlerin çok yüksek olması nedeniyle yeni bir ilaç molekülü keşfetmektense var olan molekülün etkinliğinin arttırılması amaçlanmaktadır. Biz de çalışmamızda, geliştireceğimiz formülasyonlar ile naproksenin klasik dozaj formlarına göre etkinliğini karşılaştırarak, tedavi için daha etkin olabilecek alternatif bir dozaj şeklini önermeyi planlamaktayız.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Emülsiyonlar

1.1.1 Emülsiyonların Tanımı ve Genel Özellikleri

Emülsiyonlar, birbirleri ile karışmayan iki farklı sıvının birbiri içinde dağılmasıyla oluşan homojen görünümlü heterojen sistemlerdir. Bu sistemler, biri hidrofilik faz, diğeri lipofilik faz olmak üzere iki fazdan oluşmaktadırlar. Bu iki faz, emülsiyonun iç fazı (dağılan faz) ve dış fazı (sürekli faz) olarak adlandırılırlar. Emülsiyon yapıcı maddelerin yardımı ile birbiriyle karışmayan bu iki farklı faz kararlı olarak birarada bulunabilirler. Yağlı faz, sulu faz ve emülsiyon yapıcı maddelerin yanısıra emülsiyon formülasyonun içine kullanım amacına göre farklı partikül boyutuna sahip etkin maddeler, fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kararlılığı arttırıcı maddeler, koku ve tat maddeleri eklenebilir (30, 78, 118).

Emülsiyonların başlıca üstünlükleri (5, 30, 93, 118, 119):

- Katı ilaç şekline göre etkin maddenin emiliminin artması ve böylece hastalarda ilaç biyoyararlanımının artması
- Çözeltilere ve diğer ilaç şekillerine göre fiziksel ve kimsayal yönden daha stabil olması
- Etkin maddelerin emilim ve penetrasyonunun ayarlanabilmesi
- Bazı makromoleküllü maddelerin gastrointestinal kanalda emilimlerinin artması
- İlaçların kötü olan tadının maskelenmesi
- Görünümünün güzel olması
- Çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin sıvı taşıyıcı sisteme konulabilmesi
- Yüzey yükü değiştirilerek hedefleme yapılabilmesi
- Sürekli veya hemen salım elde edilmesi
- İlaçların farklı yollardan uygulama imkanı sağlanarak, hedefleme yapılabilmesidir.

1.1.2 Emülgatörler (Yüzey Etkin Maddeler (YEM), Sürfaktanlar)

YEM'ler, bir fazın diğer bir faz içinde karalı bir şekilde dağılmasını sağlayan maddelerdir. İki faz arasındaki gerilimi düşürerek etki ederler. Bununla birlikte, yüzeylerarası bölgenin elektrostatik, statik ve reolojik özelliklerini düzelterek

emülsiyon kararlılığını arttırlar. YEM'nin kullanılan miktarı kalıcı bir film oluşturabilmesi için çok önemlidir (118).

Bir YEM'nin taşınması gereken özellikler (30):

- Emülsiyonun viskozitesini arttırmalı
- Derişimi düşük bile olsa emülsiyon oluşturabilmeli
- Suyu seven ve yağı seven ucu olmalı
- Toksik olmamalı
- Damlacıklar etrafında adsorbe olmalı, arayüzeyde film oluşturmali ve koalesansa engel olmalı
- Yüzey gerilimini 10 dyn/cm'in altına düşürebilmeli'dir.

YEM'ler, arayüzeyde oluşturdıkları filmin tipine, kimyasal yapılarına ve iyonik yüklerine göre sınıflandırılabilir (30).

YEM'lerin oluşturdıkları film tipine göre sınıflandırılması (30) :

- Monomoleküler film oluşturanlar
- Multimoleküler film oluşturanlar
- Katı partikül film oluşturanlar

YEM'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (5, 30) :

- Sentetik YEM'ler
- Yarı sentetik maddeler
- Doğal maddeler

YEM'lerin iyonik yapılarına göre sınıflandırılması (30, 59, 77) :

- Anyonik yüzey etkin maddeler
- Katyonik yüzey etkin maddeler
- Noniyonik yüzey etkin maddeler
- Amfoterik yüzey etkin maddeler

1.1.3 Emülsiyon Oluşum Teorileri (30, 119)

Emülsiyon oluşturma mekanizmalarının çoğu kayma etkisi altında damlacıkların parçalanmasına dayanmaktadır. Emülsiyonlar geniş bir yüzeylerarası alana ve bu alanla orantılı olarak bir iç yüzey enerjisine sahip olduklarından dolayı dayanıklıdır. Emülsiyonun stabilitesini arttırmak ve iki sıvının karışmasını kolaylaştırmak için serbest yüzey enerjisini azaltmak gerekir. Dispersiyon için gereken iş Eşitlik 1'de gösterildiği gibi hesaplanır.

$$W = \gamma \times ds \dots\dots\dots \text{Eşitlik 1}$$

W = Dispersiyon için gereken iş

γ = Yüzey gerilimi

ds = Değişen yüzey alanı

1.1.4 Emülgatörlerin (YEM'lerin) Emülsiyon Oluşturma Mekanizmaları (30, 34, 57, 119)

Emülsiyon oluşumu sırasında parçalanmış damlacıklar tekrardan bir araya gelip büyük damlacıklar oluşturabilirler. YEM'ler tekrar birleşme eğilimini Gibbs-Marangoni etkisi olarak bilinen bir mekanizma ile engellerler. Bu mekanizmaya göre; yüksek yüzey gerilimine sahip bir sıvı, düşük yüzey gerilimine sahip diğer bir sıvıya göre, kendisini çevreleyen sıvıyı daha güçlü çektiğinden; yüzey gerilimindeki bir gradientin varlığı, doğal olarak sıvının düşük yüzey gerilim bölgelerinden kaymasına neden olacaktır. Bu mekanizma aynı zamanda Bancroft genel kuralını da açıklamaktadır. Bu kural da; YEM'yi daha iyi çözen fazın emülsiyonun dış fazı (sürekli fazı) olduğunu belirtmektedir. Yine bu kurala göre; Y/S emülsiyonlarında, suda daha çok çözünen emülgatör (yüksek HLB YEM'leri); S/Y emülsiyonlarında ise yağda daha çok çözünen emülgatör (düşük HLB YEM'leri) kullanılmaktadır. YEM'lerin emülsiyon oluşturma mekanizmaları aşağıdaki üç madde ile olmaktadır.

1. Arayüzeyin gerilimini düşürmek
2. Arayüzey filmi oluşturmak
3. Elektiriksel çift tabaka oluşturmak

1.1.5 Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB)

1949 yılında Griffin tarafından geliştirilen hidrofilik-lipofilik balans sistemi YEM seçiminde kullanılmaktadır (30, 34, 119). Oluşan emülsiyonun tipi HLB değerine bağlıdır. Emülgatörlerin HLB değerleri 0 ile 20 arasında değişmektedir. Bu değer 20'ye yaklaştıkça emülgatör hidrofilik özellik kazanır. HLB değeri 8'den küçük olan emülgatörler lipofilik, büyük olanlar ise hidrofilik niteliktedir (5, 85).

HLB değerlerine göre YEM'lerin kullanım amaçları Tablo 1'de gösterilmiştir (30, 77, 119):

Tablo 1: HLB değeri ile emülgatör kullanımı arasındaki ilişki

HLB	Suda Dağılım	Uygulama
1-4	Yok	Köpük kırıcı
3-6	Zayıf	s/y emülgatör
6-8	Çalkalama ile sütsü dağılım	ıslatma ajanı
8-10	Dayanıklı sütsü dağılım	ıslatma ajanı, y/s emülgatör
10-13	Yarısaydam-berrak dağılımlar	y/s emülgatör
>13	Berrak çözelti	y/s emülgatör, çözündürme ajanı, peptizan

İki farklı emülgatörün karıştırılması ile de HLB değeri hesaplanabilir. Karışım YEM'lerinin HLB değerleri Eşitlik 2'deki gibi hesaplanmaktadır (5, 46).

$$HLB = HLB_a \times \left(\frac{W_a}{W_a + W_b} \right) + HLB_b \times \left(\frac{W_b}{W_a + W_b} \right) \dots\dots\dots \text{Eşitlik 2}$$

HLB_a: Birinci emülgatörün HLB değeri

HLB_b: İkinci emülgatörün HLB değeri

W_a: Birinci emülgatörün emülsiyondaki miktarı

W_b: İkinci emülgatörün emülsiyondaki miktarı

1.1.6 Emülsiyonların Fiziksel Stabilesi (118, 119)

Emülgatör tabakası ve damlacığın dışındaki kolloid yapı, emülsiyonun kararlılığını sağlayan faktörlerdir. Sistemin kararlı olması için emülgatör tabakasının ve damlacığın dışındaki kolloid yapının, damlacıkların yüzey alanının tamamını kaplayacak büyüklükte olduğu durumda kararlı olacaktır. Emülsiyon sisteminin kararlılığı; ısıtılarak, çalkalayarak, dondurup - çözülerek test edilmektedir. Emülsiyon sistemin kararlılığı Eşitlik 3'de gösterildiği gibi hesaplanır.

$$A = n \times \Pi \times d^2 = (6/p) \times (Q/d) \dots\dots\dots \text{Eşitlik 3}$$

A= Damlacıkların yüzey alanı

n= cm³'deki damlacık sayısı

Π= Ara yüzeydeki basınç

d= Damlacık boyutu (µm)

p= Yağın yoğunluğu (g/cm³)

Q= cm³'deki yağ miktarı (g)

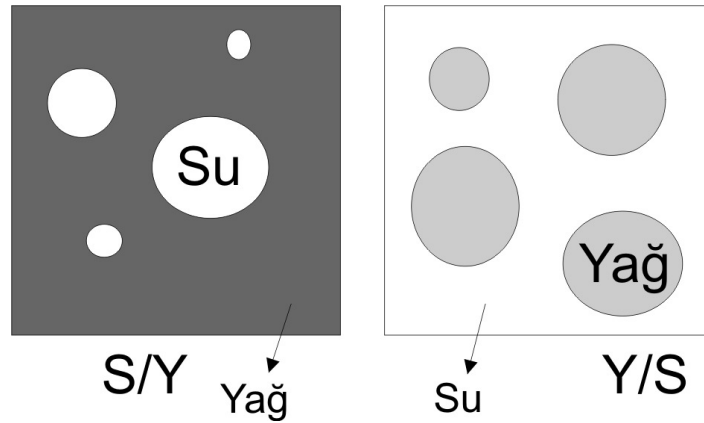
Emülsiyonların kararsız hale geçmesi başlıca beş mekanizma ile olmaktadır

(30, 85, 118, 119):

- Flokülasyon
- Kremalaşma
- Koalesans (biraraya gelme-yığılma)
- Faz ayrışması (breaking)
- Faz dönüşümü (phase inversion)

1.1.7 Emülsiyon Çeşitleri

Emülsiyonlar fazlarına göre Y/S ve S/Y tipi emülsiyonlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Eğer sulu faz içinde yağlı fazın damlacıkları dağılırsa, Y/S (su içinde yağ) emülsiyonu; yağlı faz içinde sulu fazın damlacıkları dağılırsa S/Y (yağ içinde su) emülsiyonu oluşmaktadır (Şekil 1) (30, 118).



Şekil 1 : Fazlarına göre emülsiyon tipleri

1.1.7.A. Uygulama Yollarına Göre Emülsiyon Çeşitleri (30, 119)

Emülsiyonlar uygulama şekline göre üç grupta sınıflandırılabilir :

Oral emülsiyonlar
Topikal emülsiyonlar
Parenteral emülsiyonlar

1.1.7.B. Damlacık Büyüklüklerine Göre Emülsiyon Çeşitleri (5, 67, 77, 118)

Damlacık büyüklüklerine göre emülsiyonlar 4 grup altında toplanabilir.

Çoklu Emülsiyonlar
Misel Emülsiyonlar (< 10 nm)
Mikroemülsiyonlar (10-200 nm)

Makroemülsiyonlar (> 200 nm)

1.1.8 Mikroemülsiyonlar

1.1.8.1 Mikroemülsiyon Tanımı

Mikroemülsiyonlar, iç faz damlacıklarının çapı 10 ile 200 nm arasında olan küçük damlacık büyüklüğüne sahip, düşük viskoziteli, termodinamik olarak dayanıklı, kendiliğinden oluşan, transparan (saydam) ve izotropik dispers sistemlerdir (6, 11, 19, 24, 25, 28, 31, 39, 55, 59, 62, 71, 72, 127). Bileşenlerin yeterli oranlarda karışımları üzerine kendiliğinden (spontan) oluşmaktadır. Mikroemülsiyonlar yağ fazı, su fazı, YEM ve YYEM'den oluşmaktadır. Bazen YYEM olmadan da mikroemülsiyon oluşmaktadır. Bunlara kendiliğinden emülsifiye olabilen (self-emülsifying) mikroemülsiyonlar denir. Bu sistemler yağ ve YEM'nin karıştırılması ile oluşan sistemlerdir (30, 31, 71, 72, 77, 78, 85, 103). Literatürler; saydam izotropik sistemlerin herhangi bir YYEM eklenmeden, non-iyonik YEM kullanarak da elde edilebileceği gösterilmiştir. Buna bağlı olarak YYEM eklenmeden de birçok mikroemülsiyon yapılmıştır. Bu sistemler oral kullanıldığında biyoyararlanımı düşük olan etkin maddelerin biyoyararlanımını arttıırırlar. Bu sistemlerin kendiliğinden oluşabilmesi yağ-su arayüzeyindeki gerilimin sıfır olması ile olur. Bu sistemlerdeki YEM'lerin rolü ; su ve yağ arasındaki arayüzey gerilimini azaltmaktır (5, 6, 112, 114, 118).

Hoar ve Schulman (56) ilk kez 1943 senesinde 'Nature' dergisinde mikroemülsiyonu, normal Y/S emülsiyonuna pentanol gibi orta zincir uzunluğundaki alkollerin ilave edilmesiyle oluşan saydam sistemler olarak tanımlamışlardır ve bu sistemlerin emülsiyonlar ve misel sistemler arasındaki ilişkisini ilk kez ortaya çıkmıştır. Daha sonra 1959 yılında Schulman çalışmasında (99) mikroemülsiyon oluşumunu dört bileşenli sistemde negatif yüzeyle arası gerilim değerini aşarak gerçekleştirmiştir. 1981 yılında ise; Danielsson ve Lindman (33) tarafından

mikroemülsiyonlar; surfaktan, yağ ve suyun optik olarak izotropik yapıdaki solüsyonları olarak belirlenmiştir.

Mikroemülsiyonların en önemli özellikleri berrak (saydam) olmasıdır. Damlacık büyüklüğünün ufak olması ile oluşan saydam bir mikroemülsiyon beyaz ışığı kırarak geçirir. Kolloidal dağılımların partikül büyüklükleri, görünür dalga boyundan daha büyüktür. Görünür dalga boyundan daha küçük olan partiküllerde, ışığın bütün yollara dağılması beklenir. Saçılmış ışık bir düzlem boyunca polarize olur ve her bir partikül yeni ışık dalgası oluşturur. Buna tindal etki, ışına tindal ışığı denir. Bu nedenle emülsiyonlar süt görünümündedirler. Mikroemülsiyonlar çok küçük damlacık boyutuna sahip oldukları için tindal etki çok düşüktür ve bu nedenle saydam görünmektedirler (71, 72, 118, 119).

Mikroemülsiyonlar düşük viskozitelidirler ve viskoziteleri Newton akış modeline uymaktadır. Jelleşme yapılarak, mikroemülsiyonların viskozitelerini arttırmak mümkündür (118). Mikroemülsiyonların viskoziteleri YEM filminin kalınlığı, damlacık boyutları, damlacık şekilleri ve damlacıklar arası etkileşimler hakkında bilgi verir (31).

Y/S mikroemülsiyonları, dış fazı yağ olan saf organik sürekli fazlara göre daha yüksek elektrik iletkenliğine sahiptirler. Çünkü mikroemülsiyon damlacıkları yük transfer etmektedirler. S/Y mikroemülsiyonlarının iletkenliği damlacıklar arasındaki iyon transferinin oranına bağlıdır. Mikroemülsiyonların iyon değiş tokuşu YEM'in yapısı, yağın tipi ve damlacık boyutu gibi deneysel parametrelerden etkilenmektedir (59).

Mikroemülsiyonlar yağ/su (Y/S) veya su/yağ (S/Y) tipinde sistemler olmalarına rağmen klasik emülsiyonlardan farklıdır (77, 112). Emülsiyonlar ve

hidrojeller gibi klasik formülasyonlar ile mikroemülsiyonlar karşılaştırıldığında; mikroemülsiyonların hidrofilik ve lipofilik çözünme bölgelerinin bir arada olmasından dolayı yüksek ilaç çözünürlüğüne ve büyük yağ/su ara yüzey alanına sahip oldukları görülmüştür (120). Mikroemülsiyonlar ile makro (klasik) emülsiyonların arasındaki en belirgin fark mikroemülsiyonların kendiliğinden oluşmasıdır. Buna ek olarak; emülsiyonlar stabil formülasyonlar değildir ve biyouygunluk açısından güçlü değişimleri olduğu tespit edilmiştir. Mikroemülsiyonlarda ise; YYEM'ler, YEM'ler arayüzey gerilimini düşürmeye yardımcı olurlar, böylece termodinamik olarak stabil hale gelirler (55, 74, 77). Klasik emülsiyonlar ile mikroemülsiyonların karşılaştırılması Tablo 2'de gösterilmiştir (5, 6, 30, 31, 32, 54, 62, 85, 112).

Tablo 2 :Mikroemülsiyonlar ile makroemülsiyonların karşılaştırılması

Özellik	Mikroemülsiyon	Klasik (makro) emülsiyon
İç fazın damlacık büyüklüğü	<0.2 µm	1µm-10 µm
Görünüş	Saydam	Süt görünümünde
Oluşum	Kendiliğinden oluşur	Enerji vermek gerekir
Stabilite	Termodinamik olarak dayanıklı	Termodinamik olarak dayanıksız

1.1.8.2 Mikroemülsiyonların Avantajları

Mikroemülsiyonlar, yüksek apolar moleküllerin çözünmesine izin vermesi, ilaç taşıma ve kapsülleme özelliklerinden dolayı farmasötik formülasyonlarda, kozmetik formülasyonlarda ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Yapısında lipofilik ve hidrofilik bileşenler olmasından dolayı yüksek çözünürlük kapasitesine, ayrıca büyük yüzeylerarası alana sahip olmalarından dolayı da katalizörler gibi fonksiyonlara sahip olduklarından kimyasal reaksiyonların etkinliğini arttırabilirler (95).

Mikroemülsiyonların diğer formülasyonlara göre bazı üstünlükleri bulunmaktadır. Bunlar (5, 23, 24, 25, 28, 30, 31, 32, 54, 62, 71, 72 74, 81, 85, 92, 112, 118, 119, 122, 123) :

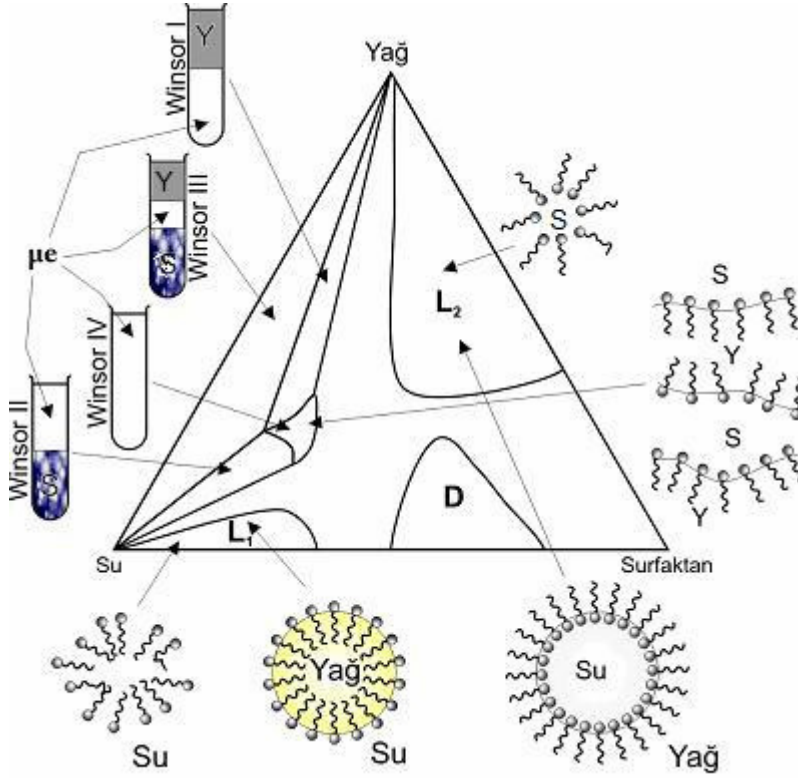
1. Damlacık büyüklüğünün ufak olması ve termodinamik olarak dayanıklı olması sebebiyle hidrofobik etkin maddeleri içeren formülasyonların hazırlanmasında kullanılabilir. Bu formülasyon, katı ilaç şekillerine ve emülsiyonlara göre daha hızlı emilip yüksek biyoyararlanım gösterir. Aynı zamanda parenteral yol ile verilmesi uygundur.
2. Penetrasyon artırıcı özelliğe sahiptirler.
3. Etkin maddelerin fizyolojik koşullardan (pH, safra salgısı ve yiyecekler gibi) etkilenmesini azaltırlar.
4. Çocuklar ve yetişkinler için yutulması güç olan katı ilaç şekillerine göre kullanımı daha kolaydır.
5. Diğer formülasyonlara göre hazırlama yöntemleri daha kolaydır.
6. Yüksek yüzey alanına sahip olmalarından dolayı, etkin maddeler için yüksek çözünürlük kapasiteleri vardır.
7. Steroidler, hormonlar, diüretikler, peptidler ve antivirütikler için ideal sistemlerdir.
8. İlacın mide bağırsak sıvılarına karşı korunması nedeniyle stabiliteleri yüksektir.
9. Yapısında YEM bulunduğu için membran akışkanlığı daha kolaydır.
10. Akış tipi Newton akış tipine uyarak, düşük viskozite gösterirler.
11. Mikroemülsiyonlar, hem su hem de yağ içermelerinden dolayı formülasyonda hem yağda hem de suda çözünebilen etkin maddelerin kullanımına izin verip, spesifik tedaviyi sağlama imkanı sunmaktadırlar.
12. Mikroemülsiyonlar stabil olduğu için faz ayırmasına izin vermemektedirler.
13. Mikroemülsiyonların ilaç dağılımı yavaş olmakla birlikte kontrol edilebilmektedir ve daha da önemlisi ilaç hedeflenebilmesi yapılabilmektedir.
14. Nanometrik boyutlarda olduklarından kutanöz uygulamada ilaçların transdermal difüzyonu geliştirilebilmektedir.
15. Mikroemülsiyondaki YEM molekülünün yapısına bağlı olarak bağırsak duvarında ilacın penetrasyon oranı artmaktadır.

Mikroemülsiyonların avantajları yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Mikroemülsiyon oluşumunda kullanılan YEM'lerin yüksek miktardaki konsantrasyonları toksisiteye yol açabilmektedir. Ayrıca YEM'ler deriye uygulandığında irritasyona yol açabilmektedir. Bu özellikle dermal olarak uygulanan mikroemülsiyonlar için çok önemlidir. Bununla birlikte yapılan bir çok çalışmada non-iyonik YEM'ler ile hazırlanan mikroemülsiyonların, uygulama sonrası deri üzerinde herhangi bir irritasyon etki oluşturmadığı gösterilmiştir (20, 23, 25, 50, 68).

Ayrıca mikroemülsiyonların viskozitelerinin genelde düşük olması topikal olarak kullanımlarını da kısıtlamaktadır. Buna engel olmak için, mikroemülsiyonların viskozitelerini jelleşmeyi arttırıcı maddelerle modifiye etmek olasıdır. Y/S mikroemülsiyonunda, jelatin ve lesitin yardımı ile koloidal silisyum oksit kullanarak, S/Y mikroemülsiyonunda ise ksantan zamkı, karragenat veya karbopol 934 kullanarak jelleşme sağlanabilmektedir (62, 85, 114).

1.1.8.3 Mikroemülsiyonların Yapısı

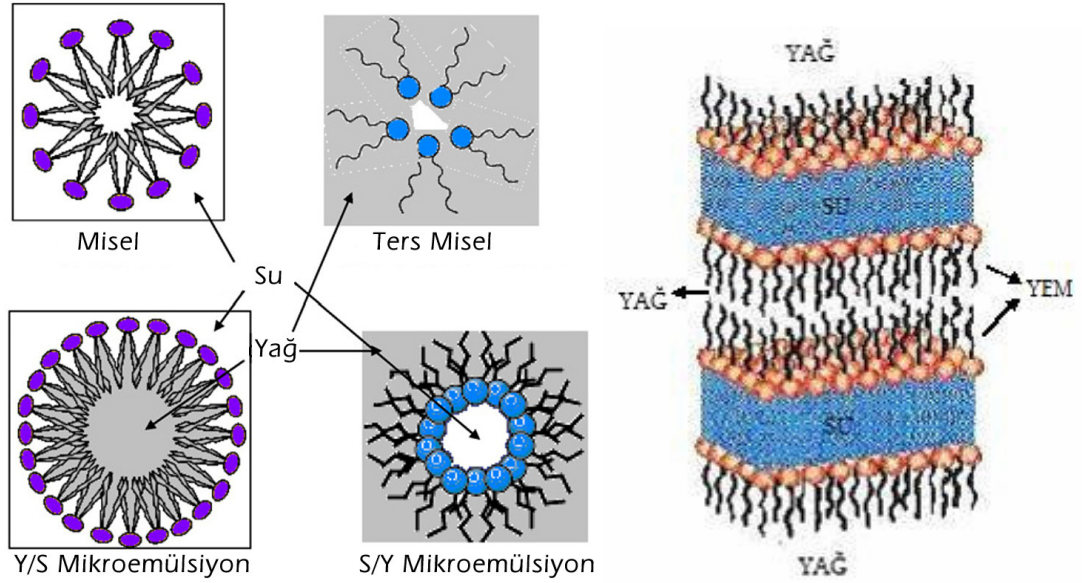
Mikroemülsiyonların Winsor-I, Winsor-II, Winsor-III, Winsor-IV olmak üzere dört tipi mevcuttur. Winsor-I diye adlandırılan fazda mikroemülsiyon ve yağ olmak üzere iki faz vardır. Bu fazın üst kısmında atık fazla yağ bulunur, alt kısmında mikroemülsiyon oluşur. Winsor-II'de de su ve mikroemülsiyon olmak üzere 2 faz vardır, burada üst kısımda mikroemülsiyon oluşup, alt kısımda atık olan su bulunmaktadır. Winsor-III'de ise 3 faz mevcuttur, bu fazlar S/Y, Y/S ve geçişli (bicontinuous = bikontinyus) mikroemülsiyon fazıdır. Burada ise mikroemülsiyon orta kısımda oluşmaktadır. Winsor-4 tipinde, yağ su ve YEM'nin homojen olarak karışması ile elde edilen sadece bir faz vardır. Bu fazlar üçgen faz diyagramında Şekil 2'de gösterilmiştir (71, 72, 121).



Şekil 2 : Winsor sınıflandırma sistemine göre su-yağ-YEM karışımının üçgen faz diyagramının şematik gösterimi: L1, normal miseller yada yağ/su (Y/S) mikroemülsiyonu, L2, ters miseller veya su/yağ (S/Y) mikroemülsiyonları, D, anizotropik lamelar likit kristal fazı.

Y/S ve S/Y tipi mikroemülsiyonların damlacıkları YEM ve YYEM moleküllerinden oluşan film ile çevrilmiştir. Dış fazı yağ olan (S/Y) mikroemülsiyonunda amfifilik molekülün hidrofobik kısmı dış faza, hidrofilik kısmı ise su damlacığının içine yönelmiş durumdadır. Bu tip mikroemülsiyonlar ters miseller ya da likit faz (L2 faz) olarak da adlandırılmaktadır. Dış fazı su olan (Y/S) mikroemülsiyonunda amfifilik molekülün hidrofobik kısmı yağ damlacığının içine yönelmiş, hidrofilik kısımları ise dış faza yönelmiş halde bulunmaktadır (Şekil 2). Şekil 3’da mikroemülsiyonların yapısı gösterilmektedir. Geçişli mikroemülsiyonlarda ise su, yağ ve YEM oranı eşittir. Bu tip mikroemülsiyon, çok köşeli olup, yağ ve su fazları amfifili çok olan bir tabaka ile ayrılmıştır ve geçişli

mikroemülsiyonlar tek tabakalı olarak YEM'nin su ve yağda dağılması ile oluşmaktadırlar (2, 6, 28, 30, 31, 55, 71, 72, 76, 105, 112, 120).



Şekil 3 : S/Y, Y/S ve bikontinyus mikroemülsiyonlarının yapısı ve görünüşü (76, 77, 85)

Mikroemülsiyonun S/Y veya Y/S tipinde oluşumu YEM'in yapısıyla ilişkilidir. Bu ilişki Eşitlik 4 ile hesaplanabilir (5, 31, 77).

$$CPP = V / (a \times l) \dots \dots \dots \text{Eşitlik 4}$$

CPP = Kritik topaklanma parametresi
V = YEM molekülünün hacmi
a = YEM'in baş kısmının alanı
l = YEM'in uzunluğu

CPP değeri, 0-1 arasında ise Y/S tipi, 1'den büyük ise S/Y tipi mikroemülsiyon oluşmaktadır. CPP değeri 1 olduğunda ise geçişli mikroemülsiyon oluşmaktadır (31).

1.1.8.4 Mikroemülsiyonların Faz Çalışmaları (2, 31, 34, 85, 94)

Mikroemülsiyon oluşumu sistemi oluşturacak bileşenlerle gerçekleşmektedir. Bir sistemde var olan fazların sayısı bileşenler ile değişmektedir ve bu faz diyagramında grafiklenmiştir. Şekil 4'te gösterildiği gibi hipotetik faz diyagramlarında, sistemin bileşenlerinin konsantrasyonu belirlenebilmektedir.

miseller olarak parçalanır ve bu sıcaklığın üstünde, tercihen yağ fazı içine suda şişen invert miseller olarak parçalanır. HLB'nin PIT'a dayanmasının avantajı, YEM-yag-su etkileşimlerinin otomatik olarak HLB kriterini kapsamasıdır. Benzer olarak, stabil emülsiyonlar için sık sık gereken YYEM'lerin etkisi PIT'ın içinde bir değişiklik olarak hesaba katılır. Sonuç olarak, HLB sıcaklığının PIT'a dayanması, emülsiyon tipi ve üçlü faz davranışı arasında güçlü bir korelasyona imkan verir. Sıcaklık değişimi ile oluşan faz değişimi Şekil 5'de gösterilmiştir.

Şekil 5 : Düşük sıcaklıktaki Y/S sistemlerin, sıcaklığın etkisiyle eşit konsantrasyonlu geçişli mikroemülsiyonlara ve daha yüksek sıcaklıkta S/Y sistemlerine geçişinin şematik gösterimi.

Mikroemülsiyonların oluşum teorilerini üç sınıfta toplayabiliriz. Bunlar (31, 71, 72) :

1.1.8.5.1 Karışım Film Teorisi

fazlarında farklı özellikte çift tabakalı bir film olduğu düşünülmektedir. Yağ ile su ara yüzeyinde YEM'nin basıncı Eşitlik 5'teki gibi hesaplanmıştır (5, 31).

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \dots\dots\dots \text{Eşitlik 5}$$

Π = Arayüzeydeki basınç

γ_0 = Sistemde YEM'nin bulunmadığı yüzeylerarası gerilim

γ = Sistemde YEM'nin bulunduğu yüzeylerarası gerilim

1.1.8.5.2 Çözünürlük Teorisi

Bu teoride mikroemülsiyonlar yağ ve suyun miseller içinde çözündüğü şişmiş misel sistemler olarak kabul edilirler (5, 31, 72).

1.1.8.5.3 Termodinamik Teori

Termodinamik olarak kararlı bir mikroemülsiyonun oluşması için serbest enerjinin negatif olması gerekmektedir. Eşitlik 6'da serbest enerji hesaplaması gösterilmiştir.

$$-\Delta G = V \times \Delta A \dots\dots\dots \text{Eşitlik 6}$$

$-\Delta G$ = Serbest Enerji

V = İki faz arasındaki yüzeyler arasındaki gerilim

ΔA = Yüzey alanındaki değişim

Yüzey alanı sıfır olamadığı için, yüzeylerarası gerilim; sistemin serbest enerjisinin azalması ile azalmaktadır.

Mikroemülsiyon oluşumunda serbest enerjiyi belirleyen üç bileşen vardır:

1. Damlacıklar arasındaki etkileşim enerjisi
2. Ortamdaki damlacıkların entropisi
3. Yüzeylerarası serbest enerji

Serbest enerji değişimi Eşitlik 7'de görülmektedir.

$$\Delta G_m(r) = \Delta G_1 + \Delta G_2 - T \Delta S_m \dots\dots\dots \text{Eşitlik 7}$$

ΔG_m = Serbest enerjideki değişim

(r) = Damlacıkların çapı

ΔG_1 ve ΔG_2 = Yüzeylerarası serbest enerji ve damlacıklar arasındaki etkileşim enerjisi

T = Sıcaklık

ΔS_m = Karışımın entropisi

Yüzeylerarasındaki etkin madde ve YYEM yüzeylerarasındaki gerilimi düşürür ve negatif ΔG değeri bulunur. Serbest enerji negatif olunca, spontan termodinamik olarak dayanıklı mikroemülsiyonlar oluşmaktadır (5, 31, 54, 77).

1.1.8.6 Mikroemülsiyonların Karakteristik Özellikleri

Mikroemülsiyonların yapısı değişik yöntemlerle incelenebilmektedir. Mikroemülsiyonların tanınmasında küçük damlacıkların fiziksel özellikleri önemlidir (30,112). Mikroemülsiyonlar izotropik olarak açık ve temiz görüntüye sahip olmalarından dolayı spektroskopik olarak kolayca analiz edilebilmektedirler (62, 71, 72).

1.1.8.6.1 Optik Özellikleri

1.1.8.6.1.1 Saydamlık

Sistemi oluşturan damlacıkların görünür ışığın dalga boyunun $\frac{1}{4}$ 'ünden daha küçük olması durumunda mikroemülsiyon sistemi transparan yani saydam olmaktadır (31, 112).

1.1.8.6.1.2 Tindal Etki

Görünür ışığın dalga boyundan daha küçük olan partiküllerde ışık bütün yönlerde saçılır. Saçılmış ışık bir düzlem boyunca polarize olur ve her partikül yeni bir ışık dalgası oluşturur. Buna tindal etki, ışına tindal ışın denir (112).

1.1.8.6.2 Damlacık Özellikleri

Mikroemülsiyonların damlacık boyutu tayininde (6, 54, 55, 71, 72, 74, 77, 85, 112);

- *Elektron Mikroskobu*

- *Işık Saçılımı (light scattering):*

- SAXS (Small angle X-ray) (küçük açılı X ışını saçılımı),
- SANS (Small angle neutron scattering) (küçük açılı nöron saçılımı),

- QELS (Quexielastic light scattering) (kuasielastik ışık saçılımı),
- PCS (Photon correlation spectrophometer) (foton korelasyon spektroskopisi) ,
- TILS (Total indexide light scattering) (total indesite ışık saçılımı) ,
- DLS (Dinamic light scattering) (dinamik ışık saçılımı) ,
- SLS (Static light scattering) (statik ışık saçılımı) ,
- SD NMR (Substance difussion nuclear magnetic resonance) (öz difüzyon nükleer manyetik rezonans) gibi yöntemler kullanılmaktadır.

1.1.8.7 Mikroemülsiyonların Veriliş Şekilleri (31, 62, 71, 72, 112, 119)

Mikroemülsiyonların ilaç taşıyıcı amaçla kullanılmasının başlıca iki önemli sebebi bulunmaktadır. Bunlardan biri, denetimli şekilde ilaç salınımı sağlamak, ikinci ise, ilaçların topikal ve sistemik olarak emilimlerini arttırmaktır. Bu amaçla kullanılan mikroemülsiyonlar vücuda çeşitli şekilde uygulanmaktadır. Bunlar:

- Oral uygulama
- Topikal uygulama
- Parenteral uygulama
- Oküler uygulama
- Rektal uygulama
- Pulmoner uygulama
- Nazal uygulama
- Periodontal uygulama
- Bukkal uygulama
- Intravajinal uygulama

1.1.8.7.1 Mikroemülsiyonların Topikal Olarak Uygulanması

Mikroemülsiyonlar hastalara yukarıda da sıralandığı gibi değişik yollarla uygulanabilmektedir. Fakat mikroemülsiyonların topikal uygulanmasına ilginin artması ile diğer yollara göre daha çok kullanılması sağlanmıştır (62, 85, 115, 122, 123, 127). In vitro deri permeasyon (geçiş) çalışmaları, mikroemülsiyonların topikal olarak uygulanmasının uygun olduğunu kanıtlamıştır (6, 67, 68, 69, 87, 112). Topikal olarak kullanılan mikroemülsiyonlar, ilaçların terapötik aktivitelerini olumlu yönde değiştirmekte olup, özellikle Y/S mikroemülsiyonlarının su deposu etkileri sergilemelerinden dolayı topikal dağılımda lokal ilacın etkisinin arttığı görülmüştür (28, 92).

Transdermal ilaç dağılımına birçok faktör etki etmektedir. Bunlar; mikroemülsiyonun iç fazının geçirgenliği, mikroemülsiyon bileşenlerinin stratum korneum bariyerini indirgemesi, deriye artan konsantrasyon gradientinin olması ve dağılan fazın depo görevi yaparak sürekli fazda sabit bir konsantrasyon oluşturmalarının mümkün olmasıdır. Transdermal dağılımda, hedef dozun ayarlanması için sistemik dolaşımda deri boyunca geçişin en yüksek değerde olması gerekir. Perkütanöz geçişi geliştirmek için; ilacın konsantrasyonunu değiştirmek ya da transdermal dağılım için uygun bir araç seçmektir (25, 62). Bunun dışında, transdermal geçişi belirleyen başlıca üç faktör vardır. Bunlar ; formülasyon içindeki ilacın hareketi, formülasyondan ilacın salımı ve deri üzerindeki ilacın geçiştir. Bu faktörler özellikle stratum korneumu etkilediği gibi, derideki ilacın geçişi veya deri üzerindeki ilacın durumu gibi diğer termodinamik aktiviteleri de etkilemektedir (85).

İlaçların dermal ve transdermal uygulamasında, mikroemülsiyonların avantajları bazı mekanizmalarla anlatılabilir. Birincisi; formülasyondaki yüksek miktardaki ilacın deriye doğru artan termodinamik aktivitesi, ikincisi; artan termodinamik aktivite ile deri üzerinde ilacın partiküle olması, üçüncüsü; mikroemülsiyon içindeki bileşiklerin stratum korneumun difüzyon bariyerini azaltıp, içeriğindeki geçişi arttıran maddelerin ilacın deriden geçişini arttırmasıdır. Ayrıca mikroemülsiyonun stratum korneumdaki hidrasyon etkisi formülasyonun geçiş kabiliyetini etkilemektedir (98, 106, 126, 127).

Mikroemülsiyonlar deriye farklı mekanizmalar ile etki etmektedir. Bu mekanizmalar; mikroemülsiyon formülasyonunun terkinde yer alan maddeler nedeni ile uygulanması sonrası, derinin geçirgenliğinin değişmesi, yine mikroemülsiyon formülasyonunda yüksek oranda bulunan YEM'lerin veya YYEM'lerin penetrasyonu arttırması ve formülasyon içerisindeki ilacın deriye olan

uygunluğu nedeniyle formülasyondaki ilacın deriye geçişinin artması şeklinde anlatılabilmektedir (14).

Aynı zamanda mikroemülsiyonların topikal olarak kullanılmasının, uygulama kolaylığı ve karaciğer ilk geçiş etkisinden kaçınılmasından dolayı uygun olduğu ispatlanmıştır. Topikal uygulanan mikroemülsiyon formülasyonlarının klasik emülsiyon ve jellere göre daha etkili olduğu bulunmuştur (30, 31, 118). Mikroemülsiyonlarda penetrasyon oranı klasik emülsiyonlara göre daha yüksektir. Krem, losyon gibi emülsiyonlarda YEM'ler arası etkileşim kuvvetlidir, bu kuvvet; arayüzey membrandaki formülasyonda i  ve dış fazlar arasındaki ilacın mobilitesini sınırlandırmaktadır (74). Topikal olarak uygulanan bazı ilaçların, klasik emülsiyon ve jellere göre mikroem lsiyonlardan transdermal dağılımı daha kolay olmaktadır. Mikroemülsiyon içindeki ilacın hareketi daha kolay olmanın yanında, jel şeklinde olan bir mikroemülsiyonun artan viskozitesi ile deri penetrasyonu azalmaktadır (85). İlaç, termodinamik olarak stabil olan mikroemülsiyonun fazları arasından (esnek yüzeylerarası YEM filmi) geçerken kısımlara ayrılır ve stratum korneumdan difüzyonu bu sayede artar (74). Ayrıca   zeltiller ile karşılaştırıldığında da mikroemülsiyonların biyoyararlanımlarının çok daha iyi olduğu saptanmıştır (31).

Bazen mikroemülsiyon formülasyonunun içindeki damlacıkların tuttuğu ilaç deriden geçişi azaltabilmektedir. Örneğin; dağılan sistemlerde YEM'in artan konsantrasyonu, ilaç salınımını ve deriden geçişi azaltabilir. Stratum corneumun yapısına uygun olan geçişi arttıran ajanların kullanılması ile transdermal geçiş geliştirilebilmektedir. Geçişi arttıran ajanlar; stratum korneum bariyerinin direncini azaltarak ilaç penetrasyonunu arttırmaktadırlar. Bununla birlikte topikal formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan noniyonik surfaktanların derinin bariyer yapısına etki ettiği çeşitli çalışmalarda göstermiştir (17, 23, 106, 115).

1.2 Transdermal Sistemler (1, 13, 19, 29, 37, 39, 55, 74 , 86, 87, 97, 106, 119)

Transdermal sistemler ilacı deri yoluyla kontrollü vererek sistemik etki sağlayabilirler. Etkin maddenin sistemik etki amacıyla transdermal yoldan verilmesi her ne kadar yeni olsa da, deri yoluyla ilaç uygulanması eskiden beri yapılan işlemdir. Bazı avantajlar sağlamalarından dolayı, dermal ve transdermal ürünlere olan ilgi sürekli olarak artmaktadır. Etkin maddeler deriye lokal yada sistemik etki göstermesi için uygulanır. Transdermal sistemler sistemik etki amacıyla, ilacın dağılım oranını ve ayarını kontrol ederler. Transdermal yoldan ilaç uygulamaya olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır, çünkü aşağıda bahsedildiği gibi bazı üstünlük ve avantajları vardır.

Transdermal verilişin başlıca avantajları:

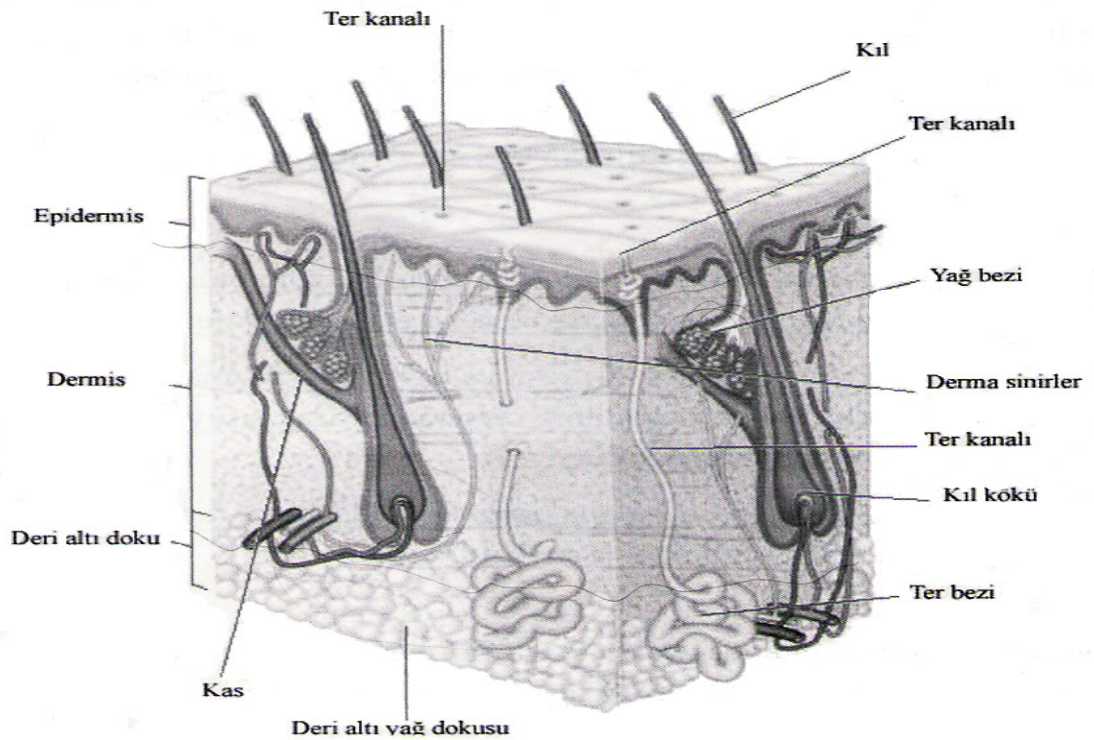
- Oral yol ile emilimi az olan ilaçların bu yolla verilebilmesi mümkün olur
- Mide ve bağırsak sisteminde tahriş yaratan ya da ilk geçiş etkisine uğrayan ilaçların bu yolla verilmesini sağlar
- Etkin maddeler hedeflenebilir
- Uygulaması ve çıkartılması diğer yollara göre daha kolaydır
- İlacın sürekli ve denetimli plazma düzeyi sağlanabilir ve böylece yan etkiler azaltıp, hasta uyuncu arttırılabilir
- Sıfırinci derece kinetik ile ilaç verilmesi bu yolla mümkündür
- Oral yola karşın, başka ilaçlarla beraber kullanıldığında, ilaç etkileşimi önlenir
- Uygulama açısından daha güvenlidir
- Fiziksel ve farmakolojik yanıtı arttırır
- Hem lokal hem sistemik etki sağlanabilmektedir
- Oral ve parenteral yola göre sistemik yan etkileri en azdır.

Transdermal sistemin avantajları yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi; deriye uygulandığında alerjik ve iritan reaksiyonlar gösterebilir. Derinin geçirgenliği yaşa ve fiziksel koşullara bağlıdır bu nedenle geçirgenliği düşük olan deriye ilaç uygulanması bazı ilaçların (düşük derişimde etkili olup farmakolojik olarak güçlü etkiye sahip olan ilaçlar gibi) kullanımını sınırlandırır. Bunun yanında yüksek dozda etkin maddelerin deriye uygulanması zordur. Aynı zamanda bazı ilaçların fizikokimyasal özelliklerinin uygun

olmaması, derinin etkin bariyere sahip olması ve medikal kullanım için yetersiz olmalarından dolayı dermal ilaç kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle derinin geçirgenliği arttırılıp, ilaçların farmakokinetik ya da farmasötik karakterleri düzenlenerek ilaçların etkin ve terapötik düzeye getirilip topikal kullanımları mümkün olabilmektedir.

1.2.1 Deri

Deri 0.5-3 mm kalınlığında bir organdır. 1.7- 2 m² büyüklüğündedir. Bütün vücudu fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere karşı korur. Vücut sıcaklığını korumada bir termostat gibi rol oynar. Kan basıncını denetler. Ayrıca UV ışınlarına karşı iyi bir koruma sağlar. Derinin yüzeyi bir asit mantosu ile kaplıdır. pH'sı 5.2-5.6 arasındadır. Ayrıca yüksek miktarda kalsiyum iyonu içerir. Derinin yapısı Şekil 6'da gösterilmiştir (1, 37, 43, 80).



Şekil 6 : Derinin yapısı

Deri başlıca içten dışa 3 tabakadan meydana gelir:

1. Deri altı (Hipodermis)
2. Dermis (Corium)
3. Epidermis

1.2.1.1 Hipodermis

Bu doku dermisin hemen altındadır ve büyük miktarlarda yağ üreten ve depolayan hücrelerden oluşur. Fiziksel destek verir, kollajenler yoluyla deriye esneklik sağlar ve ısı yalıtımını temin eder. Ayrıca kan damarları bu tabakadadır (1, 37, 80).

1.2.1.2 Dermis

Daha az yağ içiren fibröz bir yapıdır. Kalınlığı 1-4 mm arasında değişir. Ana bileşeni lif demetleri halinde bulunan kollajendir. Dermiste 3 tür bez vardır (1, 37, 80):

1. Pilosebace bezler (saç folikülleri ve yağ bezleri)
2. Ekrin bezler (terlemeden sorumludur)
3. Apokrin bezler

1.2.1.3 Epidermis

En dış tabakadır. Kalınlığı bulunduğu bölgeye göre 150-200 µm arasında değişir. Kan damarı ve lenfatik sistem içermez. 5 tabaka içerir (1, 37, 43, 80):

- 1- Bazal tabaka (stratum germinativum)
- 2- Prickle (diken, sivri uç) tabakası (stratum spinosum)
- 3- Granüler tabaka (stratum granulosum)
- 4- Stratum lucidum
- 5- Boynuzsu tabaka (stratum korneum)

1.2.2 Deriden Geçiş (1, 37, 48, 53, 65, 74)

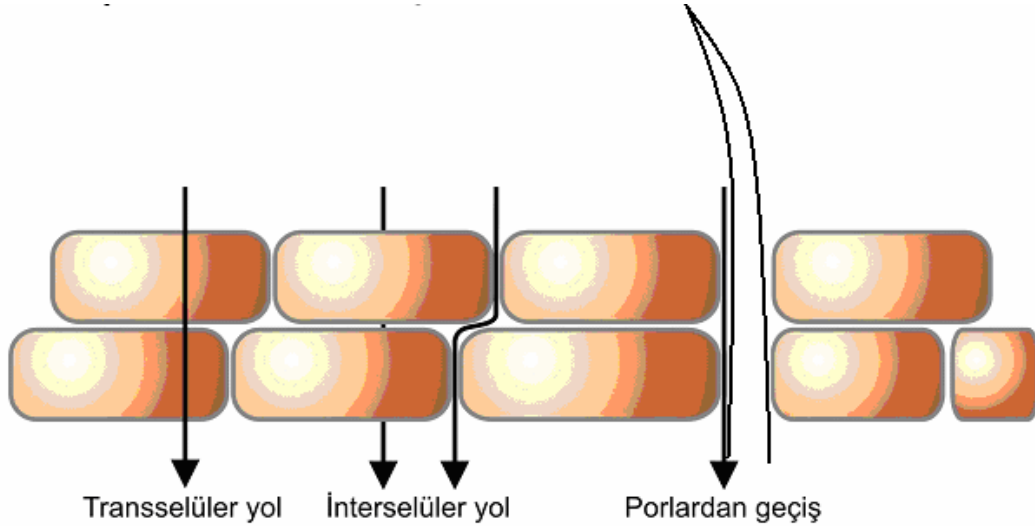
Stratum korneumun dış tabakasında ilaç partisiyonu geçişin birinci aşamasıdır. İkinci aşamada, ilaç epidermisten pasif difüzyonla geçer. Üçüncü aşama ise dermise penetrasyondur. İlaç epidermisten ve üst dermisten difüze olur. Sonuç olarak deri altı damarlarından emilerek sistemik dolaşıma katılır.

Transdermal ilaç dağılımı için en önemli bariyer derinin en dış tabakası olan stratum korneumdur. İlaç penetrasyonunda deri direncinin üstesinden gelmek için başlıca yol derinin yapısını değiştirerek penetrasyonu kolaylaştıracak maddelerin, penetrasyon arttırıcıların ve ilaç taşıyıcı sistemlerin seçimini iyi yapmaktır.

Deriden geçiş 3 yol ile olmaktadır. Bunlar:

1. Stratum korneumu delerek (transepidermal yol, transselüler yol)
2. Hücreler arası geçiş (interselüler yol)
3. Yan geçit yolu (porlardan geçiş, shunt route, transappendageal pathway)

Şekil 7’de deriden geçişin şekilleri gösterilmektedir.



Şekil 7 : Deriden geçiş yollarının şematik görünüşü

1.2.2.1 Deriden Geçişin Kinetiği (1, 37)

Bir ilacın deriden geçebilmesi için fizikokimyasal özelliklerinin stratum korneumdan geçmeye uygun olması gerekir. İlacın deriden geçiş hızı Eşitlik 8’de gösterildiği gibidir.

$$dQ/dt = P_s \times (C_d - C_r) \dots \dots \dots \text{Eşitlik 8}$$

dQ/dt = Deriden geçiş hızı

P_s : Geçirgenlik katsayısı

C_d : Etkin maddenin deri üzerindeki derişimi

C_r : Etkin maddenin alıcı kompartımandaki derişimi

Ayrıca buradan geçirgenlik katsayısı Eşitlik 9'da gösterildiği gibi hesaplanır.

$$P_s = K_s \cdot D_{ss} / h_s \dots\dots\dots \text{Eşitlik 9}$$

P_s = Geçirgenlik katsayısı

K_s : Etkin maddenin deri üzerinde bulunduğu ortam ile stratum korneum ara yüzeyindeki partiyon katsayısı

D_{ss} : Etkin maddenin denge durumundaki difüzyon katsayısı

h_s : Geçişin olduğu derinin kalınlığı

Deriden emilimi etkileyen faktörleri 4 gruba ayırmak mümkündür.

1.2.2.1.1 Biyolojik Faktörler

Deriden penetrasyon yaşa, cinsiyete, derinin ait olduğu vücut bölgesine ve hidrasyonuna bağlı olarak değişir.

1.2.2.1.2 Derinin Fizyolojik Durumu, Deri Hidrasyonu

Derinin fazla suyu depo gibi biriktirdiği ve fizyolojik gereksinime göre kullanıma hazır hale getirdiği bilinmektedir. Deri proteinleri ve mukopolisakkaritler özellikle hiyaloluronik asid derinin su içeriğini kontrol etmede önemli rol oynar.

1.2.2.1.3 Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri

Etkin maddenin hidrojen bağı oluşturma yeteneği ve kapasitesi, çözünürlük parametresi, oktanol/su partiyon katsayısı gibi fizikokimyasal özellikleri deriden geçişte etkili faktörlerdir.

1.2.2.1.4 Formülasyon ve Kullanılan Yardımcı Maddelerin Etkisi

Etkin maddenin öncelikle verildiği formülasyondan salınması gerekir. Sonra difüzyon teorisindeki gibi etkin madde önce membrandan geçecektir. Formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler penetrasyon arttırıcı maddeler olabilir ya da deri tabakasındaki partiyonu etkileyebilirler.

1.2.2.3 Deriden Geçişin Arttırılması (1, 15, 37, 53, 90, 119)

1- Fiziksel yöntemlerle deriden geçişin arttırılması

- Fonoforez, ultrason, sonoforez (sonophoresis-phonophoresis)
- Elektrodeme (elektroporation)

- İyontoforez (iontophoresis)
- 2- Fizikokimyasal yöntemler ile deriden geçişin arttırılması
- İyonik özellikler
 - Aşırı doygunluk (süpersatürasyon)
 - Enantiyo seçicilik
 - Lipozom formülasyonları
- 3- Kimyasal yöntemlerle deriden geçişin arttırılması

1.2.2.3.1 Penetrasyon Arttırıcılar

Etkin maddenin deriden daha rahat ve hızlı geçebilmesi, ilaçların terapötik aktivitelerini gösterebilmeleri için formülasyonda penetrasyon arttırıcılar kullanılmaktadır. Bunlar; stratum korneumdaki lipid tabakalarının yapısını bozarak ve etkin maddenin stratum korneumdaki çözünürlüklerini arttırarak, transdermal geçişi arttırmaktadırlar. Penetrasyon arttırıcılar aşağıdaki gibi gruplandırılabilir:

- Alkil sülfoksidler
- Azonlar
- Yağ alkolleri
- Yağ asitleri
- Lizo ve kısa zincirli fosfolipidler
- YEM'ler

1.2.2.4 Transdermal Preparatların Denetimi (21, 37)

Hazırlanan preparatların denetimleri sırasıyla;

In vitro denetimler

- Farmokope denetimleri (miktar tayini, salım deneyleri, Amerikan Farmakopesi yöntemleri)
- Çeşitli hücrelerle yapılan denetimler

In vivo denetimler

- Hayvan çalışmaları
- İnsan çalışmaları ile yapılmaktadır.

1.3 Ağrı

Ağrı vücudun belirli bir bölgesinden kaynaklanan, herhangi bir doku harabiyetine bağlı olarak veya olmayarak gelişen, insanın geçmişteki deneyimleriyle de ilgili olabilen hoş olmayan bir duygudur. Ağrı sözü edildiğinde, bunun çok sayıda türleri olduğu görülmektedir. Ancak, bunların içinde en çok sözü edilenler nosiseptif

ve nöropatik ağrıdır. Nosiseptif ağrı, vücudun bir bölgesinde doku hasarı olduğu zaman, bunun nosiseptör adı verilen özelleşmiş sinir uçları ile algılanıp santral sinir sistemine iletilmesi ve belirli bölge ve nöral yapılarda integre edilerek bu zararlı tehdit durumunun algılanması ve buna karşı gereken fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir. Nöropatik ağrı ise, sinir sisteminden kaynaklanır. Sinir zedelenmesine bağlı, sekonder nöroplastik değişiklikler sonucunda oluşur (3, 45, 49).

1.3.1 Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Ağrı Kesici Etki Mekanizmaları

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), primer etkilerini siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu sonucu prostaglandin oluşumunu inhibe ederek gösterirler. COX enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. COX enzim alt tiplerinin özellikleri Tablo 3’de ve Şekil 8’de belirtilmiştir (4, 52, 79).

Tablo 3 : Enzim alt tipleri ve vücutta bulundukları yerler

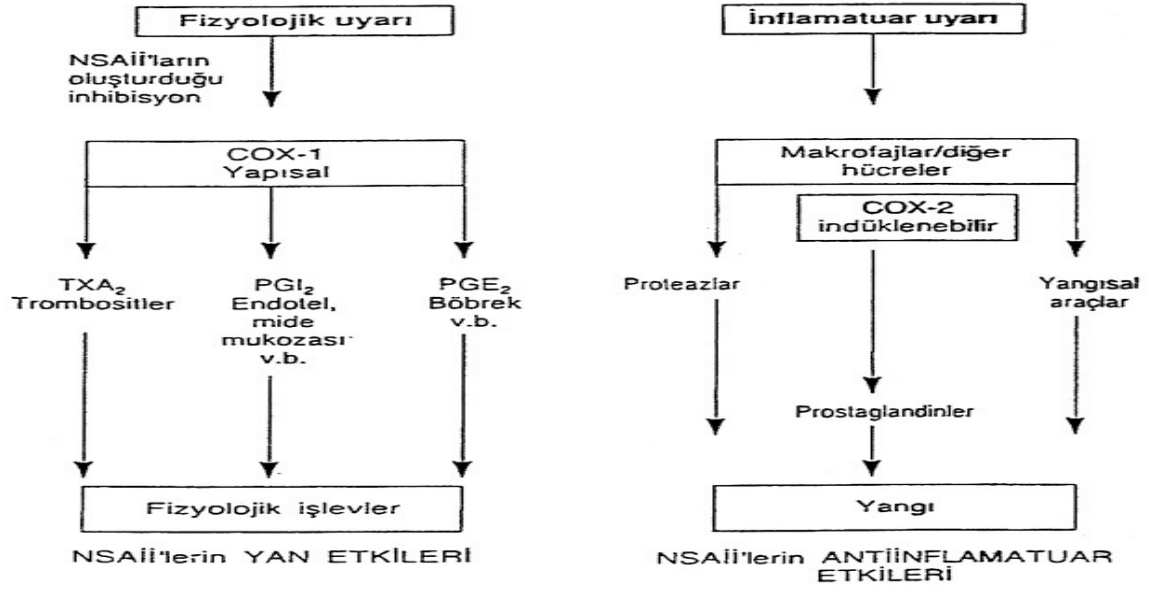
	COX-1	COX-2
*Dokusal lokalizasyon	*Trombositler, endotel hücreleri, mide, böbrek, prostat	* Prostat, akciğerler ve beyin, * aktive monosit ve fibroblastlar, * ovülasyon öncesi foliküller, * hormon, sitokin,büyüme faktörleri veya forbol esterleri ile stimülasyon sonrası
*Fizyolojik fonksiyonları	*Mide mukozası korunması, renal kan akımı regülasyonu, vasküler homeostazis, bronş ve uterus kontraksiyonları	*Yangısal olaylar

COX-1 = Yapısal izoform

Damar, gastro intestinal sistem (GİS), böbrek ve trombositlerde bulunur. GİS’te koruyucu etki oluşturur. Agregasyonlarda rol oynar.

COX-2= İndüklenebilir izoform

Akciğer, böbrek, beyinde bulunur. Çoğu antiinflamatuvar mediyatörler tarafından salınır.



Şekil 8 : Siklooksijenaz enzim tipleri

Non-opioidlerin pozolojisinin belirlenmesi, bunların minimal etkin ve minimal toksik dozlarının bilinmesini gerektirir.

Non-opioid analjeziklerin COX-2/COX-1 inhibisyon oranları (IC₅₀) (3, 4)

- Piroksikam 33-250
- Aspirin 166
- Sulindak 100
- İndometasin 30-60
- Diklofenak 0.7-2.2
- Naproksen 0.6
- Meloksikam 0.33
- Nimesulid 0.06
- Rofekoksib 0.03
- Selekoksib 0.003

Yukarıdan aşağıya inildikçe COX-2 selektiflik artışı görülmektedir.

1.4 İnflamasyon (16, 80)

İnflamasyon, fiziksel travma, tahriş edici kimyasal maddeler veya mikrobiyolojik ajanlar tarafından oluşturulan doku hasarına karşı gelişen normal bir savunma mekanizmasıdır. Başka bir deyişle inflamasyon, vücudun çeşitli doku

bölgelerinde lokalize olan ve spesifik olmayan bir yanıttır. İnflamasyon vücudun, enfeksiyona yol açan organizmaları inaktive etme veya parçalama iritanları uzaklaştırma ve doku onarımı koşullarını oluşturma çabasıdır. İyileşme sağlandıktan sonra genellikle inflamasyon yatıştır.

1.4.1 Anti-İnflamatuvar İlaçlar (16)

Başlıca 4 gruba ayrılır:

1. Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)
2. Narkotik olmayan analjezikler (asetaminofen, fenasetin)
3. Artrit ilaçları (klorokin, altın tuzları, metotreksat, D-penisilamin)
4. Gut ilaçları (allopurinol, kolşisin, probenesid, sülfipinazon)

1.4.1.1 Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

NSAİİ ağrı ve inflamasyonu azaltmak amacıyla yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Genellikle inflamasyon yerinde siklooksijenaz-2'yi inhibe ederek etki göstermektedirler. NSAİİ ilaçların oral kullanımı klinik olarak etkilidir. Fakat gastrointestinal mukozanın ülserasyon ve irritasyonu gibi bazı yan etkilerinden dolayı kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle oral yolun dezavantajlarından dolayı dermal olarak kullanılması da önerilebilir (7, 16, 44, 101).

1.4.1.1.1 NSAİİ'ların Etkileri (8, 10, 70, 82 , 106)

NSAİİ'ların etkileri aşağıda sıralanmıştır.

- Analjezik etki (Periferik ve Santral)
- Antiinflamatuvar etki
- Prostaglandin (Tromboksan ve LTB4) sentez inhibisyonu
- Lizozomal membran stabilizasyonu
- Oksijen radikallerinin oluşumunun engellenmesi ve yok edilmesinin artırılması
- Antipiretik etki
- Antitrombotik etki
- Ductus arteriosus kapanması
- Dismenore
- Tokolitik etki
- Kolorektal kanserden korunma
- Alzheimer oluşumunu engelleme

1.4.1.1.2 NSAİİ'ların Avantajları (52)

NSAİİ'ların avantajları aşağıda sıralanmıştır.

- Periferik nosiseptörlerin aktivasyonunu ve sentezini azaltırlar
- İnflamatuvar yanıtı azaltırlar
- Bağımlılık yapmazlar
- Opioidlerle sinerjizm gösterirler
- Bulantı ve kusmaya az neden olurlar
- Uzun etkilidirler
- Bazı ağrılarda opioidlere üstündüler
- Barsak ve mesane fonksiyonlarını etkilemezler
- Suistimal oranları düşüktür

1.4.1.1.3 NSAİİ'ların Sınıflandırılması ve Özellikleri (3, 4)

NSAİİ'lar 4 grupta sınıflandırılabilir (Tablo 4).

Grup 1 = Düşük potensli, kısa yarı ömürlü

Grup 2 = Yüksek potensli, kısa yarı ömürlü

Grup 3 = Orta potensli, orta yarı ömürlü

Grup 4 = Yüksek potensli, uzun yarı ömürlü

Tablo 4 : NSAİİ'ların grupları

Grup 1	Grup 2	Grup3	Grup4
Salisilik asid	Flurbiprofen	Diflunisal	Meloksikam
İbuprofen	Ketoprofen	Naproksen	Piroksikam
Mefenamik asid	Diklofenak	Nabumeton	Tenoksikam
	İndometasin		
	Ketorolak		

NSAİİ'lar grubundaki ajanların kimyasal yapıları birbirinden farklıdır. Aynı zamanda bu ilaçların antipiretik, analjezik ve antiinflamatuvar etkileri de birbirinden farklıdır. Bunları gruplara ayırırsak;

- 1- Salisilatlar
- 2- Propiyonik asit türevleri
- 3- İndolasetik asit türevleri
- 4- Oksikam türevleri
- 5- Fenamatlar
- 6- Fenilbutazon
- 7- Diğer ilaçlar

1.4.1.1.4.1 Propiyonik Asit Türevleri (16, 36, 82, 106)

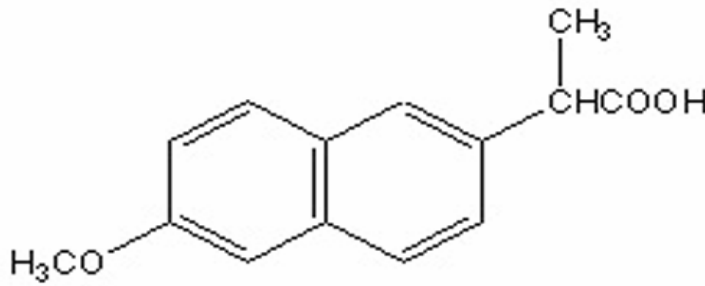
Bu grubun üyeleri; ibuprofen, naproksen, fenopropen, ketoprofen, flurbiprofen ve oksaprozin'dir. Bu ilaçların hepsi analjezik, antipiretik ve

antiinflamatuvar etkilidirler. Romatoid artrit ve osteoartritin kronik tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar, çünkü gastrointestinal etkileri genel olarak aspirinden daha zayıftır. Profenlerin moleküllerinde bir kiral merkez bulunduğu için ‘S’ ve ‘R’ enantiyomerleri vardır. Saf ‘S’ şeklinden oluşan naproksen hariç, profenler rasemat şeklinedirler. Bu ilaçlar siklooksijenazı geriye dönüşümlü olarak inhibe ettiklerinden aspirin gibi prostaglandinlerin sentezini engellerken lökotrienlere etki göstermezler. Oral yolla uygulandıktan sonra emilimleri iyidir. Emilen dozun hemen hemen tamamı serum proteinlerine bağlanır. Karaciğerde metabolize edilirler ve böbreklerden atılırlar. En sık görülen yan etkileri gastrointestinal sisteme ait, dispepsiden kanamaya kadar değişen olumsuz etkileridir.

1.5 Model Etkin Madde Naproksen (NP) Hakkında Genel Bilgiler

1.5.1 Naproksen’in Fiziksel Özellikleri (7, 12, 15, 82, 83, 84, 108, 109, 113, 124)

Naproksen beyaz, beyaza yakın renkte, hemen hemen kokusuz, kristalize bir tozdur. Pratik olarak suda çözünmez. Alkol (1’e 40 oranında), kloroform (1’e 15 oranında) ve etanolde (1’e 25 oranında) çözünür. pH 6 ‘dan daha yüksek değerlerde suda çözünebilir. Naproksenin kimyasal formülü Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9: Naproksenin kimyasal formülü

Kapalı formülü:	$C_{14}H_{14}O_3$
Kimyasal adları:	2-(6-metoksi-2-naftil)propiyonik asit 6-metoksi- α -metil-2-naftalin-asetik asit 2-naphalenasetik asit
Molekül ağırlığı:	230.26 g/mol
Erime noktası:	154-158 °C

1.5.2 Etki Mekanizması (4, 82, 84, 97, 102, 113)

Fenilpropiyonik asid türevleri içinde en uzun etkili olanıdır. Bu gruptaki diğer ilaçlar gibi analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etki gösterir. Naproksen antiinflamatuvar aktivitesini prostaglandin sentezini inhibe ederek gösterir. Prostaglandin sentezinden sorumlu siklooksijenaz enzimini inhibe eder. Lökositlerin inflamasyon alanına migrasyonunu belirgin şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Diğer yandan prostaglandinler ağrı reseptörlerinin duyarlılığını arttırlar (analjezik etki). Antipiretik etkisinin, hipotalamustaki santral aktivitesine bağlı periferik dilatasyon ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Bu mekanizma üzerinden derideki kan akımının artmasına ve vücudun ısı kaybetmesine neden olur.

1.5.3 Farmakokinetiği (82, 113)

NP oral, rektal ve topikal yoldan verilir. Oral yoldan verildiğinde gastrointestinal kanaldan absorbe olur. Naproksen rektal yoldan uygulandığında da gastrointestinal kanaldan çabuk ve tam olarak emilir. Ancak sağladığı doruk plazma konsantrasyonu, ağız yolu ile verilen aynı dozun sağladığı doruk konsantrasyonuna göre daha düşüktür. Jel formunda deriye topikal uygulandığında içerdiği aktif maddenin %30'u kolaylıkla absorbe olur. Esas olarak idrar yolu ile atılır.

1.5.4 Endikasyonları (82, 83, 97, 113, 125)

NP aşağıda belirtilen endikasyonlarda kullanılabilir.

- Hafif, orta şiddetteki ağrı
- Ankilozan spondilit
- Ateş
- Baş ağrısı
- Bursit
- Dismenore
- Gut artriti
- Juvenil tip romatoid artrit
- Migren ve migren profilaksisi
- Osteoartrit ve romatoid artrit
- Tendinit

1.5.5 Kontrendikasyonları (82, 113)

NP aşağıda verildiği durumlarda kontrendikedir.

- Alkolizm
- Anemi
- Astım
- Diş hastalığı
- Diyabet
- Gastrointestinal hastalık
- Gebelik
- Karaciğer hastalığı
- Hipertansiyon
- İntramusküler enjeksiyon
- Kalp yetmezliği
- Koagülopati
- Nazal polipler
- Peptik ülser
- Periferik ödem
- Böbrek hastalığı
- Salisilat aşırı duyarlılığı
- Sistemik lupus eritematosus
- Emzirme
- Ülseratif kolit
- Ürtiker

1.5.6 Yan etkileri (82, 113)

NP'nin yan etkileri aşağıda sıralandığı gibidir.

- Abdominal ağrı
- Aplastik anemi
- Azotemi
- Baş ağrısı ve baş dönmesi
- Bulantı, kusma
- Dispne
- Fotofobi
- Fotosensitive
- Gastrointestinal kanama
- Hematüri
- Hepatit
- Kalp yetmezliği
- Kanama
- Kaşıntı (pruritus)
- Konfüzyon
- Kabızlık
- Nefrotik sendrom
- Sersemlik hali
- Tinninus
- Trombosit disfonksiyonu
- Ürtiker

1.5.7 Maksimum doz sınırları (82, 113)

Yetişkinler, yaşlılar, adolesanlar: 1500 mg/gün peroral

Çocuklar: 1000 mg/gün peroral

Lokal etki amacıyla topikal olarak kullanılabilir ve deriden geçişi arttıran ajanların uygun olarak kullanılması ile daha iyi salım elde edilebilme imkanı vardır (36).

1.5.8 Naproksenin Ticari Preparatları (113)

1.5.8.1 Naproksenin Türkiye’de Kullanıldığı Müstahzarlar

1.5.8.1.1 Jel

- Mednap Jel %10 50 g tüp/kutu
- Naponal Jel %10 50 g tüp/kutu
- Naprodev Jel %10 50 g tüp/kutu
- Naprosyn Jel %10 50 g tüp/kutu

1.5.8.1.2 Supozituvar

- Naprosyn Supozituvar 500 mg 10 supozituvar/kutu

1.5.8.1.3 Tablet

- Bonmin Tablet 500 mg 20 tablet/kutu
- Mednap Tablet 250 mg 20 tablet/kutu
- Mednap Tablet 500 mg 20 tablet/kutu
- Naprodex Fort Tablet 500 mg 10 tablet/kutu
- Naprodex Fort Tablet 500 mg 20 tablet/kutu
- Naprosyn CR Film Kaplı Tablet 750 mg 10 tablet/kutu
- Naprosyn CR Film Kaplı Tablet 750 mg 30 tablet/kutu
- Naprosyn EC Fort Tablet 500 mg 20 tablet/kutu
- Naprosyn EC Tablet 250 mg 20 tablet/kutu

1.5.8.2 Naproksenin Dünyadaki Müstahzarları

NP’nin dünyadaki müstahzarları; Actiquim, Acusprain, Acxen, Akudol, Aleve, Alganil, Algioprux, Algonapril, Alidase, Aliviomas, Alpoxen, Alprofen, Alxen, Anaflin, Anaprox, Anapsyl, Anax, Annoxen, Antalgin, Aperdan, Apo-Napro-Na, Aponacin, Apra-Gel, Apranax, Compositum, Blocacid, Bonyl, Bumaflex N, Causalon Pro, Cefecon N, Chemists Own Period Pain Tablets, Daflofen, Daflofen-F, Daprox, Dartrox, Debril, Decosil, Deflamox, Denaxpren, Deucoval, Diferbest, Diparene, Dolnaxen, Doloatrixen, Dolormin mit Naproxen, Dolotandax, Dolxen, Donaprox, Dysmenalgit, Easy Dayz, Edem, Eurogesic Gel, Fabralgina, Fadalivio, Faraxen, Farxen, Febrax, Femex, Femme Free, Fibroxyn, Flanax, Flavoxen, Flaxendol, Flaxvan, Flexen, Flexin, Flogen, Floginax, Flogocefal, Flogogin, Floxalin, Flucol, Fuxen, Genalgen, Genoxen, Gerinap, Gesiprox, Gibinap, Gibixen, Grifed,

Gynestrel, Illagane, Inflanox, Inveoxel, Inza, Iqfasol, Kenaprox, Kensedal, Laraflex, Laser, Ledox, Leniartril, Lixogan, Lorexen, Lundiran, Madaprox, Malexin, Melgar, Mirinax, Momen, Momendol, Monarit, Movex, Nafasol, Naflapen, Nalgesin, Napflam, Napmel, Napratec, Napraben, Naprel, Naprex, Naprium, Naprius, Napro-Dorsch, Naprobene, Naprcet, Naprocoat, Naprodil, Naprodil Plus, Naprodol, Naprofidex, Naprogen, Naprogesic, Naprokes, Naprolag, Naprometin, Napromex, Napronax, Napronet, Naprontag, Naprontag Flex, Naprorex, Naproscrip, Naprosian, Naproso, Naprosyn, Naprosyne, Naproval, Naprovite, Naprox, Naproxi, Naprux, Napxen, Narocin, Narzen, Nasocan, Natrioxen, Navixen, Naxen, Naxil, Naxodol, Naxopaar, Naxopren, Naxyn, Nedoxal, Neo Eblimon, Neonaxil, Neorpan Plus, Neuralprona, Nitens, Nixal, Noflam, Noflam-N, Novadex, Novaxen, Novo-Naprox, Nu-Naprox, Numidan, Numide, Nuprafen, Nurolasts, Nycopren, Onexmol, Pactens, Papasine, Patxen, Pensodil, Piproxen, Point, Polet, Polyxen, Pranoxen, Pranoxen Continus, Praxedol, Praxenol, Prevacid, NapraPAC, Prexan, Primeral, Prodolor, Pronat, Pronax-P, Pronaxen, Pronaxil, Pronoxen, Propional, Prosaid, Proxalin Plus, Proxem, Proxen, Proxine, Raxenol, Reprost, Reucortil, Reuxen, Rheuflex, Rhodiaprox, Rimoxyn, Roche, Rofanten, Roxen, Roxyn, Salupran, Seladin, Sertrixen, Servinaprox, Servinaproksan, Sicadentol Plus, Sobronil, Soden, Sodixen, Somalgesic, Sonap, Soproxen, Soren, Sunprox, Synalgo, Synflex, Synogin, Tacron, Tandax, Tanizona, Taxenan, Ticoflex, Tipron, Traumox, Triox NF, Tundra, U-Proxyn, Unirelaxed, Valrox, Vantin, Velsay, Velsay-S Compuesto, Veradol, Vinsen, Viplus, Xenar, Xenobid, Xenopan, Xicane, Zynal' dır.

BÖLÜM II

DENEYSEL BÖLÜM

ÇALIŞMANIN GENEL PLANI

Çalışmaya başlarken amacımız giriş bölümünde de belirttiğimiz gibi, model etkin madde olarak seçilen naproksenin transdermal yolla kullanılabilen S/Y ve Y/S tipinde mikroemülsiyon formülasyonlarını hazırlamak, hazırlanan bu formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini belirlemek, in-vitro, ex-vivo olarak geçiş özelliklerini incelemek, ayrıca geliştirilen bu formülasyonların antiinflamatuvar ve analjezik etkilerini ticari preparat ile karşılaştırmaktır.

Bu amaçla ilk önce etkin maddenin çeşitli fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Bunun ardından formülasyon çalışmalarına başlanmıştır. Formülasyon çalışmaları sırasında geliştirdiğimiz mikroemülsiyon formülasyonları ve ideal YEM:YYEM oranlarını belirlemek için ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonlarında yağ fazı olarak izopropil miristat (İPM), YEM olarak Span 80, Cremophor EL, Labrafil M, Labrasol, YYEM olarak izopropil alkol (İPA) ve etanol ve su fazı olarak distile su veya 0.5N NaOH kullanıldı. Geliştirilen her bir formülasyon ve YEM:YYEM oranı için ayrı ayrı üçgen faz diyagramı çizildi ve optimum S/Y, Y/S mikroemülsiyon formülasyonları belirlendi. Bu formülasyonlara % 10 oranında NP yüklendi. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra bunların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve stabilite çalışmaları yapıldı.

Daha sonraki aşamada, tüm formülasyonların ve ticari preparatın yapay nitro selüloz membran ve selüloz membran kullanılarak in-vitro ortamda geçiş çalışmaları, ex-vivo ortamda geçiş çalışmaları ise, erkek sıçan karın derisi kullanılarak

yapılmıştır. Tüm formülasyonların geçiş profilleri matematiksel olarak değerlendirildikten sonra seçilen S/Y, Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarıyla, ticari preparatın analjezik ve anti-inflamatuvar etkileri sıçanlarda karşılaştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

İzopropil miristat	Sigma-Aldrich- Almanya
Labrafil M 1944 C	Gattefosse' - Fransa
Labrasol.....	Gattefosse' - Fransa
Span 80.....	Merck - Almanya
Cremofor EL.....	Sigma-Almanya
Etanol	Merck-Almanya
İzopropil alkol	Merck-Almanya
Sodyum hidroksit.....	Merck-Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat.....	Merck - Almanya
Asetonitril.....	Sigma-Aldrich- Almanya
Metanol	Merck-Almanya
Ortofosforik asit.....	Carlo Erba Reagenti - İtalya
Trietanolamin	Talkoteks Kimya San. - Türkiye
Naproxen.....	Deva Holding- Türkiye (hediye)
Karagenin	Sigma-Aldrich - Almanya
N-oktanol.....	Merck - Almanya

2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Manyetik karıştırıcı su banyosu	Variomag - Almanya
Hassas terazi	Sartorius Basic - Almanya
UV spektrofotometre	Schmadzu 160-A - Japonya
pH metre.....	Hanna Instruments HI 221 - Mauritius
Etüv	Nüve EN 400 - Türkiye
Buzdolabı	Arçelik - Türkiye
Su banyosu	Buchi 461 – Türkiye
Karıştırıcı.....	Yellow line - Almanya
Nitro selüloz membran.....	Sartorius - Almanya
Selüloz membran	Sigma Diagnostics - Amerika
Partikül boyutu ölçüm aleti	Malvern zeta sizer,Nano ZS - İngiltere
HPLC	HP Agilent 1100 Series - Almanya
Mikro enjektör	Hamilton - İsviçre
Ultrasonik banyo.....	Elma 660/H - Almanya
Viskozimetre.....	Brookfield - USA
Refraktometre	Atago RX-7000 CX- Japonya
IR spektrometre	Jasco FT/IR-400 - Japonya
Erime derecesi tayini aleti.....	Barnstead IA 9000 - USA
UV spektrometre.....	Schmadzu UV 1208 - Japonya
Elektrik iletkenlik ölçüm aleti	Jenway 4071 - İngiltere
Santrifüj aleti	Eppendorf 3414 - Almanya
Tail flick	MAY-TF 0703 - Türkiye
Hot plate	MAY-AHP 0603 - Türkiye
Pletismometre	Lettica, LE 7500 - İspanya

2.2 Yöntem ve Deneyler

2.2.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan NP'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1 NP'nin Infrared (IR) Analizi

NP % 1 oranında potasyum bromür ile karıştırarak, kuvarz havan içinde homojenize edildi. Çok ince şeffaf tabletleri basıldı. IR spektrofometrede 4000-0 cm^{-1} arasında taranıp pik verdiği dalga boyları tespit edildi.

2.2.1.2 NP'nin Ultraviyole (UV) Analizi

10 mg NP, 10 mL etanolde (% 96) çözündürüldükten sonra bu stok çözeltisinden Hamilton enjektörü ile 50 μL alınarak pH 7.4 fosfat tamponuyla 10 mL ye tamamlanıp 200-400 nm dalga boyları arasında taramalı UV spektrofotometrede maksimum absorbands verdiği dalga boyu saptandı.

2.2.1.3 NP'nin Ergime Noktası Tayini

NP'nin ergime noktası tayini için bir miktar madde bir ucu kapalı kılcal boruya dolduruldu ve kılcal borunun diğer ucu alevle kapatıldı. Daha sonra kılcal boru erime derecesi apareyine yerleştirildi ve sıcaklık artışı ile etkin maddenin eridiği an tespit edildi.

2.2.1.4 NP'nin Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayini

NP'nin lipid/su partisyon katsayısı tayini amacıyla, n-Oktanöl fazı distile su ile deneyden 24 saat önce doyuruldu. Distile su ile NP'nin 0.0004 Molarlık çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltinin başlangıhtaki NP konsantrasyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edildi. Bu solüsyonun 2 mL'si 10 mL'lik tüpe alınarak üzerine 2 ml organik faz eklendi. Tüplerin ağzı kapatılarak 24 saat oda sıcaklığında çalkalandı. 15 dakika 3500 U/dk sentrifirüj edildikten sonra, su fazındaki NP konsantrasyonu HPLC ile tayin edildi. N-oktanöldeki NP konsantrasyonu (yağda çözünen ilaç), su fazındaki başlangıç ve son konsantrasyon arasındaki fark

hesaplanarak bulundu. NP'nin lipid/su partisyon katsayısı Eşitlik 10 ile hesaplandı. 6 paralel numune ile çalışılarak NP'nin lipid/su partisyon katsayısı hesaplandı (87).

$P = (\text{Yağda çözünen ilaç}) / (\text{suda çözünen ilaç}) \dots\dots\dots \text{Eşitlik 10}$

2.2.2 NP'nin UV ile Miktar Tayini İçin Standart Eğrisi Çizimi

NP'nin kalibrasyon eğrisi pH 7.4 fosfat tamponunda çizildi. pH 7.4 fosfat tamponu hazırlamak için 27.38 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tartılıp 1L'ye distile su ile tamamlandı. 8 g sodyum hidroksit (NaOH) tartılıp 1L'ye distile su ile tamamlandı. Birinci çözeltiden 250 mL, ikinci çözeltiden 195.5 mL alıp karıştırıp 1L'ye distile su ile tamamlandı (110).

Standart eğrinin çizimi için 50 mg NP 3 mL alkolde çözündürüldü, tamponla 10 mL'ye tamamlandı. Stok çözeltiden 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.045, 0.05, 0.055, 0.06, 0.065 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde bir seri çözelti hazırlandı. Aynı şartlarda hazırlanan kör kullanılarak, UV spektrofotometrede 263 nm'de bu konsantrasyonlara karşı gelen absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değerleri derişime karşı grafiğe konularak, en küçük kareler yöntemi ile regresyon analizine uygulandı. Buradan absorbans (x) ile derişim (y) arasındaki ilişkiyi veren kalibrasyon eğrileri oluşturuldu.

2.2.2.1 Analitik Yöntem Validasyonu (104)

2.2.2.1.1 Doğrusallık

NP'nin pH 7.4 fosfat tamponunda 50 mg / 10 mL stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.045, 0.05, 0.055, 0.06, 0.065 mg/mL konsantrasyonunda üç paralel çözelti hazırlandı. Her bir konsantrasyon basamağında elde edilen UV absorbans değerleri yardımıyla standart doğrunun denklemi hesaplandı. r^2 , eğim ve kesim noktaları hesaplandı.

2.2.2.1.2 Kesinlik

2.2.2.1.2.1 Tekrarlanabilirlik

Kesinlik kriteri için çalışma şartlarında analizlerde elde edilen sonuçların birbirleri ile uyumunu ve kullanılan alette okunan değerlerin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla 0.05 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan örneğin verdiği absorbans değerleri ardarda on kere okundu. Absorbansa karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması, varyasyon katsayısı ve % RSD'si (yüzde geri kazanım ortalaması) hesaplandı.

Varyasyon katsayısının % 2'den az olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

2.2.2.1.2.2 Tekrar Elde Edilebilirlik

Kesinlik kriterinin diğer bir kavramı olan tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareket edilerek seyreltme ile hazırlanan altı adet aynı konsantrasyonunda (0.05 mg/mL) ve birbirinden bağımsız çözeltinin absorbans değerleri uygun dalga boyunda ölçülerek ve bulunan değerler kalibrasyon denkleminde yerine konularak ortalama, standart sapma, % RSD'si ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Bulunan varyasyon katsayısının % 2'den küçük olması gerekir.

2.2.2.1.3 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Elde edilen deneysel değerlerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır.

Üç farklı konsantrasyonda (0.02, 0.04, 0.06 mg/mL) altı paralel örneğin verdiği absorbans değerleri ölçüldü. Bu absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon miktarları bulundu. Bu değerlerden ortalama ve yüzde geri kazanım hesaplandı.

2.2.2.1.4 Seçicilik

Formülasyonda yer alan diğer maddelerle hazırlanan plasebo test çözeltisi analiz edildi. Etkin maddenin aynı dalga boyunda maksimum absorbans gösterip göstermediği incelendi.

Elde edilen sonuçlar uygulanan metodun seçiciliğini göstermektedir.

2.2.2.1.5 Günler Arası Geçerlilik

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinin günler arası geçerliliğinin test edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çalışma günü kalibrasyon eğrisinin düşük (0.02 mg/mL), orta (0.04 mg/mL) ve yüksek (0.06 mg/mL) derişimlerine karşılık gelecek şekilde hazırlanan çözeltilerin spektrofotometrede uygun dalga boyunda çözücüye karşı okunması ile elde edilen absorpsiyon değerinin aynı gün kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak gerçek değerle karşılaştırması yapıldı.

2.2.2.1.6 Stabilit  (Kararlılık)

Belirli bir konsantrasyonda (0.01 mg/mL) çözelti hazırlanıp bu çözeltinin oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) , 5 ± 3 °C (buz dolabında) ve -20 ± 5 °C (derin dondurucuda) bekletilerek kararlılık çalışmaları yapıldı. Bu amaçla hazırlanan çözeltilerin belirli zaman dilimlerinde spektrofotometrede ölçümleri yapılarak etkin madde miktarında azalma ya da bozulma olup olmadığı tespit edildi.

Derin dondurucuda bekletilen örneklerin stabilitesi için hazırlanan test çözeltileri ölçüm yapılacağı zaman dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığında bekletilerek, spektrofotometrede okunup tekrar derin dondurucuya konarak etkin maddede bozunma olup olmadığı test edildi.

2.2.3 Formülasyon Çalışmaları

2.2.3.1 Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmaları

2.2.3.1.1 Formülasyonda Kullanılacak Maddelerin Seçimi

Formülasyon çalışmaları sırasında değişik YEM ve YYEM'ler kullanıldı. Mikroemülsiyon formülasyonlarında yağ fazı olarak İzopropil miristat (İPM); YEM olarak; Labrafil M 1944, Labrasol, Span 80, Cremophor EL (Cr EL), YYEM olarak etanol ve izopropil alkol (İPA); su fazı olarak distile su veya 0.5N NaOH çözeltisi kullanıldı.

2.2.3.1.2 Mikroemülsiyon Formülasyonlarını Belirlemek için Yapılan Çalışmalar

Formülasyon geliştirme çalışmaları sırasında, YEM'lerle, YYEM'ler belli oranda karıştırıldı. YEM:YYEM (a/a) oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 oranında çalışıldı. Yağ, YEM ve YYEM karışımı bir beher içerisinde manyetik karıştırıcıda 150 devir/dk dönme hızıyla karıştırılırken, formülasyonlar bulanma noktalarına kadar su veya 0.5 N NaOH çözeltisi ile titre edildi ve bulanma noktaları tespit edildi. Tüm formülasyon çalışmaları 25 ± 2 °C oda sıcaklığında yapıldı. Denenen formülasyonlar Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 5 : YEM olarak Labrafil M ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		İPM	Labrafil M - Labrasol/Etanol	Distile Su	
F1	1:5	2	8	0.00 – 0.36	26.41
		3	7	0.00 – 0.40	
		4	6	0.00 – 0.50	
		5	5	0.00 – 0.46	
		6	4	0.00 – 0.40	
		7	3	0.00 – 0.38	
		8	2	0.00 – 0.36	
F2	1:6	2	8	0.00 – 0.40	18.50
		3	7	0.00 – 0.42	
		4	6	0.00 – 0.40	
		5	5	0.00 – 0.42	
		6	4	0.00 – 0.38	
		7	3	0.00 – 0.50	
		8	2	0.00 – 0.40	
F3	1:7	2	8	0.00 – 0.48	27.52
		3	7	0.00 – 0.54	
		4	6	0.00 – 0.50	
		5	5	0.00 – 0.56	
		6	4	0.00 – 0.46	
		7	3	0.00 – 0.58	
		8	2	0.00 – 0.50	
F4	1:8	2	8	0.00 – 0.50	18.19
		3	7	0.00 – 0.48	
		4	6	0.00 – 0.40	
		5	5	0.00 – 0.40	
		6	4	0.00 – 0.41	
		7	3	0.00 – 0.46	
		8	2	0.00 – 0.48	
En yüksek mikroemülsiyon alanını veren YEM/YYEM oranı 1:7 olduğu için bu oranın ara değerleri de kullanılarak yeni bir mikroemülsiyon formülasyon çalışması yapıldı.					
F3-1	1:7	1	9	0.00 – 0.14	198.97
		1.5	8.5	0.00 – 0.42	
		2	8	0.00 – 0.48	
		2.5	7.5	0.00 – 0.52	
		3	7	0.00 – 0.54	
		3.5	6.5	0.00 – 0.52	
		4	6	0.00 – 0.50	
		5	5	0.00 – 0.56	
		6	4	0.00 – 0.46	
		7	3	0.00 – 0.58	
		8	2	0.00 – 0.50	

F1-F4 için HLB = 5.66, Labrafil M / Labrasol = 5:1

Tablo 6: YEM olarak Cremophor EL ve Span 80, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		IPM	Cre EL-Span 80 / Etanol	Distile Su	
F5	1:6	2	8	0.00 – 0.80	84.91
		3	7	0.00 – 0.70	
		4	6	0.00 – 0.54	
		5	5	0.00 – 0.46	
		6	4	0.00 – 0.30	
		7	3	0.00 – 0.32	
		8	2	0.00 – 0.40	
F6	1:7	2	8	0.00 – 0.80	117.11
		3	7	0.00 – 0.70	
		4	6	0.00 – 0.56	
		5	5	0.00 – 0.42	
		6	4	0.00 – 0.32	
		7	3	0.00 – 0.22	
		8	2	0.00 – 0.20	
F7	1:8	2	8	0.00 – 0.70	84.63
		3	7	0.00 – 0.62	
		4	6	0.00 – 0.56	
		5	5	0.00 – 0.40	
		6	4	0.00 – 0.32	
		7	3	0.00 – 0.28	
		8	2	0.00 – 0.26	
En yüksek mikroemülsiyon alanını veren YEM/YYEM oranı 1:7 olduğu için bu oranın ara değerleri de kullanılarak yeni bir mikroemülsiyon formülasyon çalışması yapıldı.					
F6-1	1:7	1	9	0.00 – 0.60	160.73
		1.5	8.5	0.00 – 0.70	
		2	8	0.00 – 0.80	
		2.5	7.5	0.00 – 0.76	
		3	7	0.00 – 0.70	
		3.5	6.5	0.00 – 0.62	
		4	6	0.00 – 0.56	
		4.5	5.5	0.00 – 0.50	
		5	5	0.00 – 0.42	
		6	4	0.00 – 0.32	
		7	3	0.00 – 0.22	
		8	2	0.00 – 0.20	

F5 – F7 için HLB = 6.64, Cremophor EL / Span 80 = 2:5

Tablo 7: YEM olarak Cremophor EL ve Labrafil M, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		İPM	Cre EL-Labrafil M/Etanol	Distile Su	
F8	1:7	2	8	0.00 – 0.50	100.71
		3	7	0.00 – 0.54	
		4	6	0.00 – 0.50	
		5	5	0.00 – 0.40	
		6	4	0.00 – 0.38	
		7	3	0.00 – 0.20	
		8	2	0.00 – 0.18	
F9	1:8	2	8	0.00 – 0.58	72.52
		3	7	0.00 – 0.62	
		4	6	0.00 – 0.56	
		5	5	0.00 – 0.48	
		6	4	0.00 – 0.40	
		7	3	0.00 – 0.36	
		8	2	0.00 – 0.32	
F10	1:9	2	8	0.00 – 0.60	108.75
		3	7	0.00 – 0.62	
		4	6	0.00 – 0.54	
		5	5	0.00 – 0.44	
		6	4	0.00 – 0.30	
		7	3	0.00 – 0.24	
		8	2	0.00 – 0.20	
En yüksek mikroemülsiyon alanını veren YEM/YYEM oranı 1:9 olduğu için bu oranın ara değerleri de kullanılarak yeni bir mikroemülsiyon formülasyon çalışması yapıldı.					
F10-1	1:9	1	9	0.00 – 0.46	112.37
		1.5	8.5	0.00 – 0.58	
		2	8	0.00 – 0.60	
		2.5	7.5	0.00 – 0.60	
		3	7	0.00 – 0.62	
		3.5	6.5	0.00 – 0.62	
		4	6	0.00 – 0.54	
		4.5	5.5	0.00 – 0.50	
		5	5	0.00 – 0.44	
		5.5	4.5	0.00 – 0.38	
		6	4	0.00 – 0.30	
		7	3	0.00 – 0.24	
		8	2	0.00 – 0.20	

F8 – F10 için HLB = 6.833, Cremophor EL / Labrafil M = 1:2

Tablo 8: YEM olarak Span 80 ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		İPM	Span 80-Labrasol / Etanol	Distile Su	
F11	1:7	2	8	0.00 – 0.74	117.74
		3	7	0.00 – 0.68	
		4	6	0.00 – 0.62	
		5	5	0.00 – 0.52	
		6	4	0.00 – 0.48	
		7	3	0.00 – 0.30	
		8	2	0.00 – 0.26	
F12	1:8	2	8	0.00 – 0.74	165.29
		3	7	0.00 – 0.70	
		4	6	0.00 – 0.66	
		5	5	0.00 – 0.62	
		6	4	0.00 – 0.48	
		7	3	0.00 – 0.42	
		8	2	0.00 – 0.20	
F13	1:9	2	8	0.00 – 0.70	100.39
		3	7	0.00 – 0.72	
		4	6	0.00 – 0.66	
		5	5	0.00 – 0.62	
		6	4	0.00 – 0.50	
		7	3	0.00 – 0.36	
		8	2	0.00 – 0.34	
En yüksek mikroemülsiyon alanını veren YEM/YYEM oranı 1:8 olduğu için bu oranın ara değerleri de kullanılarak yeni bir mikroemülsiyon formülasyon çalışması yapıldı.					
F12-1	1:8	1	9	0.00 – 0.78	207.72
		1.5	8.5	0.00 – 0.72	
		2	8	0.00 – 0.74	
		2.5	7.5	0.00 – 0.72	
		3	7	0.00 – 0.7	
		3.5	6.5	0.00 – 0.68	
		4	6	0.00 – 0.66	
		4.5	5.5	0.00 – 0.64	
		5	5	0.00 – 0.62	
		5.5	4.5	0.00 – 0.48	
		6	4	0.00 – 0.48	
		7	3	0.00 – 0.42	
		8	2	0.00 – 0.20	

F11 – F13 için HLB = 5.916, Span 80 / Labrasol = 5:1

Tablo 9: YEM olarak Labrafil M ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan değeri
		IPM	Labrafil M + Labrasol / Etanol	0.5N NaOH Çözeltisi	
F14	1:6	1	9	0.00 – 0.66	129.50
		2	8	0.00 – 0.82	
		3	7	0.00 – 0.80	
		4	6	0.00 – 0.78	
		5	5	0.00 – 70	
		6	4	0.00 – 0.62	
		7	3	0.00 – 058	
		8	2	0.00 – 0.44	
F15	1:7	1	9	0.00 – 0.80	156.27
		2	8	0.00 – 0.86	
		3	7	0.00 – 0.84	
		4	6	0.00 – 0.78	
		5	5	0.00 – 0.66	
		6	4	0.00 – 0.50	
		7	3	0.00 – 0.42	
		8	2	0.00 – 0.36	
F16	1:8	1	9	0.00 – 0.64	119.53
		2	8	0.00 – 0.82	
		3	7	0.00 – 0.80	
		4	6	0.00 – 0.76	
		5	5	0.00 – 0.64	
		6	4	0.00 – 0.52	
		7	3	0.00 – 0.50	
		8	2	0.00 – 0.42	

F14 – F16 için HLB = 5.66, Labrafil M / Labrasol = 5:1

Tablo 10: YEM olarak Cremophor EL ve Span 80, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan değerleri
		IPM	Cre EL-Span 80 / Etanol	0.5N NaOH Çözeltisi	
F17	1:6	1	9	0.00 – 0.90	130.85
		2	8	0.00 – 1.20	
		3	7	0.00 – 1.08	
		4	6	0.00 – 0.90	
		5	5	0.00 – 0.70	
		6	4	0.00 – 0.64	
		7	3	0.00 – 0.56	
F18	1:7	1	9	0.00 – 0.96	144.66
		2	8	0.00 – 1.18	
		3	7	0.00 – 1.16	
		4	6	0.00 – 0.90	
		5	5	0.00 – 0.72	
		6	4	0.00 – 0.62	
		7	3	0.00 – 0.54	
F19	1:8	1	9	0.00 – 1.00	148.66
		2	8	0.00 – 1.16	
		3	7	0.00 – 1.12	
		4	6	0.00 – 0.92	
		5	5	0.00 – 0.72	
		6	4	0.00 – 0.58	
		7	3	0.00 – 0.52	
F20	1:9	1	9	0.00 – 0.98	136.32
		2	8	0.00 – 1.14	
		3	7	0.00 – 1.06	
		4	6	0.00 – 0.98	
		5	5	0.00 – 0.76	
		6	4	0.00 – 0.62	
		7	3	0.00 – 0.56	

F17 – F20 için HLB = 6.64, Cremophor EL / Span 80 = 2:5

Tablo 11: YEM olarak Cremophor EL ve Labrafil M, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan değerleri
		İPM	Cre EL-Labrafil M / Etanol	0.5N NaOH Çözeltisi	
F21	1:6	1	9	0.00 – 0.70	98.01
		2	8	0.00 – 0.80	
		3	7	0.00 – 0.90	
		4	6	0.00 – 0.80	
		5	5	0.00 – 0.64	
		6	4	0.00 – 0.62	
		7	3	0.00 – 0.50	
F22	1:7	1	9	0.00 – 0.78	117.21
		2	8	0.00 – 0.90	
		3	7	0.00 – 0.98	
		4	6	0.00 – 0.90	
		5	5	0.00 – 0.70	
		6	4	0.00 – 0.64	
		7	3	0.00 – 0.52	
F23	1:8	1	9	0.00 – 0.80	109.85
		2	8	0.00 – 1.00	
		3	7	0.00 – 0.98	
		4	6	0.00 – 0.84	
		5	5	0.00 – 0.76	
		6	4	0.00 – 0.62	
		7	3	0.00 – 0.60	

F21 – F23 için HLB = 6.833, Cremophor EL / Labrafil M = 1:2

Tablo 12: YEM olarak Span 80 ve Labrasol, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan değerleri
		İPM	Span 80-Labrasol / Etanol	0.5 N NaOH Çözeltisi	
F24	1:6	1	9	0.00 – 1.10	143.20
		2	8	0.00 – 1.08	
		3	7	0.00 – 1.10	
		4	6	0.00 – 0.90	
		5	5	0.00 – 0.80	
		6	4	0.00 – 0.60	
		7	3	0.00 – 0.54	
F25	1:7	1	9	0.00 – 1.18	147.15
		2	8	0.00 – 1.20	
		3	7	0.00 – 1.16	
		4	6	0.00 – 0.88	
		5	5	0.00 – 0.72	
		6	4	0.00 – 0.56	
		7	3	0.00 – 0.54	
F26	1:8	1	9	0.00 – 0.82	142.96
		2	8	0.00 – 1.20	
		3	7	0.00 – 1.08	
		4	6	0.00 – 0.80	
		5	5	0.00 – 0.70	
		6	4	0.00 – 0.60	
		7	3	0.00 – 0.50	

F24 – F26 için HLB = 5.916, Span 80 / Labrasol = 5:1

Tablo 13: YEM olarak Cremophor EL ve Labrafil M, YYEM olarak etanol, yağ olarak İPM ve 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, mikroemülsiyon alan değerleri ve HLB değeri

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan değeri
		İPM	Cre EL-Labrafil M / İPA	0.5 N NaOH Çözeltisi	
F27	1:1	0.5	9.5	0.00 – 2.10	144.69
		1	9	0.00 – 1.50	
		1.5	8.5	0.00 – 1.30	
		2	8	0.00 – 1.20	
		2.5	7.5	0.00 – 1.10	
		3	7	0.00 – 1.00	
F28	1:2	0.5	9.5	0.00 – 7.80	141.58
		1	9	0.00 – 2.30	
		1.5	8.5	0.00 – 1.70	
		2	8	0.00 – 1.58	
		2.5	7.5	0.00 – 1.40	
		3	7	0.00 – 1.05	
F29	1:3	0.5	9.5	0.00 – 19.30	203.98
		1	9	0.00 – 5.40	
		1.5	8.5	0.00 – 4.20	
		2	8	0.00 – 2.70	
		2.5	7.5	0.00 – 2.30	
		3	7	0.00 – 1.96	
F30	1:4	1	9	0.00 – 12.6	119.94
		2	8	0.00 – 3.30	
		3	7	0.00 – 3.10	
		4	6	0.00 – 2.50	
		5	5	0.00 – 2.11	
		6	4	0.00 – 2.10	

F27 – F30 için HLB = 10.375, Cremophor EL / Labrafil M = 3:1

2.2.3.1.3 Üçgen Faz Diyagramının Çizimi

Formülasyon çalışması sırasında elde edilen veriler kullanılarak, bölümümüzde geliştirilen bir bilgisayar programı (41) yardımıyla her bir

YEM/YYEM oranı için üçgen faz diyagramları çizildi ve en yüksek mikroemülsiyon alanını (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13) veren YEM/YYEM oranı ideal olarak kabul edildi. Faz diyagramında belirlenen mikroemülsiyon oluşum bölgesinin ağırlık merkezi kullanılarak optimum mikroemülsiyon formülasyonları hesaplanarak geliştirildi.

2.2.3.1.4 NP ile Formülasyon Çalışmaları

Üçgen faz diyagramından en büyük alanı veren ve alanın ağırlık merkezinden hesaplanan optimum formülasyonlar belirlendikten sonra, % 10 oranında NP bu formülasyonlara eklendi. Toz haldeki NP mikroemülsiyonun tamamında çözülerek formülasyonlar oluşturuldu. Etkin maddenin mikroemülsiyonda çözünmesini sağlamak amacıyla (berrak bir sistem elde edilene kadar) manyetik karıştırıcı ile 150 rpm'de etkin madde tamamen çözünene dek karıştırıldı. Hazırlanan formülasyonlardaki NP miktar tayini spektrofotometrik olarak tayin edildi.

2.2.3.1.4.1 0.5 N NaOH çözeltisinin hazırlanması

2 g katı NaOH tartılıp 100 mL distile suda çözündürülerek 0.5 N sodyum hidroksit çözeltisi hazırlandı.

2.2.4 İn-vitro Geçiş Çalışmaları

NP içeren mikroemülsiyon formülasyonları ve ticari preparat kullanılarak, NP'nin sentetik membrandan geçiş (permeasyon) çalışması difüzyon hücresi kullanılarak yapıldı. Sentetik membran olarak 0.45 µm por genişliği olan nitro selüloz membran ve selüloz membran kullanıldı.

Bu çalışmada donör ve reseptör kompartıman olmak üzere iki kısımdan oluşan difüzyon hücresi kullanıldı. Membranlar çalışmaya başlamadan yarım saat önce reseptör faz ile temasta bırakıldı. Membranlar (1.3 cm²) gergin olarak donör ve reseptör kompartımanlar arasına yerleştirildi. Reseptör faz olarak, nitro selüloz

membranda 15 mL, selüloz membranda ise 10 mL pH 7.4 fosfat tamponu kullanıldı. Donör faz olarak nitro selüloz membranda 150 mg % 10 oranında NP içeren mikroemülsiyon formülasyonu veya ticari preparat, selüloz membranda ise 500 mg % 10 oranında NP içeren mikroemülsiyon formülasyonu veya ticari preparat kullanıldı. Difüzyon hücresi buharlaşmayı minimuma indirmek için parafilm ile kapatıldı. Sistem 37 ± 1 °C de manyetik karıştırıcılı su banyosuna yerleştirildi. Reseptör faz deney süresi boyunca manyetik bar ile 600 devir/dk'da karıştırıldı. Membrandan geçiş çalışması nitro selüloz membranda sekiz saat, selüloz membranda ise, yirmi dört saat boyunca devam ettirildi. Saat başı alınan örneklerden etkin madde konsantrasyonu 263 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edildi. Spektrofotometrede okunan absorbanslar, kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konularak, mikroemülsiyonlardan difüze olan etkin madde miktarı saptandı. Membranlardan geçiş çalışmaları sırasında üç paralel numune kullanıldı.

2.2.5 Ex-vivo Geçiş Çalışmaları

2.2.5.1 HPLC ile Standart Eğri Çizimi

UV dedektörlü HPLC sistemi ve ACE C18 kolon kullanıldı. Mobil faz olarak, 0.2 µm çapında membrandan filtre edilmiş ve degaze edilmiş bidistile su, asetronitril ve metanol karışımı (52 / 28 / 20) ve 0.4 mL trietanolamin kullanıldı ve ortofosforik asit (1-2 damla) ile pH 3.2'ye ayarlandı (125). Mobil faz ultrasonik banyoda degaze edildi ve sonra sisteme verildi. Salım hızı 1.5 mL/dakika, enjeksiyon miktarı 20 µL ve UV dedektörü 270 nm'ye ayarlandı (22, 83, 111, 115). Standart eğrinin çizimi için 50 mg NP 3mL etanolde (% 96) çözündürüldü, mobil fazla 10 mL'ye tamamlandı ve böylece stok çözeltisi hazırlandı. Bu stoktan 2.5, 10, 25, 50, 65, 75, 85, 100 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde örnekler mobil fazla tamamlanarak hazırlandı. Her bir örnek için üç paralel numune ile çalışıldı. Her enjeksiyondan sonra bulunan alan

değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Doğrunun denklemi ve r^2 değeri hesaplandı.

2.2.5.2 HPLC Yöntem Validasyonu (18, 40, 42, 61, 66, 84, 89, 96, 100, 124)

2.2.5.2.1 Doğrusallık

Doğrusallık kriteri bir formülasyondaki etkin maddenin belli sınırlar içindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun bir göstergesidir. Başka bir deyişle doğrusallık, o maddeye özgü düşük ve yüksek derişim aralıklarını kapsayan bir metoddur.

NP'nin mobil fazda 50 mg / 10 mL stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerinden farklı oranlarda seyreltme yapılarak, 8 farklı konsantrasyonda (2.5, 10, 25, 50, 65, 75, 85, 100 µg/mL) çözelti elde edildi. Bu çözeltilerden elde edilen her konsantrasyon ve karşılık gelen alan değerleri yardımıyla standart doğrunun denklemi bulundu.

2.2.5.2.2 Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecelerinin bir ölçüsüdür.

Analitik yöntemin kesinliği için istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda aynı konsantrasyondaki (25 µg/mL) örnek ardarda altı kez ölçülerek ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

2.2.5.2.2.1 Tekrar Edilebilirlik (Enjeksiyon Tekrarı)

Kalibrasyon doğru denklemi oluşturmak için hazırlanan stok çözeltisinden bir konsantrasyon (25 µg/mL) seçildi ve bu konsantrasyondaki çözelti HPLC'ye altı kez ardarda enjekte edildi. Alan değerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Varyasyon katsayısının % 2'den az olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

2.2.5.2.2 Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle hazırlanan altı adet aynı konsantrasyondaki (25 µg/mL) çözeltinin alan değerleri ölçülerek ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Bulunan varyasyon katsayısının % 2'den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

2.2.5.2.3 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Elde edilen deneysel değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu tespit etmek amacıyla yapılır. Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır.

Üç farklı konsantrasyonda (10, 50, 100 µg/mL) üç paralel örneğin verdiği alan değerleri ölçüldü. Bu alan değerlerine karşılık gelen konsantrasyon miktarları bulundu. Bu değerden yüzde geri kazanım hesaplandı.

2.2.5.2.4 Özgünlük, Seçicilik

Salım sonucunda bulunan alan değerlerinin etkin maddeye ait olduğunu kanıtlamak için boş formülasyon ile salım çalışması yapılarak alanların çakışıp çakışmadığı kontrol edildi.

2.2.5.2.5 LOD ve LOQ

LOD (limit of detection) (miktar tayini sınırı), analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikle tayin edilebileceği en düşük konsantrasyondur. Signal/noise oranı genellikle 3:1 oranında kullanılmaktadır.

LOQ (limit of quantitation) (saptama sınırı), analizi yapılan maddenin saptanabileceği en düşük konsantrasyondur.

LOD ve LOQ çalışmalarında 10 örnekle çalışılmıştır.

2.2.5.3. Mikroemülsiyon Formülasyonlarından ve Ticari Preparattan Ex-vivo Geçiş Çalışmaları

Doğal membrandan geçiş çalışmaları % 10 konsantrasyonda NP içeren mikroemülsiyon formülasyonları ile yapıldı. Geçiş çalışmalarında difüzyon hücresi kullanıldı. Doğal membran olarak 200- 300 g ağırlığında Wistar Albino erkek cinsi sıçanların karın bölgesi derisinden elde edilen deriler kullanıldı (Yapılan işlemler için 10.04.2008 tarihli ve 2008/3-1 karar nolu etik kurul izni E.Ü. Ecz. Fak.'den alınmıştır). Bu derileri elde etmek amacıyla sıçanlar karbondioksit gazına maruz bırakılarak öldürüldü. Jiletle sıçanın karın bölgesi tıraş edildikten sonra karın derisi kesilerek çıkartıldı. Deriler kullanım anına kadar – 80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi. Kullanılacağı gün derin dondurucudan çıkartılan deriler ex-vivo denemelerde kullanılmadan önce yarım saat reseptör fazda bekletildi (26, 87). Reseptör faz olarak 10 mL pH 7.4 fosfat tamponu kullanıldı. Donör faz olarak, 500 mg mikroemülsiyon formülasyonları veya ticari preparat kullanıldı. Difüzyon hücreleri buharlaşmayı minimuma indirmek için parafilm ile kapatıldı. Hücreler manyetik karıştırıcılı su banyosuna yerleştirildi (37 ±1 °C). Reseptör faz 600 rpm'de 24 saat boyunca karıştırıldı. İlk 12 saat yarım saate bir, sonraki saatlerde her saat başı örnek 24 saat süreyle reseptör fazdan alındı ve her örnek alımından sonra, yerine yeni reseptör faz koyularak geçiş çalışmasına devam edildi. Alınan örneklerden 1 mL alınıp 10 mL'ye mobil faz ile tamamlandı ve numuneler 0.2 µm'lik membrandan filtre edildi. 20 µL numune HPLC sistemine enjekte edildi. Derilerden geçiş hızı çalışmaları üç paralel numune alınarak çalışıldı. Böylece örnek piki ile formülasyondan gelen piklerin çakışıp çakışmadığı kontrol edildi. Bulunan alan değerleri kalibrasyon eğrisinde yerine konularak karşılık gelen konsantrasyonlar bulundu.

2.2.6 NP'nin Sentetik ve Doğal Membrandan Geçiş Sonuçlarının Matematiksel Olarak Değerlendirilmesi

İn-vitro ve ex-vivo geçiş çalışmalarının sonucunda, NP'nin membrandan akış hızı, difüzyon katsayısı, geçirgenlik katsayısı, gecikme zamanı Eşitlik 11, 12 ve 13 kullanılarak hesaplandı (18, 38, 47, 50, 73, 126).

$$J = K_p \times \Delta C_s \dots\dots\dots \text{Eşitlik 11}$$

$$T_{lag} = L^2 / 6D \dots\dots\dots \text{Eşitlik 12}$$

$$K_p = D \times P / L \dots\dots\dots \text{Eşitlik 13}$$

J: Derinin birim alanından geçen etkin maddenin miktarı (mg / cm² / sn)

K_p: Geçirgenlik katsayısı (cm/sn)

ΔC_s: İki hücre arasındaki ilaç konsantrasyonu farkı (mg/cm³)

P: Etkin maddenin deri/sıvı dağılım katsayısı

D: Etkin maddenin difüzyon katsayısı (cm²/sn)

T_{lag} (n lag) (gecikme zamanı) : kümülatif salım profil doğrusunun X eksenini kestiği nokta

L: stratum korneumun kalınlığı (cm)

2.2.7 Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum mikroemülsiyon formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini belirlemek, mikroemülsiyon hazırlama aşamalarından gelebilecek olumsuzlukları ve etkin madde ile taşıyıcılar arasındaki etkileşim ve geçimsizlikleri tespit etmek amacıyla bir seri analiz yapılmıştır. Bunlar mikroemülsiyonun fiziksel görüntüsü, mikroemülsiyon tipi, santrifüj özellikleri, pH'sı, elektrik iletkenliği, dansitesi, refraktif indisi, damlacık boyutu dağılımı ve stabilitesinin belirlenmesidir (39). Tüm parametreler için üç paralel ölçüm yapılmıştır.

2.2.7.1 Mikroemülsiyonların Fiziksel Görünüşü

Taze hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) fiziksel görünüşleri incelenerek değerlendirildi.

2.2.7.2 Mikroemülsiyonların Tipi

Hazırlanan mikroemülsiyonların tipi dış faz su ile seyreltilerek veya boya testi yapılarak bulundu. Suda çözünen (metilen mavisi) ve yağda çözünen (Sudan III) boyaları kullanılarak dış fazın tipi tayin edildi.

2.2.7.3 Mikroemülsiyonların Santrifüj Edilmesi

Optimum mikroemülsiyon sistemleri literatürde verildiği gibi 13000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi (123). Santrifüj sonunda mikroemülsiyonlarda herhangi bir faz ayrışması olup olmadığı incelendi.

2.2.7.4 Mikroemülsiyonların pH Ölçümleri

Optimum mikroemülsiyonların pH’sı oda sıcaklığında pH metre ile ölçüldü.

2.2.7.5 Mikroemülsiyonların Elektrik İletkenliği Ölçümleri

Optimum mikroemülsiyonların elektrik iletkenliği, iletkenlik ölçer aleti ile belirlendi.

2.2.7.6 Mikroemülsiyonların Dansite Ölçümleri

Optimum mikroemülsiyonların dansitesi piknometre kullanılarak, oda sıcaklığında ölçüldü. Dansite ölçümleri Eşitlik 14’deki formüle göre yapıldı. İlk önce piknometrenin boş iken darası alındı. Daha sonra piknometre distile su ile doldurulup tartıldı. Ardından etanol ile çalkalanıp etüvde kurutulmaya bırakıldı. Son olarak ise kuruyan piknometre mikroemülsiyon formülasyonu ile doldurulup tartıldı. Eşitlik 14 yardımıyla hesaplandı.

$$d = (A3-A1) / (A2-A1) \dots\dots\dots \text{Eşitlik 14}$$

d = Dansite (g/mL)

A3 = Piknometre ile tartılan mikroemülsiyon formülasyonunun ağırlığı

A2 = Piknometrenin darası

A1 = Piknometre ile tartılan distile suyun ağırlığı

2.2.7.7 Mikroemülsiyonların Refraktif İndisi Ölçümleri

Mikroemülsiyon sisteminin refraktif indisi ölçümü refraktometre ile yapıldı. Damlacık büyüklüğü tayininde bu değerlerden yararlanıldı.

2.2.7.8 Mikroemülsiyonların Viskozitesinin Ölçümleri

Mikroemülsiyonun viskozitesi 37 ± 1 °C de rheometer kullanılarak ölçüldü. Bu değerler damlacık büyüklüğü ölçümünde de kullanıldı.

2.2.7.9 Mikroemülsiyonların Damlacık (partikül) Büyüklüğünün Saptanması

Mikroemülsiyonların damlacık büyüklükleri malvern zeta sizer Nano ZS aletini kullanarak oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) ölçüldü.

2.2.7.10 Mikroemülsiyonların Faz Değişim Sıcaklığının Ölçümü

Mikroemülsiyon sistemin faz değişim sıcaklığı, elektrik iletkenliği ölçen alet ile 20 ± 2 °C ile 68 ± 2 °C aralığına ayarlanmış su banyosunda, 1 °C arttırılan sıcaklıklarda, elektrik iletkenliğinin düştüğü sıcaklık (°C) tespit edilerek yapıldı (9).

2.2.7.11 Mikroemülsiyonların Stabilité Çalışmaları

Mikroemülsiyonun stabilitesinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları, 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C ve 40 ± 2 °C’de altı ay boyunca saklandı. Formülasyonların fiziksel görünüm, pH, iletkenlik, bulanıklık, faz ayrışması ve damlacık büyüklüğü gibi özellikleri başlangıçta (t=0 anında), üçüncü ve altıncı aylarda incelendi.

2.2.8 İn-Vivo Çalışmalar

Farmakodinamik cevap olarak antiinflamatuvar ve analjezik aktiviteye bakıldı. Analjezik etki araştırması için tail flick (116) ve hot plate testleri (117), antiinflamatuvar etki araştırması için pençe ödem testi (21, 87) yapıldı. Bu amaçla in-vitro, ex-vivo geçiş çalışmalarında membranlardan en iyi difüze olabilen S/Y

tipinde olan M8 ve Y/S tipinde olan M9 mikroemülsiyon formülasyonları in-vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçildi.

Antiinflamatuvar ve analjezik etki çalışmaları için her bir grup için 7 adet, 200-300 g ağırlığında erkek sıçan kullanıldı (Yapılan deneyler için 10.04.2008 tarihli ve 2008/3-1 karar nolu etik kurul izni E.Ü. Ecz. Fak.'den alınmıştır). Hayvanlar 22 ± 1 °C'de ve 12 saat ışık alan 12 saat karanlık olan bir ortamda tutuldular. Yiyecek ve içecek kısıtlaması yapılmadı. Deneyler 08:00 – 14.00 saatleri arasında gün ışığı alan ve 22 ± 1 °C'deki laboratuvar ortamında yapıldı.

Analjezik ve antiinflamatuvar aktivite araştırmaları için hayvanlar deneyden bir saat önce sessiz laboratuvar ortamına alındı. Altı adet çalışma grubu yapıldı. Bunlar:

- Grup 1: 500 mg Serum fizyolojik uygulaması (Negatif kontrol grubu) (Kontrol SF)
- Grup 2: 500 mg S/Y etkin madde içermeyen mikroemülsiyon uygulaması (Negatif kontrol grubu) (Boş M8)
- Grup 3: 500 mg Y/S etkin madde içermeyen mikroemülsiyon uygulaması (Negatif kontrol grubu) (Boş M9)
- Grup 4: 500 mg S/Y mikroemülsiyon uygulaması (Test grubu) (M8)
- Grup 5: 500 mg Y/S mikroemülsiyon uygulaması (Test grubu) (M9)
- Grup 6: 500 mg ticari preparat uygulaması (Pozitif kontrol grubu) (Ticari Preparat)

2.2.8.1 Antiinflamatuvar Aktivite Çalışmaları

Antiinflamatuvar aktivite, sıçanlarda karegenin ile indüklenen pençe ödem testi ile değerlendirildi. SF içerisinde çözünmüş % 1 karegenin (0.1 mL) sıçanın sol arka pençesinin subplantar bölgesine enjekte edildi (Şekil 10). Enjeksiyondan 60 dakika önce, geliştirilen % 10 NP içeren M8, M9 formülasyonları, etkin madde içermeyen M8, M9 formülasyonları, ticari preparat ve SF çözeltisi 500 mg olacak şekilde tartıldı. Tartılı miktar flaster üzerine konularak bir gün önceden tıraş edilmiş sıçanların sırt derisine (4x4 cm²) elastik bandaj ile sıkıca kapatılarak uygulandı (Şekil 11). Sıçanlar tek tek ayrı kutulara alındı (Şekil 12). Pençe hacmi, karagenin enjeksiyonundan önce ve sonraki 1, 2, 3, 4, 5, 6. saatlerde, pençenin işaretlenen yerine kadar su pletismometresine (Lettica, LE 7500) (Şekil 13) sokularak ölçüldü

(21, 26, 63, 64, 87, 101, 116) (Şekil 14). Pençe ödemi kontrol etmek amacı ile sıçanın sağ arka pençesinin subplantar bölgesine sadece SF enjekte edildi (Şekil 15) ve tıpkı karagenin enjekte edilen sol pençe gibi enjeksiyondan önce ve sonraki 1, 2, 3, 4, 5, 6. saatlerde sağ pençenin de hacim ölçümü yapıldı (Şekil 16).

Tüm ölçümler bittikten sonra, grafiği çizmek amacıyla Eşitlik 15 ile hesaplar (t zamanı için yüzde inhibisyon) yapıldı (26, 38, 64).

$$\% \text{ ödem inhibisyonu} = \frac{(V_t - V_{t_0})}{V_{t_0}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eşitlik 15}$$

V_t = t zamanında ölçülen hacim

V_{t_0} = başlangıçta ölçülen hacim

Her saat için bu formül kullanılarak ödem artışı hesaplandı. Daha sonra bunların ortalama yüzdeleri ve bunların standart hataları (% ort $\pm$ SH) hesaplanarak grafiği çizildi.



Şekil 10: Sol pençeye karagenin enjeksiyonu



Şekil 11: Sıçanlara formülasyonların uygulanması



Şekil 12: Formülasyon uygulanmış sıçanların görüntüsü



Şekil 13: Su pletismometresi



Şekil 14: Sol pençenin ölçümü



Şekil 15: Sağ pençeye SF çözeltisi enjeksiyonu



Şekil 16: Sağ pençenin ölçümü

2.2.8.2 Analjezik Aktivite Çalışmaları

Analjezik aktivite için tail flick ve hot plate testleri yapıldı. Bu testlerde de, tıpkı bölüm 2.2.8.1'deki antiinflamatuvar aktivite çalışmalarında anlatıldığı gibi % 10 NP içeren M8, M9 formülasyonları, etkin madde içermeyen M8, M9 formülasyonları, ticari preparat ve SF çözeltisi 500 mg olacak şekilde tartıldı. Tartılı miktar flaster üzerine konularak bir gün önceden tıraş edilmiş sırt derisine (4x4 cm²) elastik bandaj ile sıkıca kapatılarak uygulandı (Şekil 11).

2.2.8.2.1 Tail Flick Testi

Bu test ile, kuyruğun dorsal yüzeyine ışık veren ağırlı bir termal stimulus (uyarı) (Tail flick metre, MAY-TF 0703) (Şekil 17) uygulanması sonrasında sıçanların kuyruklarını ağırlı uyarandan çekmeleri için geçen süre (latens) saniye cinsinden ölçülerek değerlendirildi. Ağırlı uyarının duyarlılığı, kontrol grubu hayvanlarda (Kontrol SF, Boş M8, Boş M9) kuyruk çekmede ortalama 3-5 sn'lik bir latens süresi oluşacak şekilde ayarlandı. Geliştirilen % 10 NP içeren M8 ve M9 formülasyonların, etkin madde içermeyen M8, M9 formülasyonların ve ticari preparatın sıçanlara uygulanmadan önce ve sıçanlara uygulandıktan sonraki 15, 30, 45, 60, 90, 120 ve 180. dakikalarda latens değerleri belirlendi (Şekil 18). Uygulamalar, herhangi bir doku hasarına sebep olmamak için, eğer hayvan 15 saniye içerisinde cevap vermediyse sonlandırıldı (51, 75, 79, 83, 91, 116, 117).



Şekil 17: Tail Flick



Şekil 18: Sıçanlarda latens değerlerinin belirlenmesi

2.2.8.2.2 Hot Plate Testi

Hayvanlar maksimum 30 sn. lik bir zaman için 62 ± 1 °C sıcaklıktaki alüminyum hot plate'e (Aneljezik hot plate, MAY-AHP 0603) (Şekil 19) yerleştirildi. Sıçanların her bir grubunun sırt derisine, geliştirilen formülasyonlar ve ticari preparat uygulanmadan önce ve uygulamadan sonraki 15, 30, 45, 60, 90, 120 ve 180. dakikalarda hayvanların ön ve arka pençesini yaladığı ve sıçradığı zaman, reaksiyon zamanı olarak kaydedildi (20, 51, 75, 79, 116, 117) (Şekil 20).



Şekil 19: Hot plate



Şekil 20: Sıçanlarda reaksiyon zamanının belirlenmesi

2.2.9 İstatistiksel Çalışmalar

Mikroemülsiyon formülasyonlarından ve ticari preparattan elde edilen in-vitro, ex-vivo, in-vivo sonuçlar SPSS bilgisayar programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) istatistiksel olarak değerlendirildi (21, 63, 64, 101, 111, 116, 117, 121, 126).

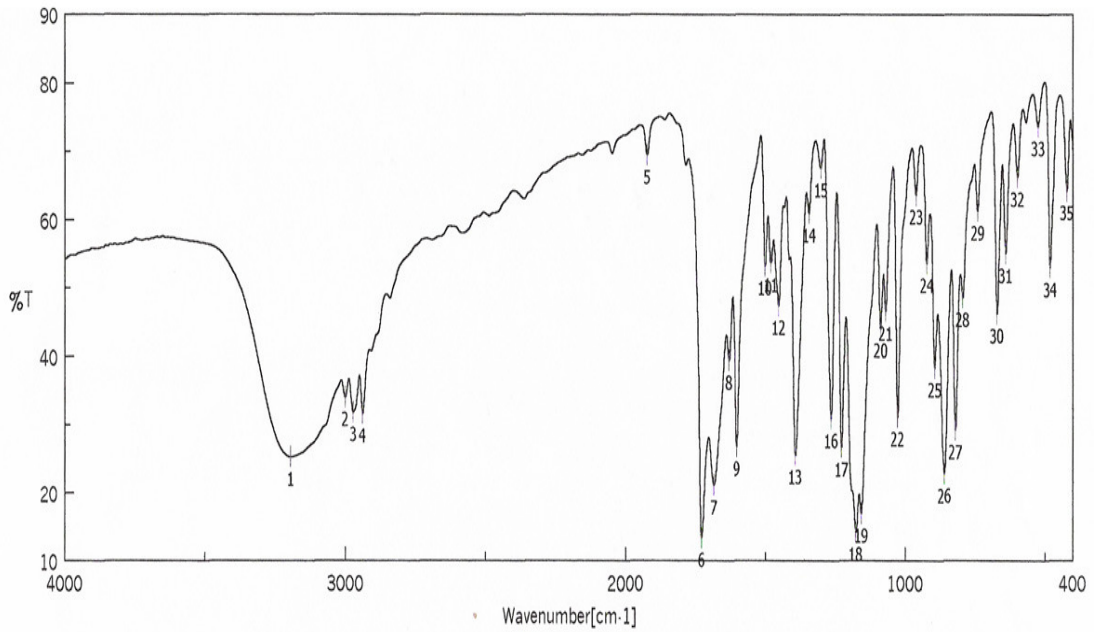
BÖLÜM III

3. BULGULAR

3.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Naproksen'in Özelliklerine Ait Bulgular

3.1.1 NP'nin Infrared (IR) Analizi Bulguları

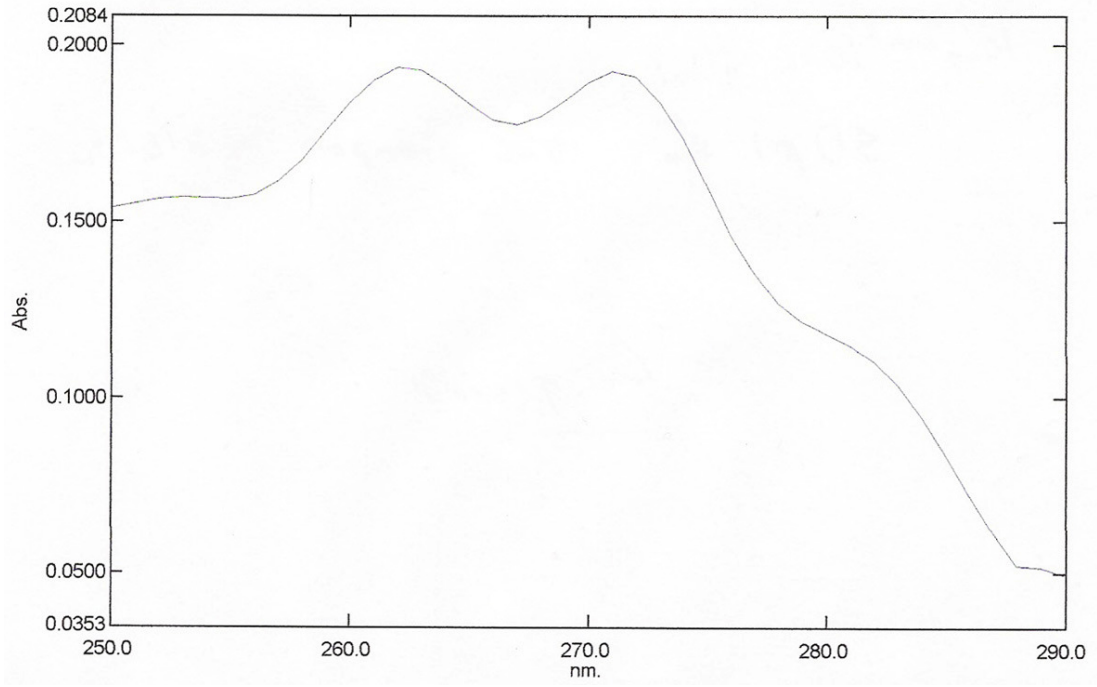
NP'nin yöntem 2.2.1.1'de belirtildiği gibi çalışılarak elde edilen IR spektrumunun gösterdiği absorpsiyon bantları, 3195, 3000, 2971, 2938, 1924, 1727, 1683, 1631, 1602, 1504, 1482, 1455, 1394, 1346, 1303, 1265, 1228, 1176, 1157, 1089, 1072, 1027, 962, 923, 894, 860, 819, 794, 740, 673, 642, 599, 526, 482, 422 cm^{-1} olarak bulundu. Bu değerler literatürlerde NP için verilen IR bantlarıyla uyumlu bulundu. (27, 108). IR spektrumu Şekil 21'de görülmektedir.



Şekil 21 : NP'nin infrared spektrumu

3.1.2 NP'nin UV Analizi Bulguları

NP'nin UV spektrumu deneysel yöntem 2.2.1.2'de belirtildiği gibi çalışılarak pH 7.4 fosfat tamponunda maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu (λ_{max}) 263 nm olarak bulundu. Bulunan değerin literatürlerde belirtilen değerle uyumlu olduğu görüldü (27, 109). Şekil 22'de NP'nin elde edilen UV spektrumu görülmektedir.



Şekil 22 : NP'nin UV spektrumu

3.1.3 NP'nin Ergime Noktasına Ait Bulgular

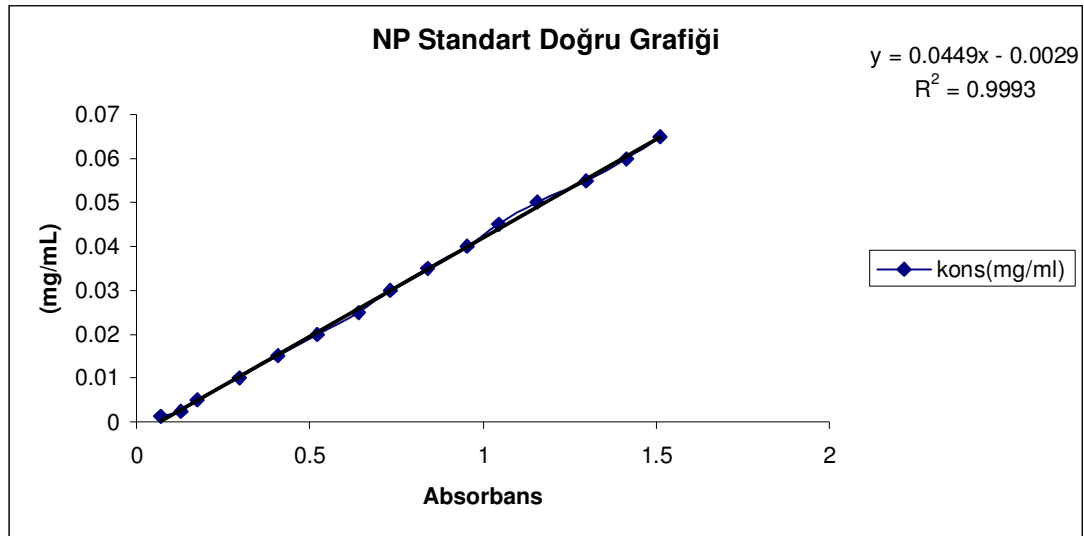
Bornstead dijital erime derecesi tayin aleti ile yapılan deneylerde NP'nin ergime derecesi 156 ± 1 °C bulundu (27).

3.1.4 NP'nin Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayinine Ait Bulgular

Bir maddenin birbiri içinde karışmayan iki faz yani sulu ve yağlı faz arasındaki dağılımının kantitatif ölçüsü partisyon katsayısıdır. Yağ fazı olarak vücudun yağlı dokularıyla büyük benzerlik gösteren n-oktanol'ü kullandık. Bu katsayı genellikle log P olarak yada log K yağ/su olarak gösterilir. Yöntem 2.2.1.4'de anlatıldığı gibi NP'ye ait Eşitlik 10 ile hesaplanan log K yağ/su değeri 3.18'dir. Bu değer literatür ile uyum içindedir (46).

3.2 NP'nin UV ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi

Model etkin madde NP'nin ve ticari preparatının in vitro geçiş çalışmaları için pH 7.4 fosfat tamponundaki kalibrasyon eğrisi deneysel bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi çalışarak çizildi. Kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 23'de gösterilmiştir. Grafiğe ait denklem Tablo 14'de verilmiştir.



Şekil 23 : NP'nin UV'de 263 nm dalga boyunda pH 7.4 tamponunda çizilen kalibrasyon eğrisi

Tablo 14 : pH 7.4 fosfat tamponu kullanarak çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi

Kullanılan çözelti	Doğru denklemi	Determinasyon katsayısı
pH 7.4 tamponu	$Y = 0.0449x - 0.0029$	0.9993 (r^2)
Y : Konsantrasyon (mg/mL)		X : Absorbans

3.2.1 Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular

3.2.1.1 Doğrusallık Sonuçları

Bölüm 2.2.2.1.1'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Sonuçlara göre çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 23'de gösterilmiştir. r^2 değeri 0.9993 olarak bulunmuştur.

3.2.1.2 Kesinlik

3.2.1.2.1 Tekrar Edilebilirlik Sonuçları

Bölüm 2.2.2.1.2.1'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Altı kez art arda absorbans ölçümü sonucu elde edilen değerler Tablo 15'de gösterildi. Varyasyon katsayısı % 2'den az bulundu.

Tablo 15 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar edilebilirlik bulguları

Örnek No	Absorbans
1	1.158
2	1.159
3	1.159
4	1.159
5	1.158
6	1.158
7	1.158
8	1.159
9	1.60
10	1.159
ORT	1.1587
SP	0.0006
% VK	0.0582

3.2.1.2.2 Tekrar Elde Edilebilirlik Sonuçları

Bölüm 2.2.2.1.2.2'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Aynı konsantrasyonda altı farklı örneğin ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri Tablo 16'de gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı % 2'den az bulunmuştur.

Tablo 16 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar elde edilebilirlik bulguları

Örnek No	Absorbans
1	1.159
2	1.161
3	1.158
4	1.162
5	1.159
6	1.160
ORT	1.1598
SP	0.0014
% VK	0.1269

3.2.1.3 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik Sonuçları

Bölüm 2.2.2.1.3'de anlatıldığı gibi çalışıldı. 3 farklı konsantrasyonda çalışılan sonuçlar Tablo 17'de gösterilmiştir. Ortalama yüzde geri kazanım farkı $\pm$ % 10 aralığına girmektedir.

Tablo 17 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları

Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans	Elde edilen C (mg/mL)	Geri Elde (%)
0.02	0,517	0.0209	101.5665
0.02	0,518	0.0207	101,791
0.02	0,516	0.0210	101,342
ORT			101,566
SP			0.224
VK			0.221
0.04	0.961	0.0397	100.622
0.04	0.965	0.0404	101.071
0.04	0.949	0.0397	99,275
ORT			100.322
SP			0.934
VK			0.931
0.06	1.411	0.0604	101,756
0.06	1.423	0.0609	101,654
0.06	1.425	0.0612	101.804
ORT			101.405
SP			0,566
VK			0,558

2.2.2.1.4 Seçicilik

Deneyisel bölüm 2.2.2.1.4'de anlatıldığı gibi, formülasyonda yer alan diğer maddelerle hazırlanan plasebo test çözeltisi analiz edildi. Etkin madde içermeyen formülasyon aynı dalga boyunda maksimum absorbans göstermediği tespit edildi.

2.2.2.1.5 Günler Arası Geçerlilik

Deneyisel bölüm 2.2.2.1.5'de anlatıldığı gibi, çalışma günü kalibrasyon eğrisinin düşük, orta ve yüksek derişimlerine karşılık gelecek şekilde hazırlanan çözeltilerin spektrofotometrede uygun dalga boyunda çözücüye karşı okundu. Elde edilen absorbsiyon değerleri gerçek değerle aynı bulunmuştur.

3.2.1.6 Stabilité Sonuçları

Bölüm 2.2.2.1.6'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oda ısısında (25 ± 2 °C), 5 ± 3 °C (buz dolabında) ve -20 ± 5 °C (derin dondurucuda) bekletilerek ölçülen absorbans değerleri Tablo 18'de gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı her biri için %2'den az bulunmuştur.

Tablo 18 : NP'nin spektrofotometre ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait stabilite sonuçları

Gün	25 ± 2 °C (Oda ısısı)	5 ± 3 °C(buzdolabı)	-20 ± 5 °C (dondurucu)
0	0.251	0.252	0.255
15	0.251	0.251	0.254
30	0.250	0.251	0.254
60	0.250	0.250	0.253
90	0.250	0.249	0.251
120	0.249	0.248	0.252
150	0.251	0.250	0.249
180	0.251	0.251	0.250
ORT	0.2503	0.2502	0.2522
SP	0.0007	0.0012	0.0021
% VK	0.2971	0.5121	0.8409

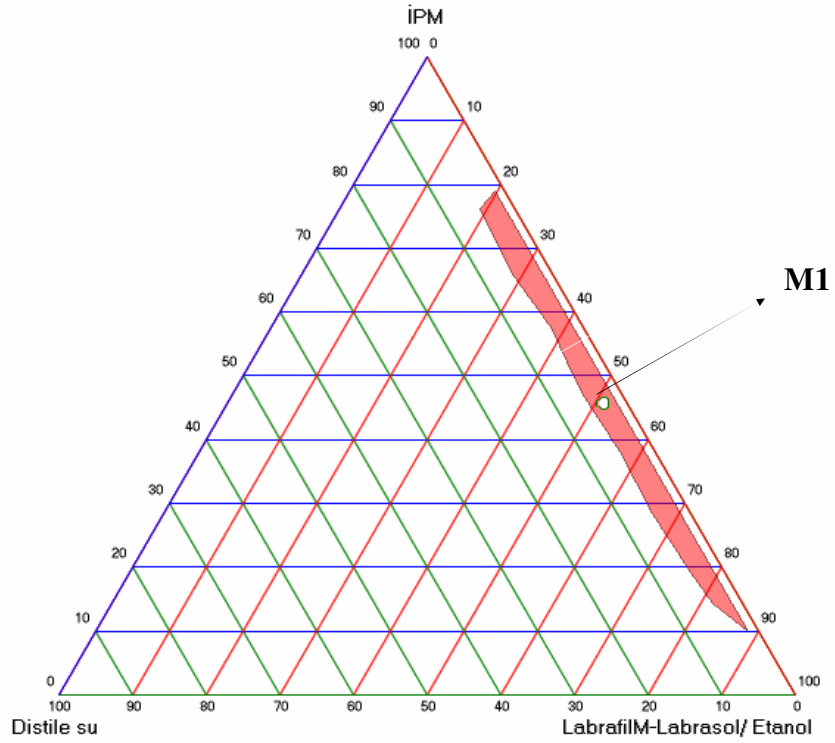
3.3 Formülasyonlar Çalışmalarına Ait Bulgular

3.3.1 Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Tüm mikroemülsiyon formülasyonları için bölüm 2.2.3.1.2'de anlatıldığı gibi yapılan formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen değerler ile bölüm 2.2.3.1.3'de anlatıldığı gibi üçgen faz diyagramları çizildi.

3.3.1.1 F3-1 Formülasyonuna Ait Bulgular

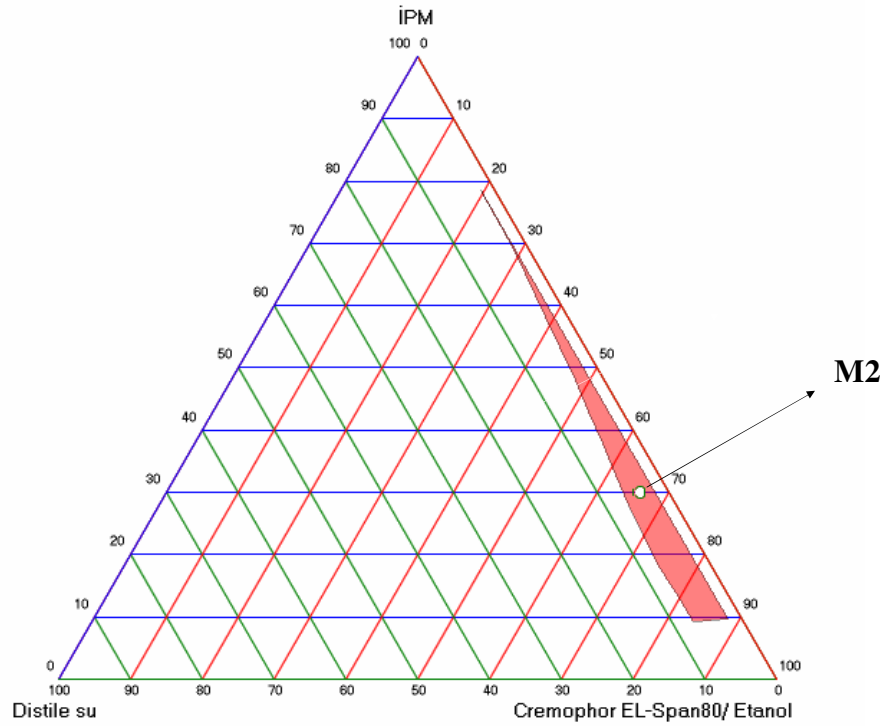
Tablo 5’de belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F3-1 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:7 oranında, Labrafil M / Labrasol ise 5:1 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM ve su fazı olarak distile su kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 5.66 olarak hesaplandı. Şekil 24’de F4-1 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M1) gösterilmiştir. M1 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 24: İPM-Labrafil M:Labrasol-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.2 F6-1 Formülasyonuna Ait Bulgular

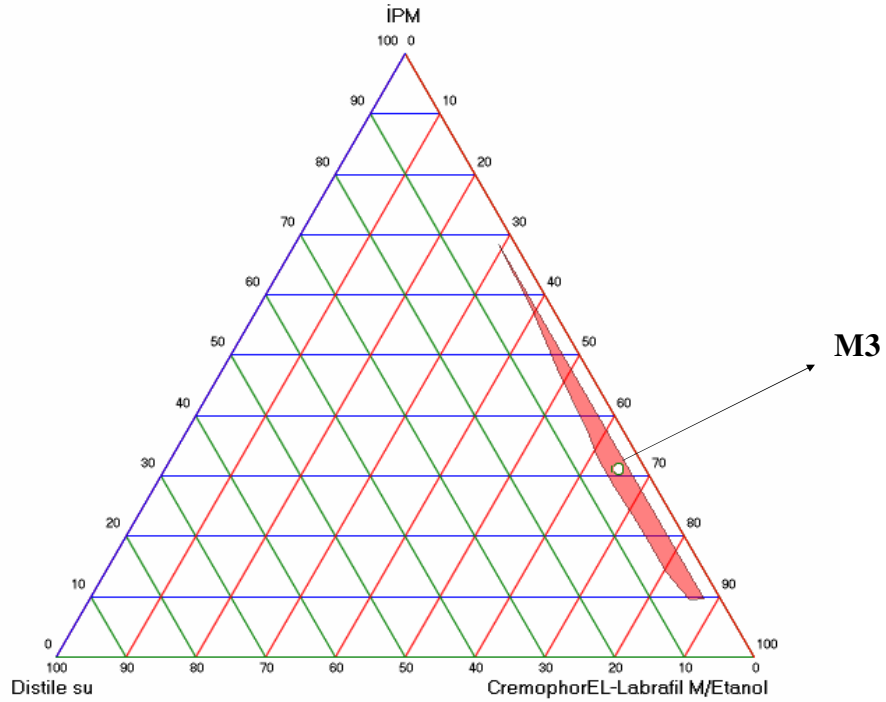
Tablo 6’da belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F6-1 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:7 oranında, Cremophor EL / Span 80 ise 2:5 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak distile su kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 6.64 olarak hesaplandı. Şekil 25’de F6-1 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M2) gösterilmiştir. M2 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 25 : İPM-Cremophor EL:Span 80-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.3 F10-1 Formülasyonuna Ait Bulgular

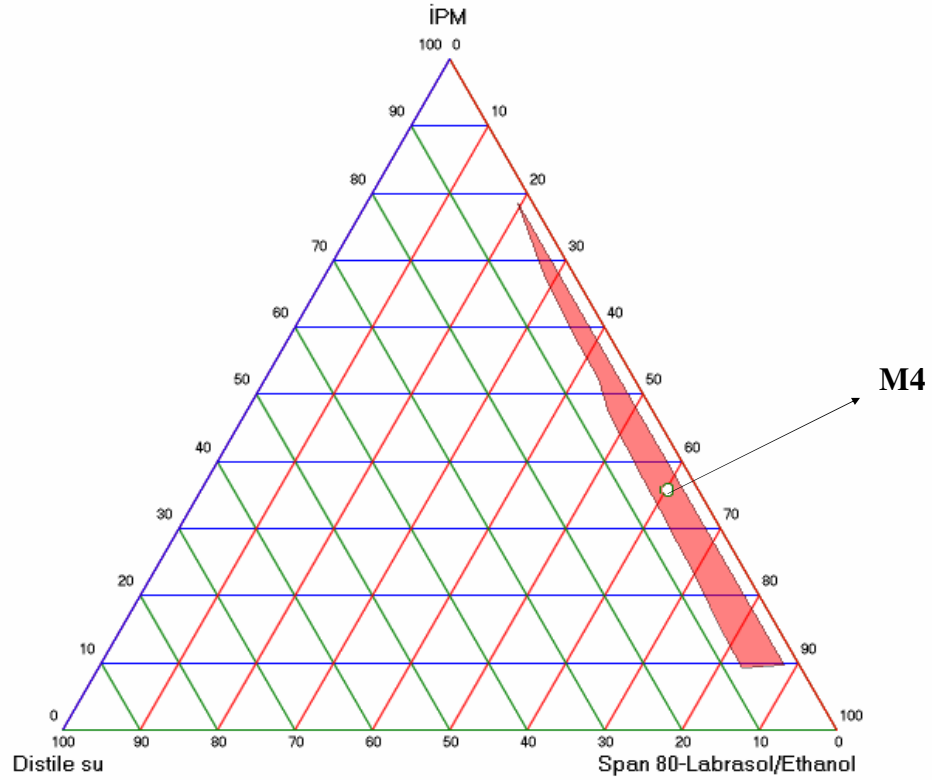
Tablo 7’de belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F10-1 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:9 oranında, Cremophor EL / Labrafil M ise 1:2 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak distile su kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 6.833 olarak hesaplandı. Şekil 26’da F10-1 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M3) gösterilmiştir. M3 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 26 : İPM-Cremophor EL:Labrafil M-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.4 F12-1 Formülasyonuna Ait Bulgular

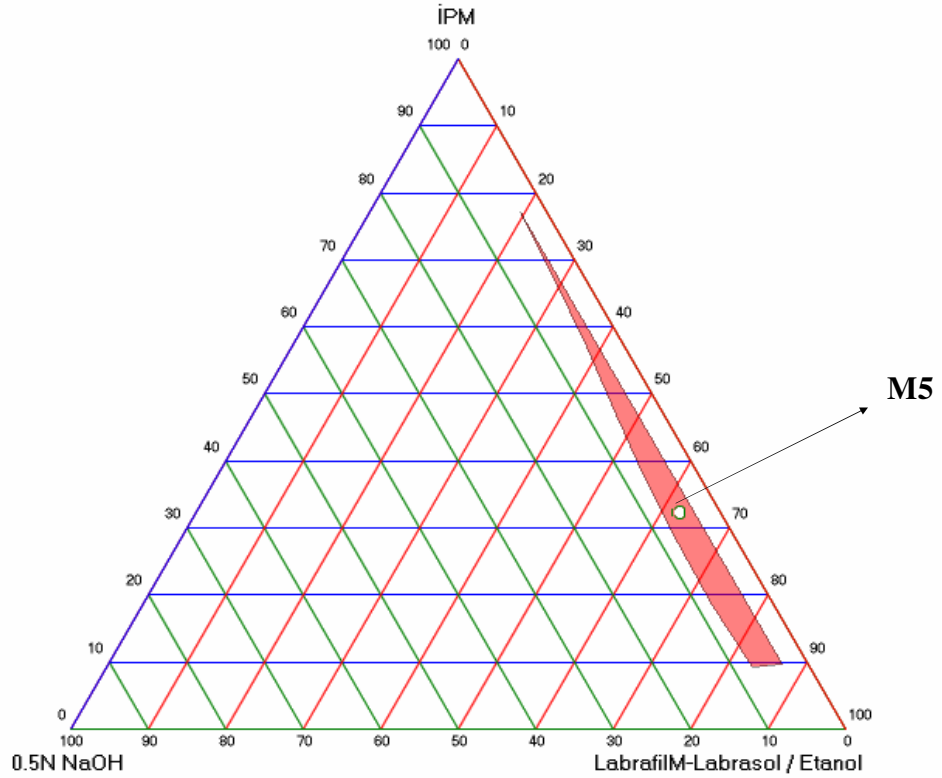
Tablo 8’de belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F12-1 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:8 oranında, Span 80 / Labrasol ise 5:1 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak ise distile su kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 5.916 olarak hesaplandı. Şekil 27’de F12-1 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M4) gösterilmiştir. M4 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 27 : İPM-Span 80:Labrasol-etanol ve su mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.5 F15 Formülasyonuna Ait Bulgular

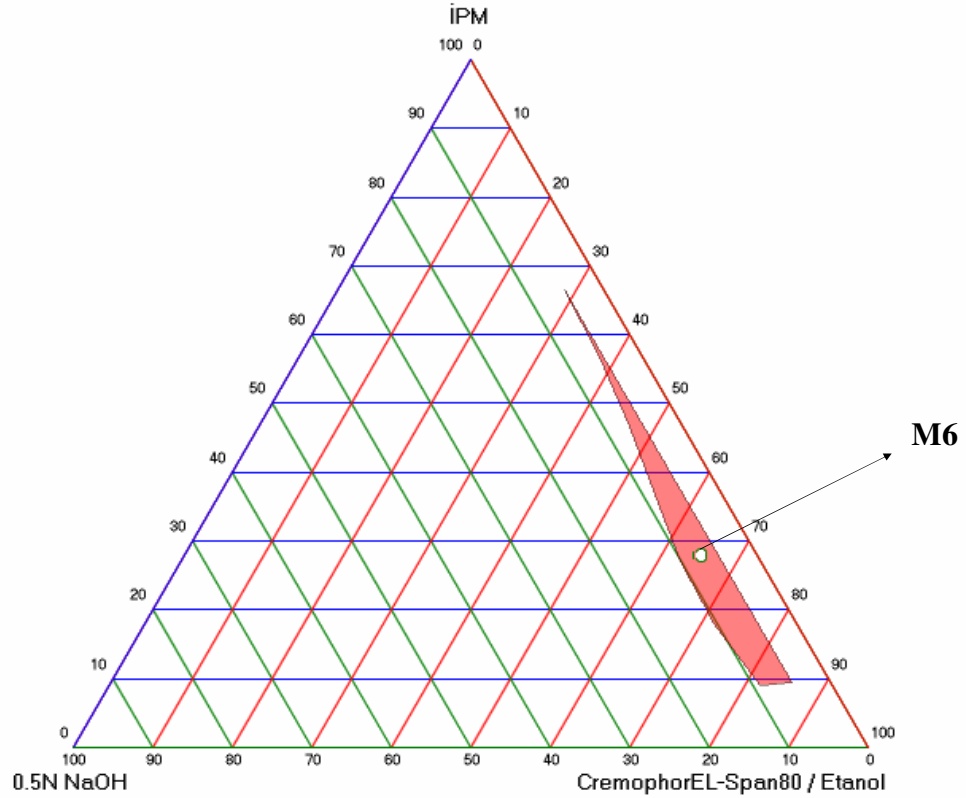
Tablo 9’da belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F15 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:7 oranında, Labrafil M / Labrasol ise 5:1 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak 0.5N NaOH çözeltisi kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 5.66 olarak hesaplandı. Şekil 28’de F17 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M5) gösterilmiştir. M5 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 28 : İPM-Labrafil M:Labrasol-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.6 F19 Formülasyonuna Ait Bulgular

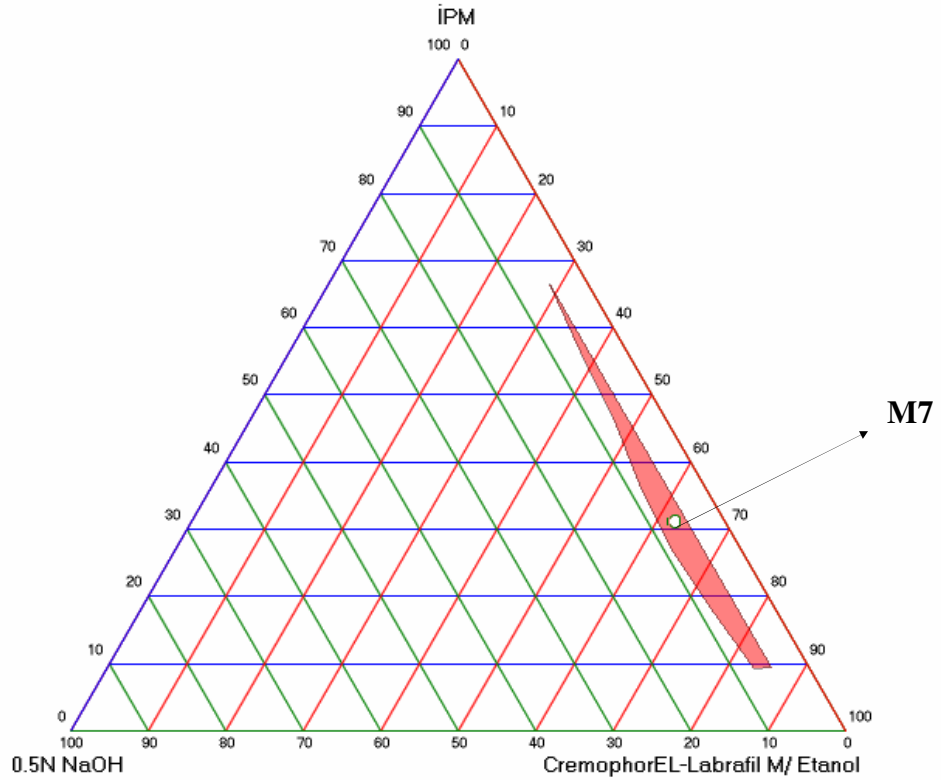
Tablo 10’da belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F19 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:8 oranında, Cremophor EL / Span 80 ise 2:5 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak 0.5N NaOH çözeltisi kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 6.64 olarak hesaplandı. Şekil 29’da F19 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M6) gösterilmiştir. M6 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 29 : İPM-Cremophor EL:Span 80-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.7 F22 Formülasyonuna Ait Bulgular

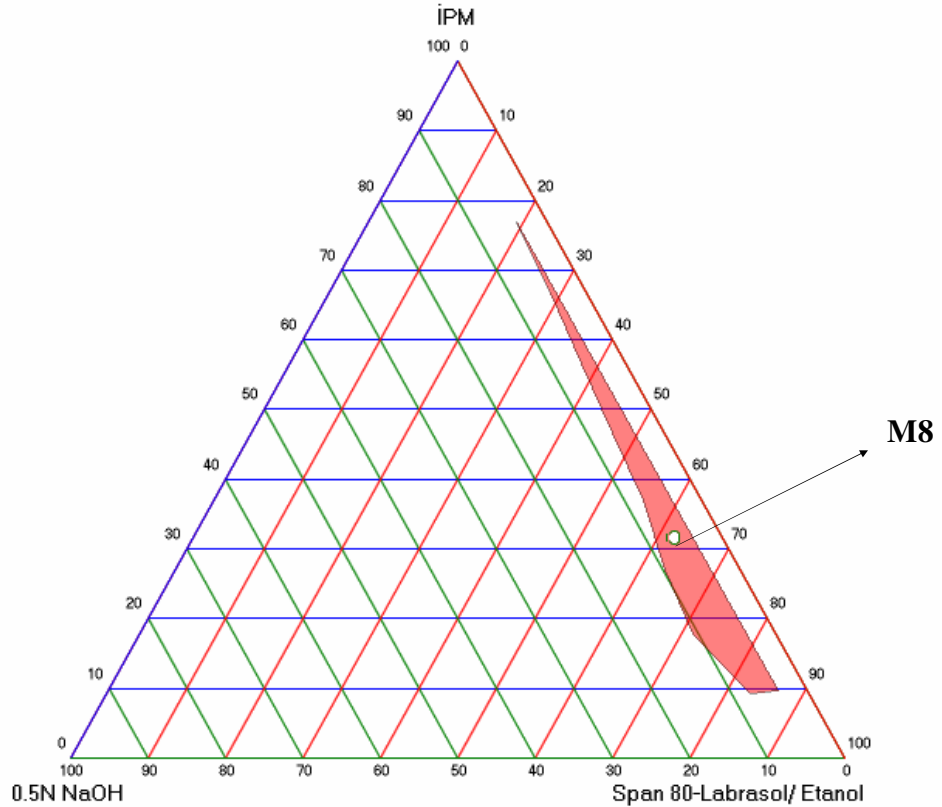
Tablo 11’de belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F22 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:7 oranında, Cremophor EL / Labrafil M ise 1:2 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak 0.5N NaOH çözeltisi kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 6.833 olarak hesaplandı. Şekil 30’da F22 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M7) gösterilmiştir. M7 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 30 : İPM-Cremophor EL:Labrafil M-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.8 F25 Formülasyonuna Ait Bulgular

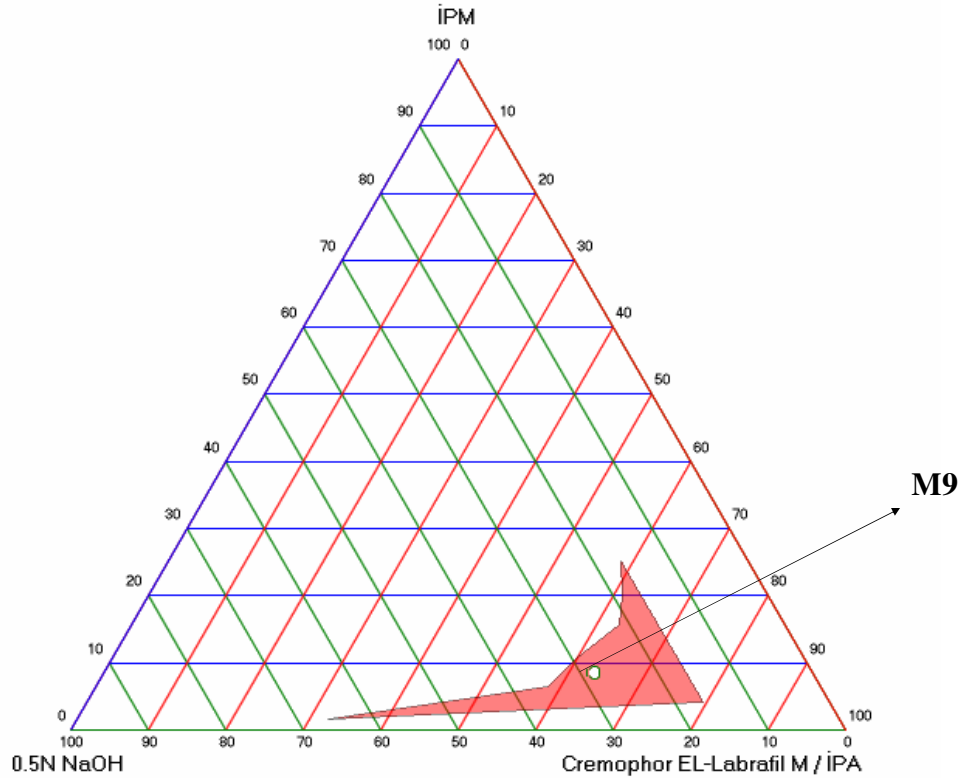
Tablo 12’de belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F25 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:7 oranında, Span 80 / Labrasol ise 5:1 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak 0.5N NaOH çözeltisi kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 5.916 olarak hesaplandı. Şekil 31’de F25 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M8) gösterilmiştir. M8 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 31: İPM-Span 80:Labrasol-etanol ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

3.3.1.9 F29 Formülasyonuna Ait Bulgular

Tablo 13’de belirtilen formülasyonlar arasında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesini veren formülasyon F29 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM 1:3 oranında, Cremophor EL / Labrafil M ise 3:1 oranında kullanıldı. Yağ fazı olarak İPM, su fazı olarak 0.5N NaOH çözeltisi kullanıldı. Mikroemülsiyonun HLB değeri 10.375 olarak hesaplandı. Şekil 32’de F29 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanın ağırlık merkezi (M9) gösterilmiştir. M9 formülasyonunun terkihi Tablo 19’da verilmiştir.



Şekil 32 : İPM-Cremophor EL-Labrafil M -İPA ve 0.5 N NaOH çözeltisi mikroemülsiyon sistemine ait üçgen faz diyagramı

Geliştirilen (M1-M9) mikroemülsiyon formülasyonlarının kodları ile birlikte, mikroemülsiyon tipi, HLB değeri, YEM/YYEM oranı, terkipte kullanılan yağ, YEM/YYEM, distile su veya NaOH miktarları özet şeklinde Tablo 19’da verilmiştir. Geliştirilen bu formülasyonlara %10 oranında NP yüklenmiştir.

Tablo 19 : Geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonlarının tipi, HLB değerleri ve miktarları

Mikroemülsiyon Kodu	Mikroemülsiyon Tipi	HLB Değeri	YEM/YYEM Oranı	Yağ Miktarı (g)	YEM/YYEM Miktarı (g)	Su veya 0.5N NaOH Çözelti Miktarı(g)
M1	S/Y	5.66	1:7	2.602	7.096	0.303
M2	S/Y	6.64	1:7	2.372	7.094	0.534
M3	S/Y	6.833	1:9	2.943	6.646	0.411
M4	S/Y	5.916	1:8	2.766	6.682	0.552
M5	S/Y	5.66	1:7	3.234	6.240	0.526 *
M6	S/Y	6.64	1:8	2.790	6.505	0.705 *
M7	S/Y	6.833	1:7	3.109	6.249	0.643 *
M8	S/Y	5.916	1:7	2.622	6.640	0.738 *
M9	Y/S	10.375	1:3	0.853	6.343	2.804 *

* Su fazı olarak 0.5 N NaOH kullanılan formülasyonlar.

3.4 Geliştirilen NP Mikroemülsiyonların ve Ticari Preparatın İn-vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

3.4.1 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve Ticari Preparatın Nitro Selüloz Membrandan Geçiş Çalışmasının Bulguları

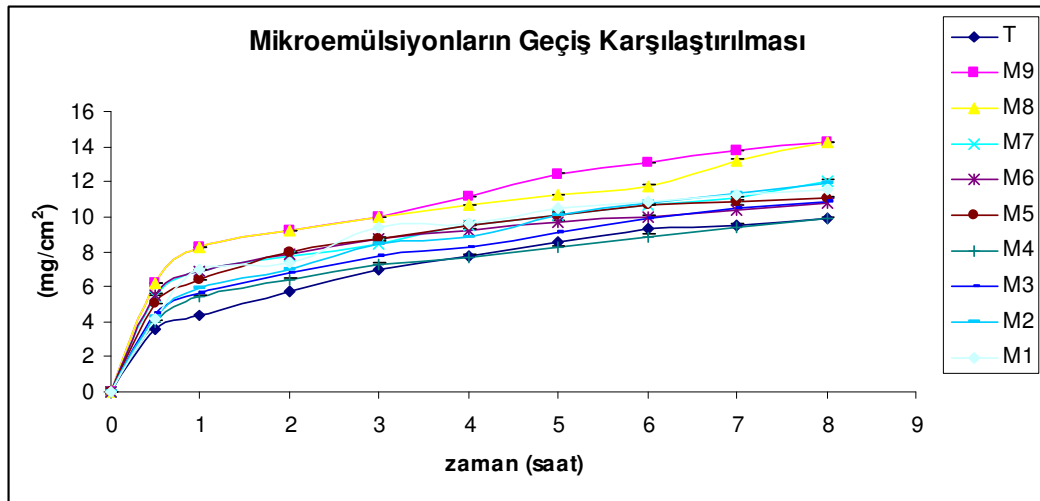
%10 konsantrasyonda NP içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının nitro selüloz membranından geçiş çalışmaları deneysel bölüm 2.2.4’de anlatıldığı şekilde sekiz saat boyunca yapıldı. Memrandan NP nin geçiş sonuçlarının matematiksel olarak değerlendirilmesi deneysel bölüm 2.2.6.’da anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Difüzyon sonuçları Tablo 20’de gösterilmiştir.

Nitro selüloz membrandan yapılan geçiş çalışmalarında 8. saatin sonunda membrandan geçebilen NP miktarı % 65 ile % 96 arasındadır (Tablo 20).

Hazırlanışı esnasında su fazı olarak 0.5 N NaOH içeren M7 ve M8 formülasyonları ile yapılan geçiş çalışmalarında membrandan difüze olabilen NP miktarı, su fazı olarak distile su kullanılarak hazırlanan M3 ve M4 formülasyonlarından difüze olan NP miktarına göre daha fazladır ve farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$), (Tablo 20). M1 – M2, M5 – M6 formülasyonları ile yapılan membrandan geçiş çalışmalarında 8. saatin sonunda difüze olabilen NP miktarı karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır ($P > 0.05$), (Tablo 20) (Şekil 33).

Tablo 20 : NP içeren mikroemülsiyon ve ticari preparatlarının nitro selüloz membrandan geçiş çalışmalarına ait sonuçlar ve hesaplamalar

Mikroemülsiyon Kodu	8 saatte geçen NP miktarı (mg/cm ²)	Jss (mg/cm ² /h)	D*10 ⁻⁷ (cm ² /h)	r ²
M1	11.560±0.031	1.140±0.003	1.66±0.020	0.758±0.004
M2	11.894±0.141	1.207±0.022	1.94±0.035	0.770±0.021
M3	10.841±0.143	1.061±0.010	1.93±0.002	0.816±0.004
M4	9.873±0.163	0.940±0.022	2.03±0.033	0.789±0.009
M5	11.062±0.090	1.055±0.010	1.6±0.0008	0.739±0.003
M6	10.730±0.338	0.939±0.043	1.49±0.033	0.674±0.030
M7	11.978±0.074	1.049±0.001	1.55±0.027	0.859±0.008
M8	13.229±0.027	1.395±0.006	2.01±0.002	0.887±0.001
M9	14.266±0.024	1.549±0.007	1.91±0.006	0.880±0.001
T	9.920±0.165	0.992±0.016	2.47±0.353	0.971±0.0003



Şekil 33: M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 ve ticari preparatına (T) ait nitro selüloz membrandan geçiş grafiği

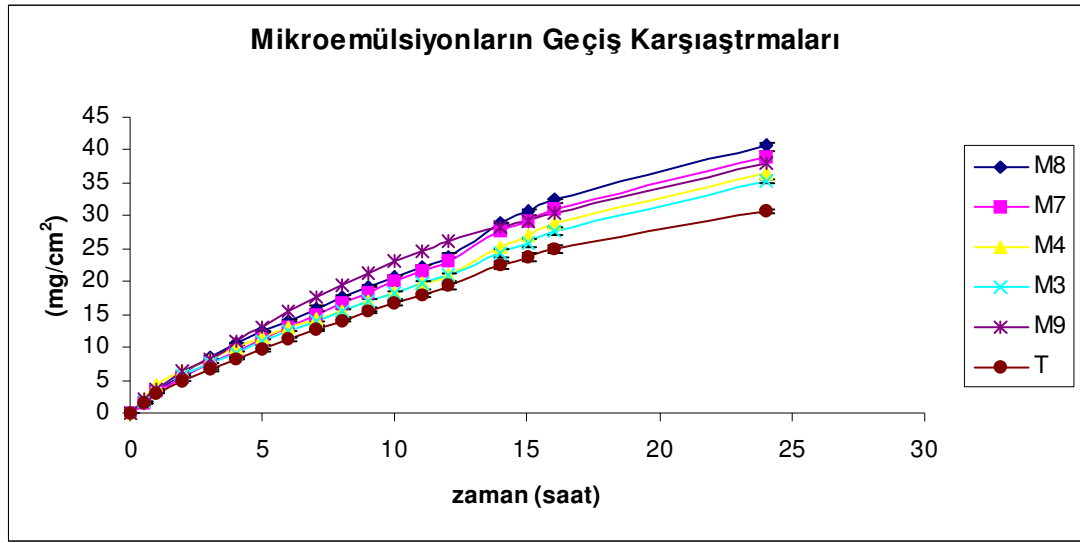
3.4.2 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve Ticari Preparatının Selüloz Membrandan Geçiş Çalışmasının Bulguları

Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı gibi elde edilen difüzyon sonuçları teorik bölüm 2.2.4’de anlatıldığı şekilde çalışılarak selüloz membrandan geçişi Fick’in 1. yasasına göre Eşitlik 11 ve 12 kullanılarak akış hızı, difüzyon katsayısı ve gecikme zamanı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar r^2 ve gecikme zamanı değerlerine göre yorumlanarak (en yüksek r^2 değeri ve en düşük gecikme zamanını veren formülasyonlar) seçilen M3 – M4 – M7 – M8 – M9 formülasyonları ile selüloz membrandan difüzyon çalışmaları yapıldı. %10 konsantrasyonunda NP içeren M3 – M4 – M7 – M8 – M9 mikroemülsiyon formülasyonlarının ve ticari preparatının selüloz membrandan 24 saatlik difüzyon sonuçları Tablo 21’de ve Şekil 34’de verilmiştir.

Geliştirilen tüm mikroemülsiyon formülasyonlar ve ticari preparat hesaplanan akış hızı, gecikme zamanı, difüzyon katsayısı ve 24. saatin sonunda difüze olabilen etkin madde miktarına göre karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0.05$), (Tablo 21).

Tablo 21 : NP içeren mikroemülsiyon ve ticari preparatlarının selüloz membrandan geçiş çalışmalarına ait sonuçlar ve hesaplamalar

Mikroemülsiyon kodu	24 saat sonunda geçen NP miktarı (mg/cm ²)	Jss (mg/cm ² /h)	D*10 ⁻⁷ (cm ² /h)	r ²	n (gecikme zamanı) (saat)
M3	35.308±0.354	1.611±0.069	2.91±0.347	0.992±0.003	2.292±0.260
M4	36.465±0.403	1.856±0.024	3.8±0.227	0.970±0.004	1.754±0.103
M7	38.977±0.868	1.831±0.080	3.79±0.441	0.995±0.001	1.758±0.199
M8	40.598±0.318	1.869±0.021	2.96±0.181	0.987±0.595	2.254±0.065
M9	38.039±0.401	2.105±0.039	3.21±0.151	0.993±0.772	2.080±0.095
T	30.477±0.405	1.508±0.044	3.15±0.351	0.994±0.001	2.118±0.164

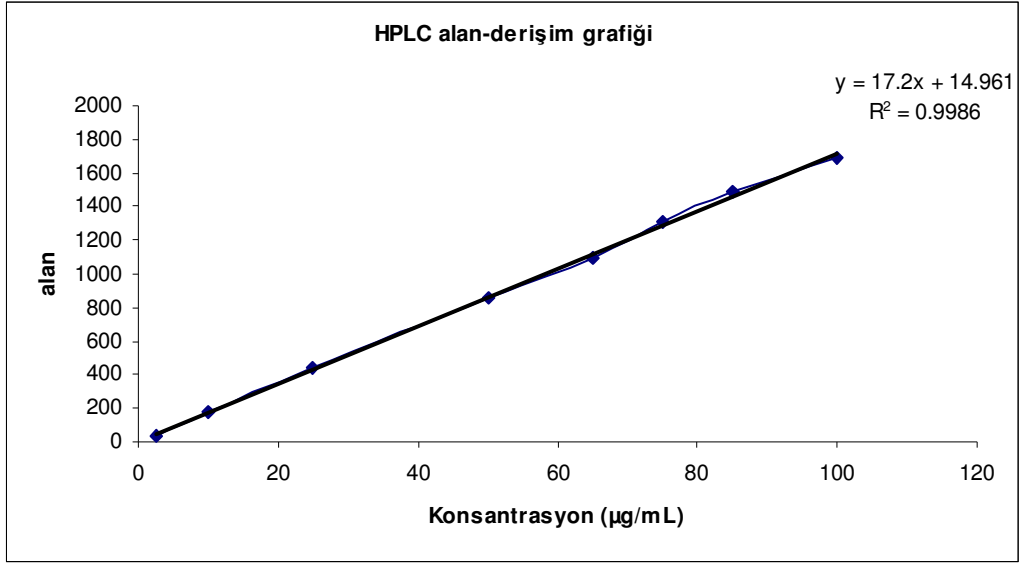


Şekil 34: M3, M4, M7, M8, M9 ve ticari preparatına (T) ait selüloz membrandan geçiş grafiği

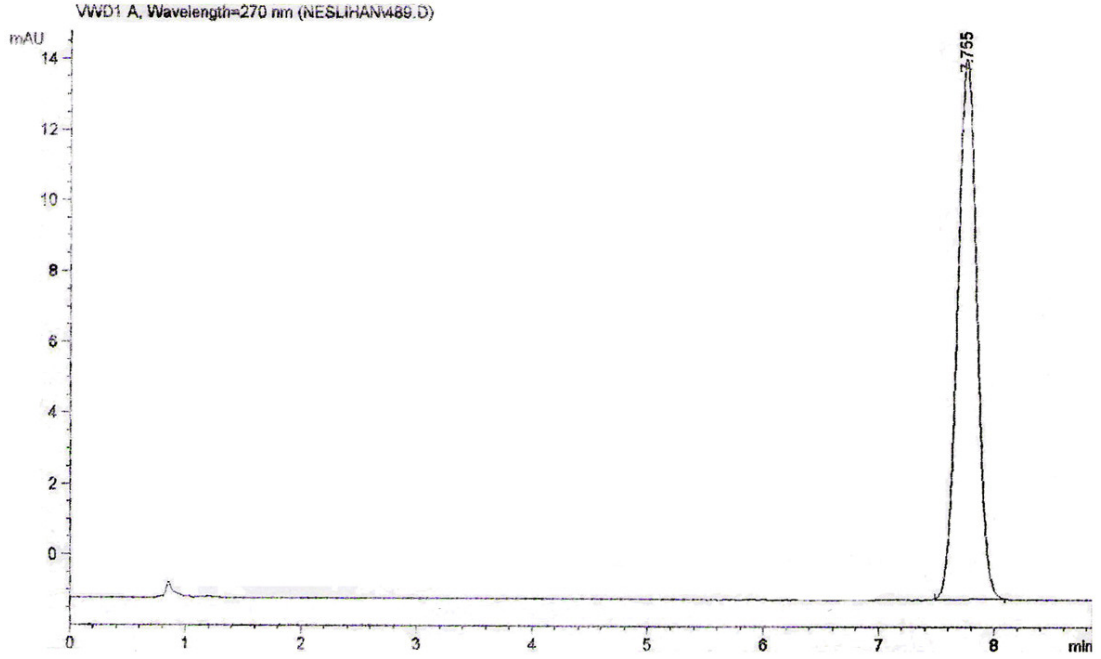
3.5 Geliştirilen NP Mikroemülsiyonların ve Ticari Preparatın Ex-vivo Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

3.5.1 HPLC ile Kalibrasyon Eğri Çizimi Bulguları

NP'nin pH 7.4 fosfat tamponundaki kalibrasyon eğrisi bölüm 2.2.5.1'de anlatıldığı gibi çizildi. Kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 35'de gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çiziminde oluşan piklerden biri Şekil 36'da gösterildiği gibidir ve pikin gelme süresi 7.7 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 35: NP'nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 36 :Etkin madde NP'nin kromatogramı

3.5.2 HPLC Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

3.5.2.1. Doğrusallık Sonuçları

Bölüm 2.2.5.2.1'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Sonuçlara göre çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 34'de gösterilmiştir. r^2 değeri 0.9986 olarak bulunmuştur.

3.5.2.2 Kesinlik Sonuçları

3.5.2.2.1 Tekrar Edilebilirlik Sonuçları

Bölüm 2.2.5.2.2.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Altı kez art arda enjeksiyon sonucu elde edilen alan değerleri Tablo 22’de gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı % 2’den az bulunmuştur.

Tablo 22 : NP’nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar edilebilirlik bulguları

Örnek No	Alan Değeri
1	444.941
2	442.412
3	444.174
4	444.178
5	445.091
6	445.085
ORT	444.3135
SP	1.024402
%VK	0.230558

3.5.2.2.2 Tekrar Elde Edilebilirlik Sonuçları

Bölüm 2.2.5.2.2.2’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Aynı konsantrasyonda altı farklı örneğin enjeksiyonu sonucu elde edilen alan değerleri Tablo 23’de gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı % 2’den az bulunmuştur.

Tablo 23 : NP'nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait tekrar elde edilebilirlik bulguları

Örnek No	Alan Değeri
1	448.822
2	448.892
3	447.512
4	446.589
5	449.582
6	450.009
ORT	448.567
SP	1.288
% VK	0.287

3.5.2.3 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik Sonuçları

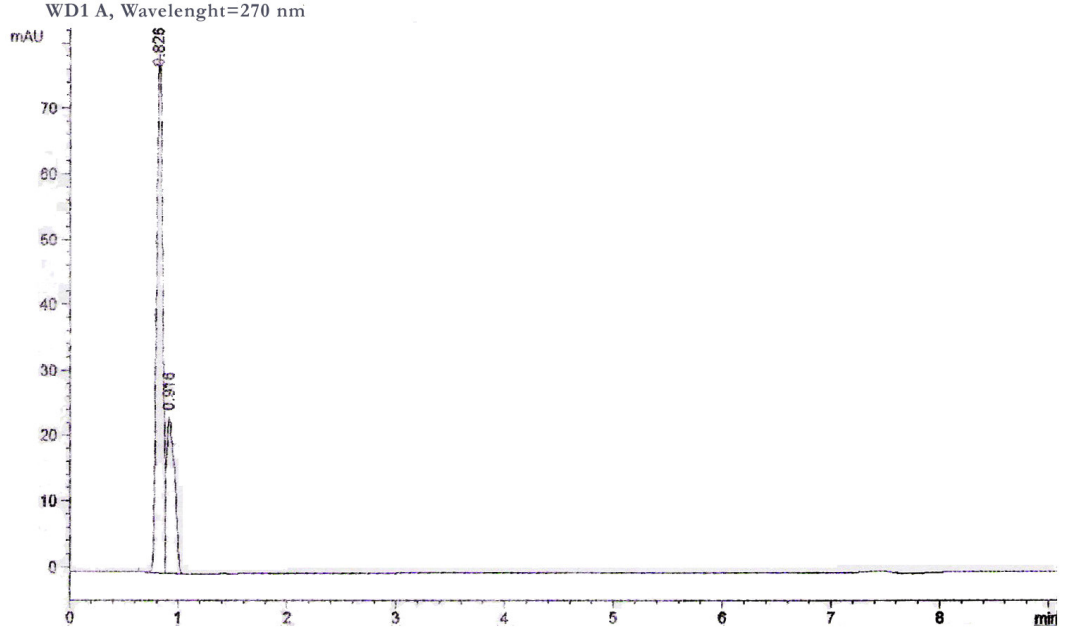
Bölüm 2.2.5.2.3'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Ortalama yüzde geri kazanım farkı $\pm$ % 10 aralığına girmektedir. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları Tablo 24'de gösterilmiştir.

Tablo 24 : NP'nin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları

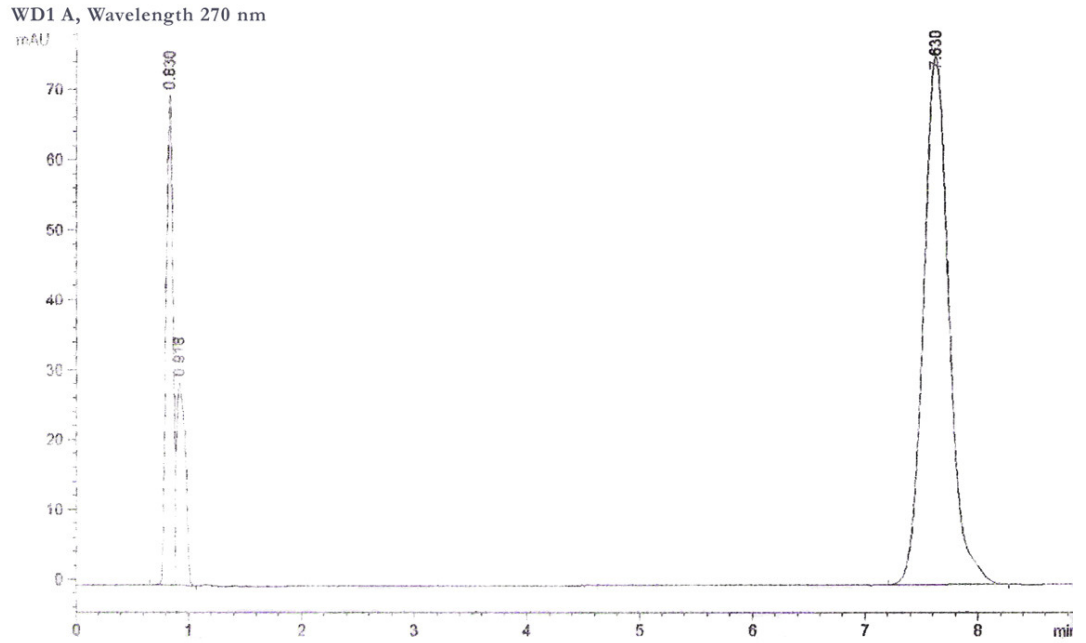
C (µg/ml)	Alan Değerleri	Bulunan C (µg/ml)	Geri Elde (%)
10	186.893	9.996	99.960
10	189.839	10.167	101.673
10	187.804	10.049	100.490
		ORT	100.707
		SP	0.876
		VK	0.870
50	873.774	49.930	99.861
50	875.215	50.014	100.029
50	877.003	50.118	100.237
		ORT	100.042
		SP	0.188
		VK	0.188
100	1748.992	100.815	100.815
100	1751.649	100.970	100.970
100	1752.437	101.016	101.016
		ORT	100.934
		SP	0.104
		VK	0.103

3.5.2.5 Özgünlük Tayini Sonuçları

Boş formülasyondan yapılan salım çalışması sonucunda etkin madde piki ile formülasyondaki maddelerin piklerinin çakışmadığı görülmüştür. Etkin madde yüklü ve etkin madde yüklü olmayan mikroemülsiyon formülasyonların verdikleri pikler Şekil 37ve Şekil 38’de gösterilmiştir.



Şekil 37 : Etkin madde yüklü olmayan mikroemülsiyon formülasyonun kromatogramı



Şekil 38 : Etkin madde yüklü mikroemülsiyon formülasyonun kromatogramı

3.5.2.5 LOD ve LOQ Sonuçları

Bölüm 2.2.5.2.5’de anlatıldığı üzere yapılan çalışmada LOD 0.158 µg/mL ve LOQ 0.844 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

3.5.3. Formülasyonlardan Ex-vivo Geçiş Çalışması Bulguları

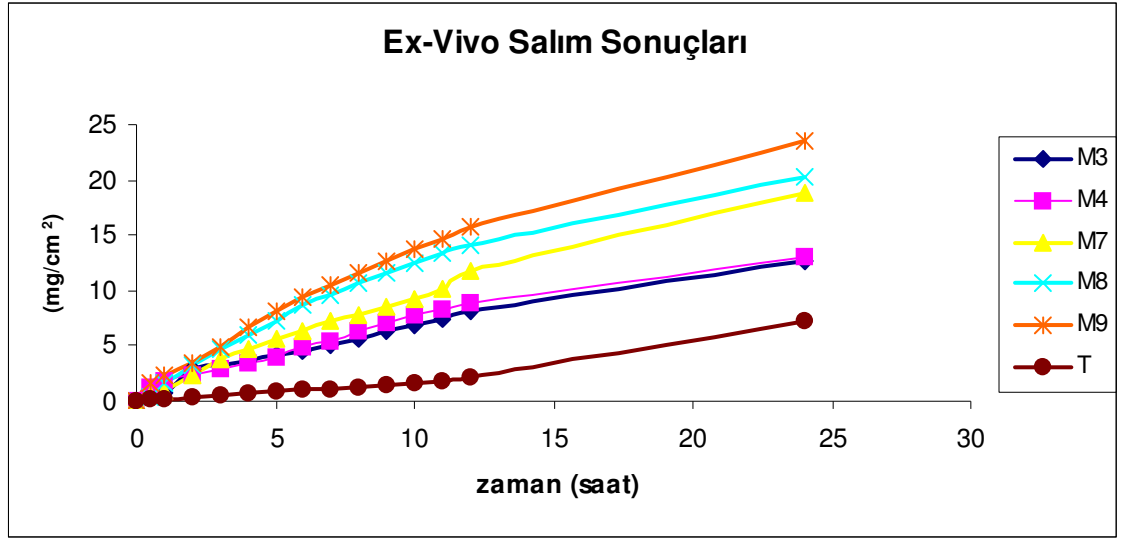
3.5.3.1 Mikroemülsiyon Formülasyonundan Ex-vivo Geçiş Çalışması

Geçiş çalışması bölüm 2.2.5.3’de anlatıldığı şekilde çalışılarak erkek sıçan karın derisinden geçişi Fick’in 1. yasasına göre Eşitlik 11, 12 ve 13 kullanılarak akış hızı, difüzyon katsayısı, gecikme zamanı ve geçirgenlik katsayısı hesaplandı. %10 konsantrasyonunda NP içeren M3 – M4 – M7 – M8 – M9 mikroemülsiyon formülasyonlarının ve ticari preparatının sıçan karın derisinden 24 saatlik difüzyon sonuçları Tablo 25’de ve Şekil 39’da verilmiştir. Tablo 25’ de elde edilen sonuçlar r^2 ve gecikme zamanı ve geçirgenlik katsayısı değerlerine göre yorumlandı (en yüksek r^2 ve geçirgenlik katsayısı değeri ve en düşük gecikme zamanını veren formülasyonlar). Değerlendirme sonucu seçilen S/Y tipi M8 ve Y/S tipi M9 formülasyonları ile antiinflamatuvar ve analjezik aktivite çalışmaları yapıldı.

Geliştirilen tüm mikroemülsiyon formülasyonları ve ticari preparat hesaplanan akış hızı, gecikme zamanı, difüzyon katsayısı ve 24. saatin sonunda difüze olabilen etkin madde miktarına göre karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0.05$), (Tablo 25).

Tablo 25 : NP içeren mikroemülsiyon ve ticari preparatının sıçan derisinden geçişine ait sonuçlar ve hesaplamalar

Mikroemülsiyon kodu	24 saat sonunda geçen NP miktarı (mg/ cm ²)	Jss (mg/ cm ² /h)	D*10 ⁻⁷ (cm ² /h)	r ²	N (gecikme zamanı)(saat)	Kp (geçirgenlik katsayısı)
M3	12.606±0.100	0.611±0.011	7.62±0.69	0.970±0.002	0.874±0.076	1.154±0.021
M4	13.043±2.927	0.700±0.163	9.74±2.83	0.977±0.002	0.684±0.176	1.322±0.308
M7	18.755±1.228	0.908±0.129	11.4±3.45	0.985±0.014	0.586±0.186	1.713±0.245
M8	21.524±0.074	1.279±0.007	7.69±1.75	0.988±0.563	0.699±0.047	2.414±0.018
M9	23.609±0.275	1.242±0.017	14.94±2.31	0.992±0.877	1.350±0.009	2.344±0.038
T	7.253±0.108	0.158±0.006	5.63±0.57	0.992±0.001	0.956±0.013	1.396±0.016



Şekil 39: : M3, M4, M7, M8, M9 ve ticari preparatına ait sıçan derisinden geçiş grafiği

3.6 Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerinin Belirlenmesi

M3, M4, M7, M8, M9 formülasyonlarına ait fizikokimyasal özellikler incelenmiş ve 6 ay süreyle 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C, 40 ± 2 °C’de stabilite çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir.

3.6.1 Mikroemülsiyonların Fiziksel Görünümü

Taze hazırlanmış ve % 10 NP içeren M3, M4, M7, M8, M9 mikroemülsiyon formülasyonlarının dış görünüşü incelendi ve mikroemülsiyon sisteminin saydam ve

homojen olduğu gözlenmiştir. Fiziksel görüntüsünde bir bulanıklık, faz ayrışması görülmemiştir.

3.6.2 Mikroemülsiyonların Tipi

Yöntem 2.2.7.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak taze hazırlanmış ve % 10 NP içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının M3, M4, M7 ve M8’in tipinin S/Y olduğu, M9’un ise Y/S olduğu belirlenmiştir.

3.6.3 Mikroemülsiyonların Santrifüj Sonrası Sonuçları

% 10 NP içeren mikroemülsiyon sistemlerinin tamamı 13000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından herhangi bir faz ayrışması olmadığı tespit edilmiştir.

3.6.4 Mikroemülsiyonların pH Ölçüm Sonuçları

Mikroemülsiyonun pH’sı oda sıcaklığında Inolab marka pH metre kullanılarak ölçüldü. Ölçüm sonuçları Tablo 26’da verilmiştir.

3.6.5 Mikroemülsiyonların Elektrik İletkenliği Ölçüm Sonuçları

Mikroemülsiyonunu elektrik iletkenliği, iletkenlik ölçer kullanılarak ölçüldü. Elektrik iletkenliği, μS olarak bulundu. Ölçüm sonuçları Tablo 26’da verilmiştir.

3.6.6 Mikroemülsiyonların Dansite Ölçüm Sonuçları

Mikroemülsiyon formülasyonları deneysel bölüm 2.6.6’da anlatıldığı gibi dansite ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 26’da verilmiştir.

3.6.7. Mikroemülsiyonların Refraktif İndisi Ölçüm Sonuçları

Mikroemülsiyon sistemlerinin refraktif indisi ölçümü Atago Illuminator marka refraktometre ile yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 26’da verilmiştir.

3.6.8 Mikroemülsiyonların Viskozite Ölçüm Sonuçları

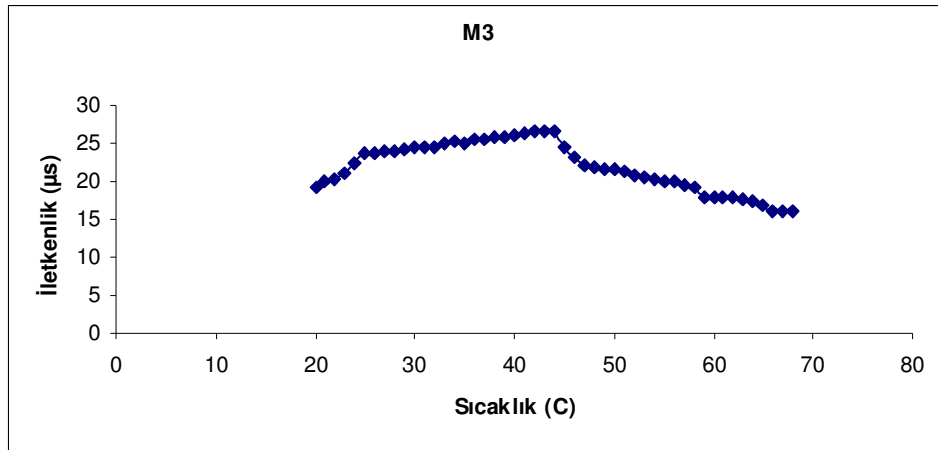
Seçilen mikroemülsiyonun viskozitesi 37 ± 1 °C’de Brookfield viskozimetresi ve ULA isimli spindle kullanılarak ölçüldü. Viskozite değeri Centipoise (cP) olarak bulundu. Ölçüm sonuçları Tablo 26’da verilmiştir.

Tablo 26 : Mikroemülsiyon formülasyonların elektrik iletkenliği, vizkozite, pH, refraktif indisi dansite ve faz değişim sıcaklığı ölçümüne ait veriler (t=0 anında)

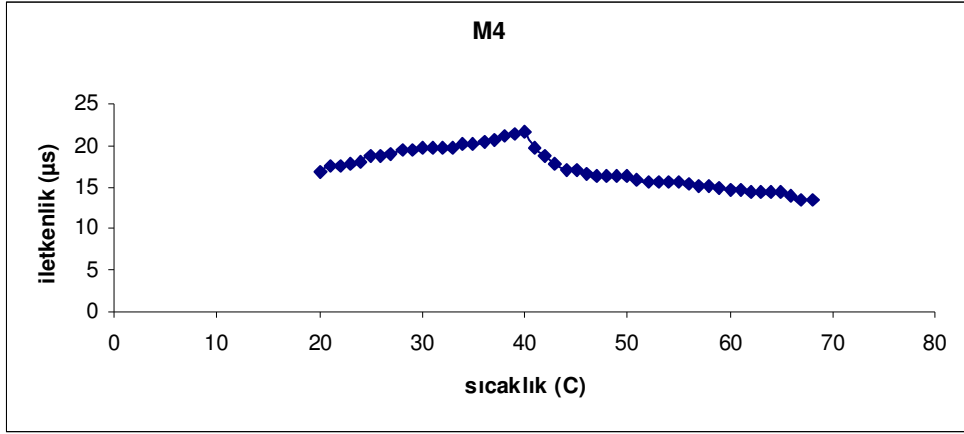
	Elektrik iletkenliği	Viskozite (cP)	pH	Refraktif indisi (nm)	Dansite (gr/mL)	Faz Değişim Sıcaklığı (°C)
M3	$23 \pm 0.05(\mu\text{s})$	13.33 ± 0.577	5.79 ± 0.01	1.405 ± 0.002	0.920 ± 0.010	44 ± 0.001
M4	$18.7 \pm 0.02(\mu\text{s})$	15 ± 1	4.97 ± 0.025	1.429 ± 0.006	0.917 ± 0.030	40 ± 0.020
M7	$147.9 \pm 1(\mu\text{s})$	14.33 ± 1.527	6.45 ± 0.05	1.385 ± 0.002	0.924 ± 0.012	38 ± 0.020
M8	$141.5 \pm 0.1(\mu\text{s})$	15.33 ± 0.577	6.39 ± 0.025	1.468 ± 0.002	0.922 ± 0.025	41 ± 0.006
M9	$0.51 \pm 0.01(\text{ms})$	10.33 ± 0.577	6.62 ± 0.020	1.413 ± 0.001	0.875 ± 0.010	61 ± 0.020

3.6.9 Mikroemülsiyonların Faz Değişim Sıcaklığı Sonuçları

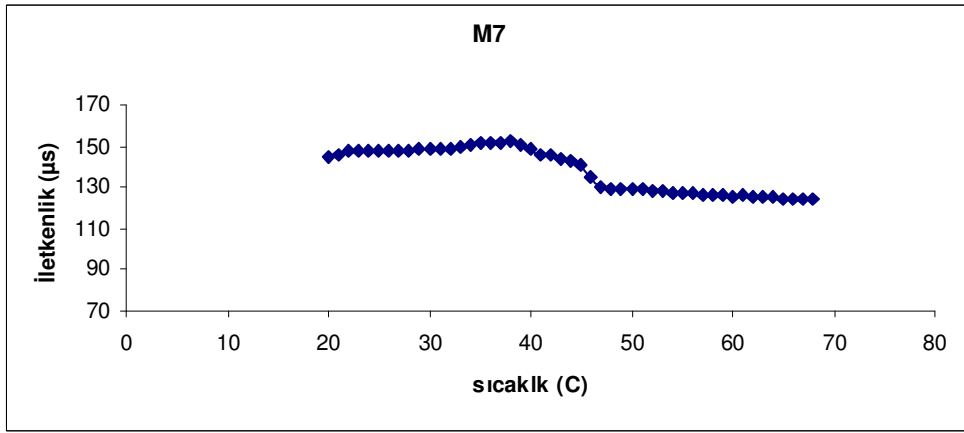
Mikroemülsiyon formülasyonların faz değişim sıcaklığı elektrik iletkenliği ölçen alet ile ölçülerek iletkenliğin azaldığı sıcaklık °C cinsinden belirlendi. Faz değişim sıcaklığı sonuçları Tablo 26’da verilmiştir. Bu formülasyonlara ait faz değişim grafikleri Şekil 40, Şekil 41, Şekil 42, Şekil 43ve Şekil 44’de verilmiştir.



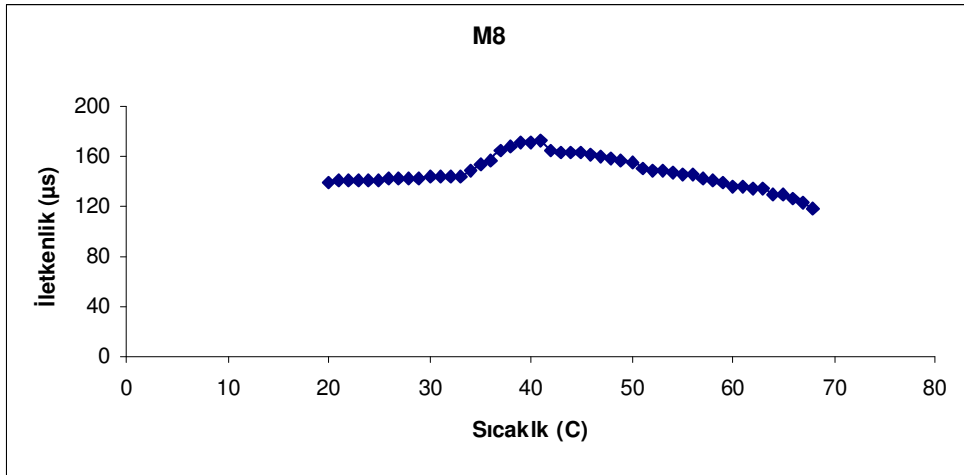
Şekil 40: M3 formülasyonunun faz değişim grafiği



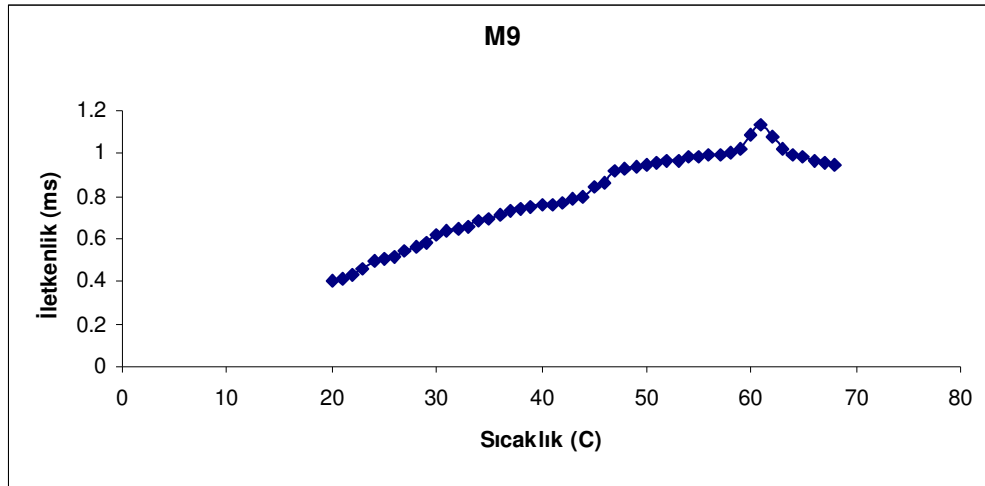
Şekil 41: M4 formülasyonunun faz değişim grafiği



Şekil 42: M7 formülasyonunun faz değişim grafiği



Şekil 43: M8 formülasyonunun faz değişim grafiği



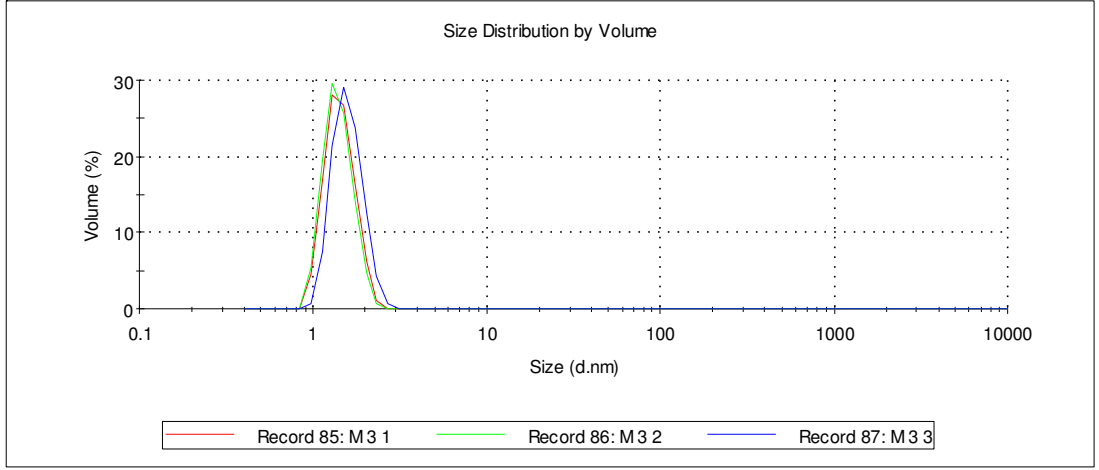
Şekil 44: M9 formülasyonunun faz değişim grafiği

3.6.10 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Damlacık Büyüklüğü Ölçüm Sonuçları

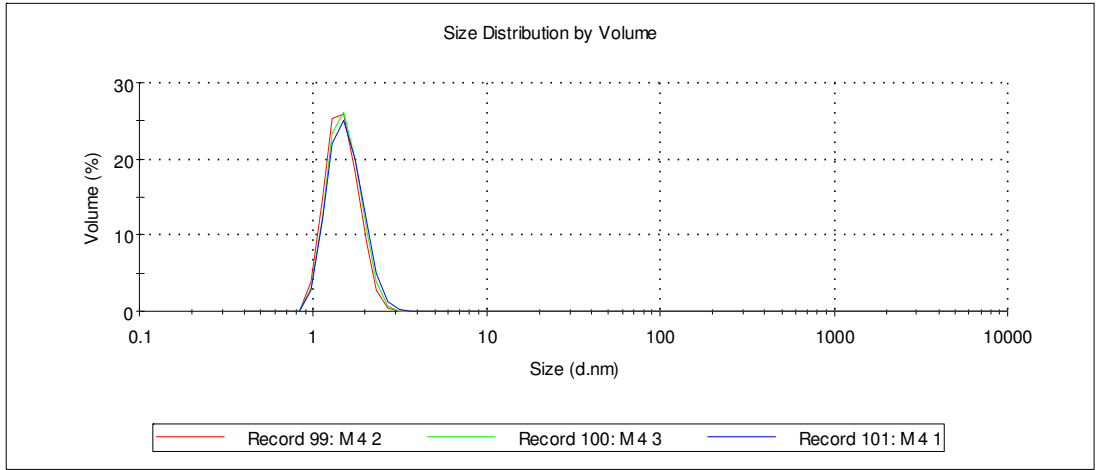
Optimum mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü deneysel bölüm 2.2.7.9 ‘da anlatıldığı gibi yapıldı. Ölçümü yapılan mikroemülsiyonlara ait, damlacık boyutu, polidispersite indeks, zeta-average değerleri Tablo 27’de verilmiştir. Bu formülasyonlara ait damlacık boyutu grafikleri Şekil 45, Şekil 46, Şekil 47, Şekil 48ve Şekil 49’da verilmiştir.

Tablo 27: M3-M4-M7-M8-M9 formülasyonlarının polidispersite indeksi, Z-average ve damlacık büyüklüğü değerleri

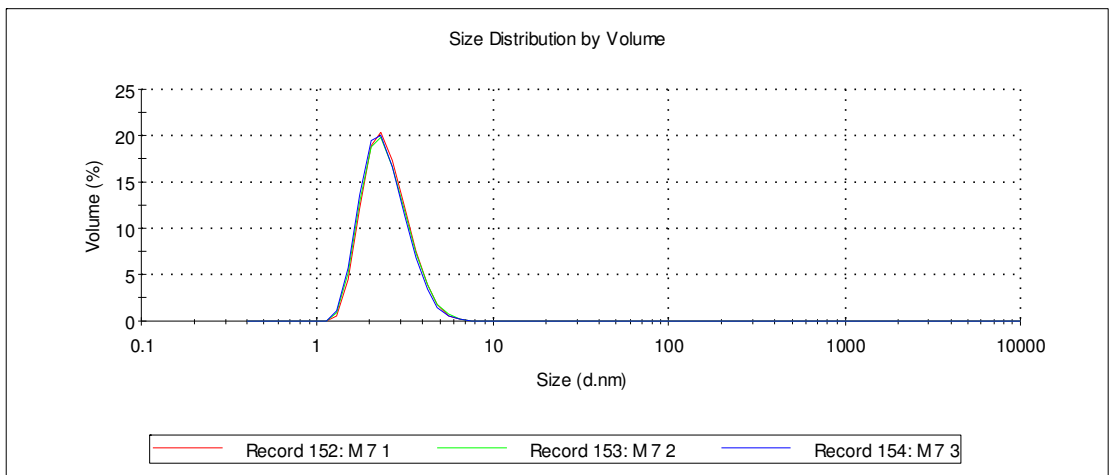
Mikroemülsiyon Kodu	Sıcaklık	Z-Average (d.nm)	PDI	Ortalama Damlacık Büyüklüğü (nm)
M3	25 °C	8.243 ± 6.807	0.396 ± 0.040	1.590 ± 0.114
M4	25 °C	7.057 ± 1.074	0.369 ± 0.029	1.701 ± 0.060
M7	25 °C	1.791 ± 0.062	0.479 ± 0.016	2.486 ± 0.064
M8	25 °C	17.40 ± 4.379	0.399 ± 0.043	1.405 ± 0.040
M9	25 °C	35.53 ± 4.271	0.471 ± 0.067	5.617 ± 0.199



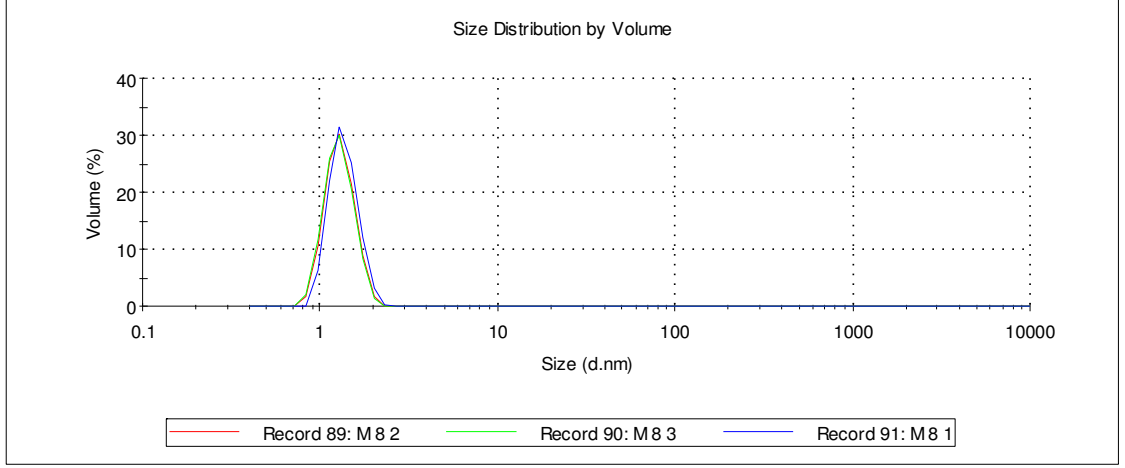
Şekil 45: M3'ün damlacık büyüklüğü grafiği



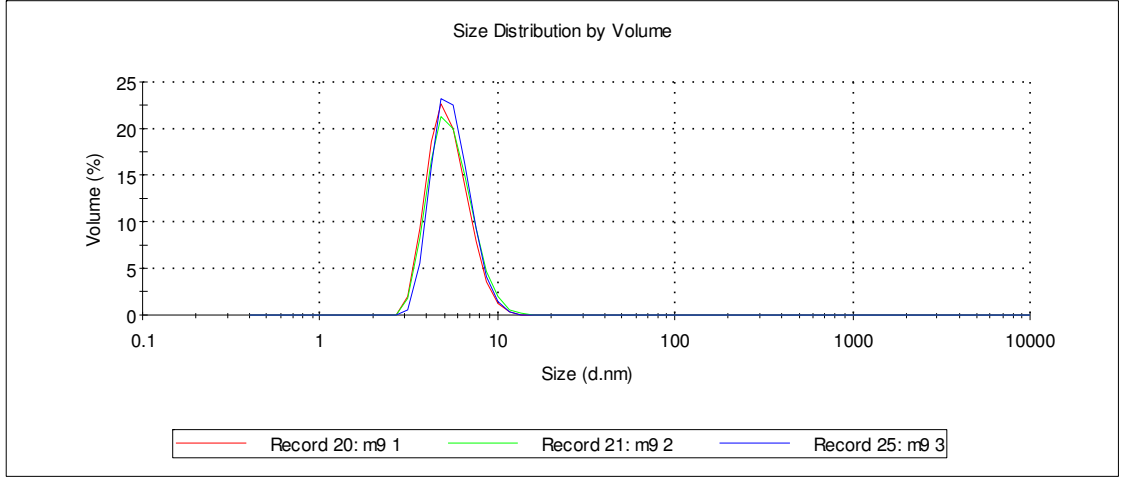
Şekil 46: M4'ün damlacık büyüklüğü grafiği



Şekil 47: M7'nin damlacık büyüklüğü grafiği



Şekil 48 : M8'in damlacık büyüklüğü grafiği



Şekil 49: M9'un damlacık büyüklüğü grafiği

3.6.11. Mikroemülsiyonun Stabilité Çalışmaları

M3, M4, M7, M8 ve M9 mikroemülsiyonların stabilitesinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları, $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de altı ay boyunca saklandı. Formülasyonlar fiziksel görünümü, bulanıklık ve faz ayrışması, elektrik iletkenliği, pH ve damlacık büyüklüğü gibi özellikleri başlangıçta, üçüncü ve altıncı aylarda incelendi. Başlangıçta ($t=0$ anında), üçüncü, altıncı aylarda üç sıcaklıkta da tüm formülasyonlarda fiziksel görünüş, bulanıklık ve faz ayrışması gözlenmedi. Fakat $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 'de tutulan tüm mikroemülsiyon formülasyonlarında etkin madde çökmesi görülmüştür. $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 'den oda sıcaklığına alındığında ise

mikroemülsiyonların tekrar eski haline döndükleri gözlenmiştir. Mikroemülsiyon formülasyonlarına ait stabilite sonuçları Tablo 28’de gösterilmiştir.

$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de altı ay boyunca stabilite çalışmasına alınan tüm formülasyonların stabil kaldığı gözlenmiştir. Tablo 26’de verilen elektrik iletkenliği, viskozite, pH, refraktif indis ve dansite değerlerinin 6. ayın sonunda değişmeden kaldığı gözlenmiştir (Tablo 28), ($P > 0.05$). Yine hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarında stabilite testi sonucu yapılan damlacık boyutu ölçümlerinde, mikroemülsiyonların damlacık boyutunun değişmediği gözlenmiştir (Tablo 27 ve Tablo 29).

Tablo 28 : Mikroemülsiyon formülasyonlarının stabilite sonuçları

		$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$40 \pm 2^{\circ}\text{C}$
		FG. FA B pH Eİ DB D	FG. FA B pH Eİ DB D	FG. FA B pH Eİ DB D
Başlangıç	M3	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M4	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M7	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M8	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M9	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
3. AY	M3	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M4	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M7	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M8	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M9	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
6. AY	M3	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M4	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M7	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M8	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	M9	+ + + + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + +

M; mikroemülsiyon, FG; fiziksel görünüm, FA; faz ayrışması, B; bulanıklık, pH; pH, Eİ; elektrik iletkenliği, DB; damlacık boyutu, D; dansite

3.7 İn-Vivo Çalışma Sonuçları

İn-vitro ve ex-vivo difüzyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre doğal ve sentetik membrandan en hızlı difüze olabilen M8 formülasyonu (S/Y) ile M9 (Y/S) mikroemülsiyon formülasyonları in-vivo çalışmalar için seçilmiştir.

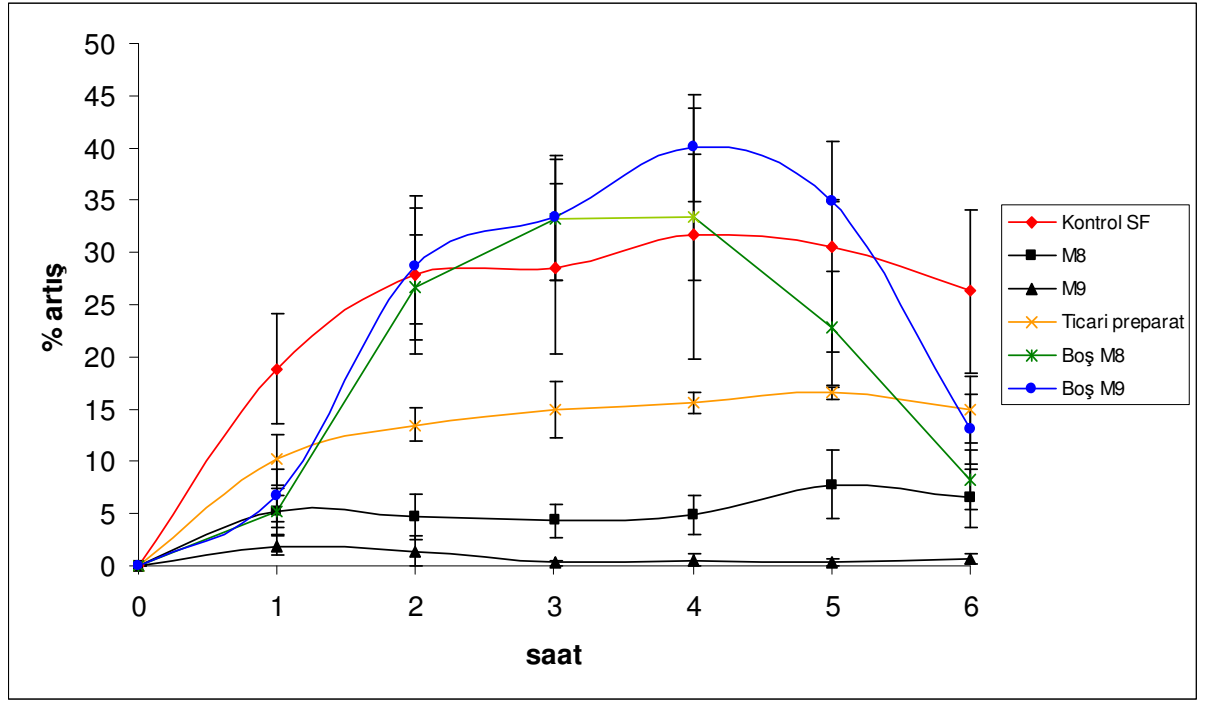
M8 ve M9 formülasyonları ile in-vivo çalışmalar deneysel bölüm 2.2.8’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.7.1 Antiinflamatuvar Aktivite Çalışmaları

Deneysel Bölüm 2.2.8.1’de belirtilen yöntem ile antiinflamatuvar aktivite ölçümleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, sol pençeye yapılan karagenin enjeksiyonuna bağlı olarak sıçanların sol pençelerinde ödem oluşmuştur (Şekil 50). Sağ pençeye SF enjekte edilmesinden sonra ise herhangi bir ödem oluşmadığı görülmüştür (Tablo 30). Çalışılan 6 grup arasından, negatif kontrol gruplarında (Grup SF, Boş M8, Boş M9) karagenin ile oluşan ödem engellenememiştir. Buna karşılık M9, M8 ve pozitif kontrol grubu (Ticari preparat) ödemi engellemişlerdir. En iyi ödem inhibisyonu M9 mikroemülsiyon formülasyonu ile belirlenmiştir (Şekil 50).

Tablo 29: Sağ pençe hacim ölçümü sonuçları

Gruplar	Hayvan no	0.saat (mL)	1.saat (mL)	2.saat (mL)	3.saat (mL)	4.saat (mL)	5.saat (mL)	6.saat (mL)
Kontrol	1	0.74	0.84	0.94	0.98	0.80	0.72	0.78
	2	0.88	0.82	0.90	0.74	0.68	0.82	0.86
	3	0.74	0.66	0.80	0.72	0.62	0.70	0.78
	4	0.86	0.80	0.82	0.88	0.72	0.86	0.84
	5	0.74	0.92	0.74	0.78	0.84	0.84	0.86
	6	0.80	0.80	0.84	0.84	0.76	0.74	0.82
	7	0.82	0.86	0.8	0.86	0.76	0.8	0.82
Boş M8	1	0.98	0.96	0.98	0.90	0.9	0.92	0.96
	2	0.94	0.98	0.96	0.94	0.92	0.94	0.98
	3	0.96	0.94	0.96	0.94	0.96	0.96	0.88
	4	0.86	0.88	0.84	0.86	0.88	0.90	0.92
	5	0.68	0.68	0.72	0.68	0.70	0.68	0.72
	6	0.84	0.86	0.84	0.86	0.84	0.90	0.82
	7	0.78	0.78	0.76	0.78	0.78	0.80	0.82
Boş M9	1	0.94	0.94	0.96	0.94	0.98	0.94	0.96
	2	1.00	0.96	0.98	0.98	0.96	1.00	1.02
	3	0.90	0.88	0.86	0.90	0.92	0.90	0.92
	4	0.88	0.86	0.86	0.88	0.90	0.86	0.92
	5	0.80	0.82	0.80	0.82	0.84	0.82	0.80
	6	0.96	1.00	0.98	0.94	0.96	0.94	0.92
	7	0.94	0.94	0.92	0.94	0.96	0.96	0.92
Ticari Preparat	1	0.96	1.04	1.00	0.90	0.84	1.04	0.86
	2	0.70	0.62	0.60	0.60	0.64	0.68	0.68
	3	0.60	0.68	0.76	0.72	0.70	0.72	0.72
	4	0.86	0.92	0.84	0.78	0.88	0.74	0.74
	5	0.78	0.76	0.76	0.68	0.66	0.62	0.76
	6	0.82	0.90	0.90	0.82	0.92	0.72	0.72
	7	0.84	0.82	0.84	0.80	0.78	0.84	0.84
M8	1	0.84	0.84	0.92	0.90	0.94	0.90	0.90
	2	0.60	0.64	0.70	0.62	0.68	0.76	0.54
	3	0.62	0.60	0.70	0.72	0.6	0.64	0.70
	4	0.78	0.80	0.80	0.80	0.84	0.82	0.82
	5	0.94	0.86	0.88	0.92	0.98	0.98	0.96
	6	0.86	0.78	0.80	0.96	0.80	0.88	0.92
	7	0.74	0.74	0.78	0.78	0.82	0.82	0.74
M9	1	0.90	0.88	0.84	0.74	0.78	0.94	0.90
	2	0.94	0.96	1.00	1.04	1.00	1.02	1.00
	3	1.14	1.16	0.98	1.04	1.00	1.12	0.96
	4	0.82	0.84	0.84	0.84	0.78	0.78	0.92
	5	0.84	0.78	0.76	0.74	0.66	0.72	0.74
	6	0.78	0.80	0.84	0.82	0.84	0.82	0.8
	7	0.86	0.80	0.84	0.84	0.90	0.82	0.88



Şekil 50 : Antiinflatuvar aktivite sonuçları

1., 2. ve 3. saatlerde M8, M9 ve Ticari preparat, Kontrol SF' ye karşı istatistiksel açıdan önemli fark göstermektedir. 4., 5. ve 6. saatlerde ise yalnızca M8 ve M9 da kontrole göre istatistiksel açıdan önemli fark ortaya çıkmaktadır ($p < 0.05$ seviyesinde). M8, 2., 3. ve 4. saatlerde Boş M8' e karşı, M9, 2.,3.,4. ve 5. saatlerde Boş M9' a karşı istatistiksel açıdan önemli fark göstermektedir ($p < 0.05$ seviyesinde).

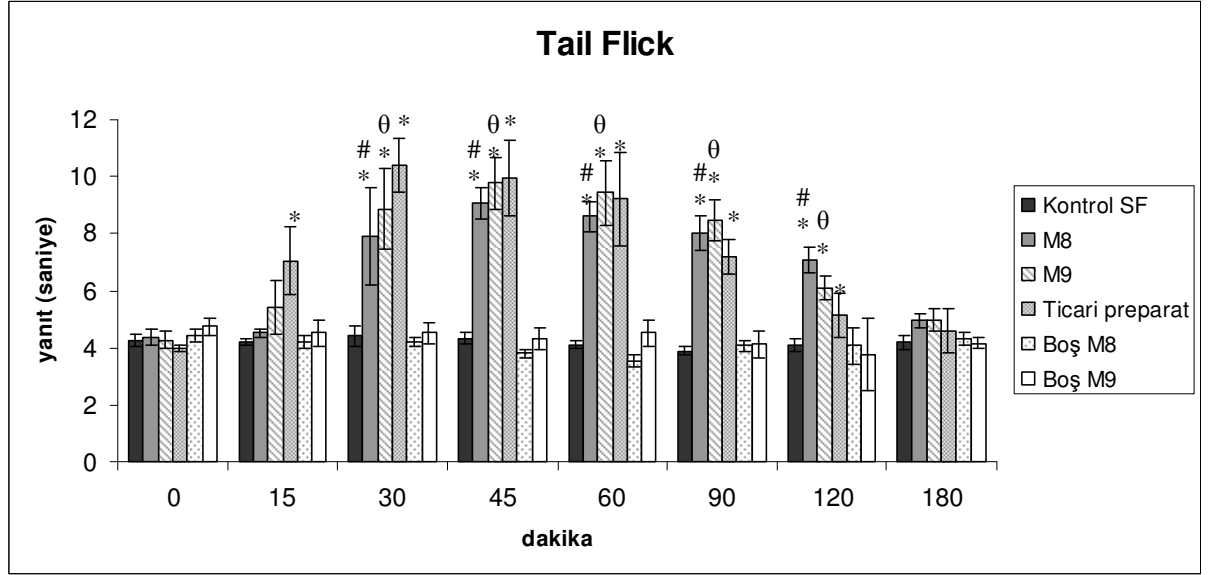
3.7.2 Analjezik Aktivite Çalışmaları

DeneySEL Bölüm 2.2.8.2'de belirtilen yöntem ile analjezik aktivite çalışmaları yapılmıştır.

3.7.2.1 Tail Flick Çalışmaları

Yapılan çalışmalar sonucunda, 6 gruptan, negatif kontrol gruplarında (Kontrol SF, Boş M8, Boş M9 uygulanan sıçanlarda) latens süresi en düşük olarak belirlenmiştir. M9 mikroemülsiyon formülasyonu, M8 mikroemülsiyon formülasyonu ve Ticari preparat gruplarında latens süresinin uzadığı tespit edilmiştir (Şekil 51).

M8, M9 ve ticari praparar ile elde edilen latens süreleri, SF, Boş M8 ve Boş M9 uygulanan gruplardan (kontrol gruplarından) belirgin olarak farklı olup ($P < 0.05$) formülasyonların kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği belirlenmemiştir ($P > 0.05$) (Şekil 51).



* Kontrol SF' ye göre $p < 0.05$ seviyede istatistiksel açıdan önemli fark
 # Boş M8' e göre $p < 0.05$ seviyede istatistiksel açıdan önemli fark
 θ Boş M9' a göre $p < 0.05$ seviyede istatistiksel açıdan önemli fark

Şekil 51: Tail flick çalışması sonucu

3.7.2.2 Hot Plate Çalışmaları

Yapılan çalışmalar sonucunda, negatif kontrol gruplarında (Kontrol SF, Boş M8, Boş M9 uygulanan sıçanlarda) reaksiyon süresi düşük olarak belirlenmiştir. M9, M8 formülasyonları ve ticari preparat grubunda reaksiyon süresi uzamıştır (Tablo 30).

M8, M9 ve ticari praparar ile elde edilen latens süreleri, SF çözeltisi uygulanan gruptan (kontrol grubundan) belirgin olarak farklı olup ($P < 0.05$) formülasyonların kendi aralarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($P > 0.05$) (Tablo 30).

Tablo 30: Hot plate sonuçları

Gruplar	Dakika							
	0	15	30	45	60	90	120	180
Kontrol SF (sn)	4.85±0.15	4.75±0.22	4.90±0.24	4.85±0.18	4.70±0.22	4.40±0.15	4.57±0.14	4.34±0.14
M8 (sn)	4.71±0.28	5.08±0.23	8.41±0.72 *#	9.28±0.44 *#	8.87±0.43 *#	7.41±0.35 *#	6.52±0.28 *#	5.34±0.22 *
M9 (sn)	4.55±0.31	5.02±0.29	8.31±0.70 *θ	9.55±0.45 *θ	9.54±0.42 *θ	8.28±0.37 *θ	6.91±0.32 *θ	5.81±0.39 *θ
Ticari Preparat (sn)	4.41±0.24	8.35±0.85 *	9.38±0.38 *	8.88±0.70 *	9.02±0.59 *	8.54±0.73 *	5.62±0.25 *	4.87±0.19
Boş M8 (sn)	4.85±0.42	4.71±0.32	4.68±0.40	4.75±0.37	4.51±0.37	4.51±0.41	4.48±0.39	4.52±0.42
Boş M9 (sn)	4.54±0.25	4.34±0.21	4.28±0.29	4.34±0.17	4.35±0.22	3.94±0.22	3.94±0.24	3.92±0.20

* Kontrol SF' ye göre $p < 0.05$ seviyede istatistiksel açıdan önemli fark

Boş M8' e göre $p < 0.05$ seviyede istatistiksel açıdan önemli fark

θ Boş M9' a göre $p < 0.05$ seviyede istatistiksel açıdan önemli fark

3.8 İstatistiksel Çalışma Sonuçları

Mikroemülsiyon formülasyonlarından ve ticari preparattan elde edilen in-vitro, ex-vivo, in-vivo sonuçlar tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (21, 63, 64, 75, 101, 116, 117). Değerlendirmeler sonucunda; istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenen gruplarda $P < 0.05$ ifadesi kullanılmıştır. Anlamlı fark belirlenmeyen gruplarda ise $P > 0.05$ ifadesi kullanılmıştır.

İn-vitro çalışmalarda M3, M4, M7, M8 ve M9 formülasyonları ticari preparata göre ilk 12 saatlik bir dilimde anlamlı bir fark göstermemiştir ($P > 0.05$) (Şekil 34). Fakat 24. saatin sonunda difüze olabilen etkin madde miktarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0.05$). Ex-vivo çalışmalarda ise M3, M4, M7, M8 ve M9 formülasyonlarının ticari preparata göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği tespit edilmiştir ($P < 0.05$) (Şekil 39).

İn-vivo çalışmalarda, geliştirdiğimiz M8 ve M9 formülasyonlarının antiinflamatuvar etkisi ticari preparata göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($P < 0.05$) (Şekil 50). Analjezik etki çalışmaları olan tail flick ve hot plate çalışmalarında ise, M8 ve M9 grupları ticari preparata göre anlamlı bir fark göstermezken ($P > 0.05$), M8, M9 ve Ticari preparat grupları; kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermiştir ($P < 0.05$) (Şekil 51, Tablo 30).

BÖLÜM IV

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Genel Değerlendirme

Genel bir değerlendirme yapacak olursak, çalışmaya başlarken amacımız model etkin madde olarak seçtiğimiz NP'nin transdermal yol ile kullanılabilen S/Y ve Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarını geliştirmek ve geliştirilen bu formülasyonlar ile NP nin ticari preparatını in vitro, ex vivo ve in vivo ortamlarda karşılaştırmaktır. NP'yi mikroemülsiyon ilaç şekli halinde sunmak istememizin nedeni, mikroemülsiyonların termodinamik olarak dayanıklı, transparan, ilaç hedeflemesine uygun, kendiliğinden oluşan sistemler olmalarından ve çözünürlüğü az olan maddelerin çözünürlüğünü arttırmalarından dolayıdır (5, 6, 30, 31, 74, 112, 118, 119).

NP nonstreoidal anti-inflamatuvar bir ilaçtır. Güçlü antiinflamatuvar ve analjezik aktiviteye sahip olduğu için inflamasyonda ve romatizmal hastalıkların tedavisinde oral, rektal ve topikal yoldan kullanılmaktadır. Diğer NSAİİ'lar gibi oral yolla NP kullanıldığında gastrointestinal mukozanın ülserasyon ve irritasyonu gibi yan etkilerinden dolayı kullanımında sınırlama bulunmaktadır. Bu nedenle oral yolla kullanım sonrası gelişen bu dezavantajlarından dolayı topikal olarak da kullanılması önerilmektedir. Biz çalışmamızda oral kullanıma alternatif olabilecek transdermal yoldan kullanılabilen bir formülasyon geliştirmeyi düşündük (115). Formülasyonumuzu transdermal yoldan vermeyi seçmemizin nedeni; transdermal yolun uygulama kolaylığı, gastrointestinal yan etkilerinin ve ilk geçiş etkisinin olmaması açısından oral ve diğer yollara göre bir avantaj taşımasıdır (1, 21, 29, 37, 97, 119). Ayrıca yapılan literatür taramalarında, transdermal yol ile kullanılabilen, NP içeren bir mikroemülsiyon formülasyonuna rastlanmamıştır.

Etkin maddelerin transdermal yolla uygulanmasında transdermal geçişi ve transdermal absorpsiyonunu arttırmak amacıyla derinin mükemmel bariyer yapısını aşmak için, güvenli ve etkili deriden geçişi arttıran maddelere ihtiyaç vardır (21, 26, 63, 64, 90, 107). Deriden geçişi arttıran bu maddelerden bazıları, mikroemülsiyonların oluşum formülasyonlarında kullanılmakta ve etkin maddelerin deriden geçişini arttırılabilmektedir. Bunun yanı sıra mikroemülsiyonların viskozitesinin düşük olmalarından dolayı deriden geçişleri diğer formülasyonlara göre daha kolaydır ve bu nedenle mikroemülsiyonlar doğal deriden geçişi arttırıcı madde olarak görev yapmaktadırlar (31, 44, 69).

Mikroemülsiyonların terkinbinde yer alan lipofilik maddelerin deriye uygulanması, stratum korneumda depo görevi yapmasını sağlamaktadır. Bu nedenle mikroemülsiyonlar lipofilik yapıdaki derinin en dış tabakasına yüksek afinite gösterip bağlanmaktadırlar. Bununla birlikte stratum korneum hidrofilik yapıdaki ilaçların deriden geçişine engel olmaktadır. Mikroemülsiyonların terkinbinde yer alan YEM ler hem hidrofilik hemde lipofilik bölgelere sahip olduklarından dolayı bu bariyerlerin geçilmesine yardımcı olurlar (74, 88). Bunun sonucunda mikroemülsiyonların stratum korneumu hücreler arası yol ile geçebildiği, ayrıca buna alternatif olarak boynuzsu tabakanın hidrasyonu ile de etkin maddelerin geçişini arttırdıkları bilinmektedir. Tüm bahsettiğimiz bu nedenlerden dolayı mikroemülsiyonlar dermal ve transdermal yoldan etkin maddelerin verilesi için tercih edilmektedir (25, 55).

4.2 NP'nin Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu amaçla ilk olarak NP'nin fizikokimyasal özellikleri belirlenmeye çalışıldı ve literatürle uyumu araştırılmıştır. Bu doğrultuda NP'nin UV ve IR spektrumları çekilmiştir. En yüksek absorbands değerini 263 nm'de verdiği görülmüştür. IR

spektrumunda elde edilen pikler ve saptanan dalga boyu literatürlerle uyumlu bulunmuştur (27). NP'nin erime derecesi tayini yapılmış ve erime derecesi $156 \pm 1^\circ\text{C}$ olarak bulunmuştur. Bu değer de literatürler de belirtilen değerlerle uyumludur (12, 27, 109). Bunun yanında NP'nin lipid/su partisyon katsayısı tayini yapılmıştır. Yapılan deney sonucunda NP'nin $\log K_{\text{yağ/su}}$ değeri 3.18'olarak hesaplanmıştır. Bu değer de literatür ile uyum içindedir (46).

4.3 Kullanılacak Yardımcı maddelerin Seçimi ve Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Deriden etkin maddelerin geçişi, uygulanan formülasyon ile yakından ilgilidir. Öncelikle etkin maddenin verildiği formülasyondan salınması gerekmektedir. Ayrıca formülasyonda kullanılan maddelerin penetrasyon arttırıcı özelliğe sahip olmaları da önemli bir avantajdır. Bu nedenle yağ fazı olarak izopropopil miristat seçilmiştir ve literatürlerde de belirtildiği gibi İPM deriden geçişi arttıran maddeler arasında yer almaktadır (37, 46). Formülasyonlarımızın geliştirilmesi sırasında farklı HLB değerine sahip noniyonik değişik YEM'ler kullanılmıştır (Cremophor EL, Span 80, Labrafil M, Labrasol). Bilindiği gibi YEM lerden alkil zincir uzunluğu C12-C18 arasında olanlar ile 6-10 etilen oksit içerenler en iyi penetrasyon özelliği göstermektedir (118). YYEM olarak etanol (absolü etanol) ve İPA seçilmiştir, çünkü deriye uygulandığında deriden geçişi arttırıcı (enhancer) bir madde olarak görev yaptığı bilinmektedir (17, 115). NP bilindiği üzere lipid çözünür bir maddedir, pratik anlamda düşük pH'ya (pH 4'ten düşük) sahiptir ve suda çözünmez. pH seviyesi 6 veya daha yüksek olan suda çözünebilir (27, 109). Ayrıca NP nin etanoldeki ve diğer alkollerdeki çözünürlüğünün yüksek olması (27, 28) geliştirdiğimiz formülasyonlarda etkin maddemizin tamamen çözünmesine yardımcı olmuştur. Geliştirdiğimiz M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 formülasyonlarında YYEM olarak etanolü kullandık, M9 formülasyonunda ise, İPA kullanılmıştır.

Mikroemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi sırasında öncelikle su fazı olarak distile su kullanılmıştır. Bu formülasyonlar M1, M2, M3, M4 kodlu formülasyonlardır. M5, M6, M7, M8, M9 kodlu formülasyonlarda ise su fazı olarak 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Bilindiği üzere NP zayıf asidik bir etkin maddedir (pKa 4.2) ve bu nedenle alkali pH daki çözünürlüğü asidik pH ya göre daha yüksektir (28). FDA NP nin pH 6 daki çözünürlüğü 1.8 mg/mL, pH 6.9 daki çözünürlüğünü 5.3 mg/mL olarak bildirmiştir (58). Bu nedenle, amacımız NP'nin çözünürlüğünü artırmak için kullanılan YYEM olan etanole ve İPA'ye yardımcı olacak diğer bir çözücü de formülasyonlarda kullanmaktır. M1 ile M5, M4 ile M6, M3 ile M7 ve M4 ile M8 formülasyonların da aynı yağ, YEM ve YYEM ve aynı HLB değeri kullanılarak hazırlanmıştır. Bununla birlikte aralarındaki tek fark kullanılan su fazıdır (Tablo 19). M5, M6, M7, M8 formülasyonlarında su fazı olarak 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Bu formülasyonların geliştirilmesi esnasında çizilen üçgen faz diyagramlarında hem daha büyük bir mikroemülsiyon alanı elde edildiği (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13) hem de etkin maddenin hızla çözündüğü gözlenmiştir. En yüksek alanı veren M9 formülasyonunda da su fazı olarak 0.5 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır ve bu formülasyonda dış faz sudur. Ayrıca bu formülasyonda YYEM olarak İPA kullanılmıştır çünkü etanol kullanılarak geliştirmeye çalıştığımız mikroemülsiyon formülasyonları başarısız olmuştur. Geliştirilen tüm mikroemülsiyon formülasyonları %10 oranında NP içermektedir.

Çalışmamızın bundan sonraki aşamasında ise, geliştirdiğimiz formülasyonlardan ve ticari preparattan miktar tayini yapabilmek için pH 7.4 fosfat tamponu kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Çizilen standart eğriye ait

denklem ($Y = 0.0449X - 0.0029$) etkin maddenin miktar tayininde güvenle kullanılabileceğini $r^2 = 0.9993$ olması nedeniyle göstermiştir.

Daha sonra ise, sıçan derisinden NP'nin geçişini incelemek amacıyla 0.2 µm çapında membrandan filtre edilmiş ve degaze edilmiş bidistile su, asetonitril ve metanol karışımı (52 / 28 / 20) ve 0.4 ml trietanolamin ve ortofosforik asit ile pH 3.2'ye ayarlanmış (125) mobil faz kullanılarak HPLC de kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Çizilen kalibrasyon eğrisine ait denklem ($Y = 17.2X - 14.961$) etkin maddenin miktar tayininde güvenle kullanılabileceğini $r^2 = 0.998$ olması nedeniyle gösterilmiştir.

4.4 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve Ticari Preparatın Sentetik ve Doğal Membrandan Geçiş Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Difüzyon hücresi kullanılarak in vitro ortamda etkin maddenin nitro selüloz membrandan ve selüloz membrandan (sentetik membran) geçişi, ex-vivo ortamda ise; erkek sıçan karın derisinden (doğal membran) etkin maddenin geçişinin araştırıldığı çalışmalarda resöptör faz olarak pH 7.4 fosfat tamponunu seçilmiştir. Yapılan literatürler araştırmalarında da transdermal çalışmalarda resöptör faz olarak pH 7.4 fosfat tamponu seçildiği görülmüştür. (35, 44, 63, 64, 87, 101).

NP' nin ticari preparatından ve geliştirdiğimiz formülasyonlardan in-vitro ortamda önce nitro selüloz membrandan geçişini incelendik. Elde ettiğimiz sonuçları r^2 ve difüzyon katsayısına göre değerlendirdiğimizde (Tablo 20) M3, M4, M7, M8 formülasyonları M1, M2, M5, M6 formülasyonlarına göre nitro selüloz membrandan daha iyi difüze olmuşlardır. Bundan sonraki aşamada ise seçilen bu formülasyonlar ile NP nin selüloz membrandan geçiş çalışması yapılmıştır. 24 saat sonunda, selüloz membrandan geçen NP miktarı, M3 formülasyonunda 35.308 ± 0.354 mg/cm², M4 formülasyonunda 36.465 ± 0.403 mg/cm², M7 formülasyonunda 38.977 ± 0.868

mg/cm², M8 formülasyonunda 40.598±0.318 mg/cm² ve M9 formülasyonunda ise 38.039±0.401 mg/cm² olarak, ticari preparattan ise (T) 30.477±0.405 mg/cm² olarak bulunmuştur. Gecikme zamanları ise; M3 formülasyonunda 2.292 ± 0.260, M4 formülasyonunda 1.754 ± 0.103, M7 formülasyonunda 1.758 ± 0.199, M8 formülasyonunda 2.254 ± 0.065, M9 formülasyonunda 2.080 ± 0.095 ve ticari preparatta ise 2.118 ± 0.164 olarak bulunmuştur (Tablo 21). Sonuç olarak geliştirilen M3, M4, M7, M8 ve M9 formülasyonları selüloz membrandan piyasa preparatına göre daha iyi geçiş göstermiştir. Ayrıca bu formülasyonlar ile (M3, M4, M7, M8 ve M9) ticari preparatın ex-vivo ortamda sıçan karın derisinden yapılan geçiş çalışmaları karşılaştırılmıştır (Tablo 25). 24 saat sonunda sıçan karın derisinden geçen NP miktarı M3 formülasyonunda 12.606±0.100 mg/cm², M4 formülasyonunda 13.043±2.927 mg/cm², M7 formülasyonunda 18.775±1.228 mg/cm², M8 formülasyonunda 21.524±0.074 mg/cm², M9 formülasyonunda 23.609±0.275 mg/cm² ve T preparatta 7.253±0.108 mg/cm² olarak bulunmuştur. Gecikme zamanları ise; M3 formülasyonunda 0.874 ± 0.076, M4 formülasyonunda 0.684 ± 0.176, M7 formülasyonunda 0.586 ± 0.186, M8 formülasyonunda 0.699 ± 0.047, M9 formülasyonunda 1.350 ± 0.009 ve ticari preparatta ise 0.956 ± 0.013 olarak bulunmuştur (Tablo 25, Şekil 39). Mikroemülsiyon formülasyonlarından ve ticari preparattan elde edilen in-vitro ve ex-vivo sonuçlar tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (21, 64, 75, 101, 116, 117). İn-vitro çalışmalarda M3, M4, M7, M8 ve M9 formülasyonları ticari preparata göre ilk 12 saatlik bir zaman diliminde anlamlı bir fark göstermemiştir (P > 0.05). Fakat 24. saatin sonunda difüze olabilen etkin madde miktarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir (P < 0.05). Ex-vivo çalışmalarda ise

M3, M4, M7, M8 ve M9 formülasyonları ticari preparata göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

4.5 Formülasyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Taze olarak hazırlanan mikroemülsiyonlar üzerinde görünüş, tip, iletkenlik, pH, santrifüj, refraktif indisi, damlacık boyutu dağılımı ve viskozite değerleri incelenmiştir. M3, M4, M7, M8 formülasyonlarının tipi S/Y, M9 formülasyonları Y/S tipinde bulunmuştur. M3 formülasyonunun elektrik iletkenliği 13.33 μ s, viskozitesi 13,33 cP, pH'ı 5.79, refraktif indisi 1.405, dansitesi 0.920; M4 formülasyonunun elektrik iletkenliği 18.7 μ s, viskozitesi 15 cP, pH'ı 4.97, refraktif indisi 1.429, dansitesi 0.917; M7 formülasyonunun elektrik iletkenliği 147.9 μ s, viskozitesi 14,33 cP, pH'ı 6.45, refraktif indisi 1.385, dansitesi 0.924; M8 formülasyonunun elektrik iletkenliği 141.5 μ s, viskozitesi 15,33 cP, pH'ı 6.39, refraktif indisi 1.468, dansitesi 0.922; M9 formülasyonunun elektrik iletkenliği 0.51 ms, viskozitesi 10,33 cP, pH'ı 6.62, refraktif indisi 1.413, dansitesi 0.875 tespit edilmiştir (Tablo 26). Literatür verileri ışığında elde edilen formülasyonların transdermal yol ile kullanıma uygun oldukları göstermiştir (60, 81, 127).

Geliştirilen M3, M4, M7, M8 ve M9 formülasyonları $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 6 ay süreyle stabilite testine tabi tutulmuştur. 6 aylık stabilite sonuçlarına göre tüm formülasyonların dış görünüşü, dansite, elektirik iletkenliği, pH ve damlacık boyutunda başlangıç değerlerine göre herhangi bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir (Tablo 27) ($P > 0.05$).

4.6 İn-Vivo Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İn-vitro, ex-vivo geçiş çalışmaları sonucunda en iyi difüze olabilen S/Y tipinde olan M8 formülasyonu ile Y/S tipinde olan M9 mikroemülsiyon formülasyonları in-vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Antiinflamatuvar etki çalışması için, Wistar albino sıçanlarda (200-300g) pençe ödem testi yapılmıştır (20, 51, 116, 117). Yapılan çalışma sonucunda M9 ve M8 mikroemülsiyon formülasyonları uygulanan sıçanlarda karagenin ile oluşturulan pençe ödemi ticari preparata göre belirgin olarak düşük düzeyde oluşmuştur. Geliştiren formülasyonlar içersinde en iyi pençe ödemi inhibisyonu M9 formülasyonu ile sağlanmıştır (Şekil 50). SF ve etkin madde içermeyen formülasyon uygulanan sıçanlarda ise, pençe ödemi inhibisyonu belirlenememiştir. M8 ve M9 mikroemülsiyon formülasyonlarının uygulama sonuçlarının ticari preparattan iyi olması, antiinflamatuvar etkinin bu formülasyonlar ile daha belirgin olduğunu göstermektedir. Jel tip (ticari) formülasyonlardan, etkin maddenin daha yavaş difüze olması ve deriden geçen etkin madde miktarının mikroemülsiyon formülasyonlarına göre düşük olması mikroemülsiyonların jel tipi formülasyonlara göre üstünlüğünü göstermektedir. Ayrıca mikroemülsiyon formülasyonlarının uygulanması sonrası elde edilen antiinflamatuvar etkinin, ticari jel formülasyonunun uygulanmasından sonra elde edilen antiinflamatuvar etkiye göre daha fazla olmasının nedeni, mikroemülsiyon formülasyonlarının tekibide yer alan YEM ve YYEM'lerin varlığından dolayı derinin geçirgenliğinin ve etkin maddenin penetrasyonunun artması şeklinde de açıklanabilir.

Analjezik etki çalışması olarak, tail flick ve hot plate testleri yapılmıştır. Changez ve Varshney (18) yaptıkları bir çalışmada, lokal analjezik etkili bir etkin maddeyi mikroemülsiyon sistemi içinde enkapsüle edip topikal olarak sıçanlara uyguladıktan sonra analjezik etkinin sulu çözeltiye göre arttığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, M8 ve M9 mikroemülsiyon formülasyonları ve ticari preparatın sıçanlara topikal uygulanmasından sonra analjezik etki eşit düzeyde bulunmuştur (Şekil 51, Tablo 30) ($P > 0.05$). Mikroemülsiyon formülasyonlarının jel

tipinde olan ticari formülasyonuna göre görünümünün berrak olması ayrıca jel tipi ticari formülasyonun deri üzerine sürüldüğünde yapışkan bir his bırakması ve deride yayılmasının zor olması nedeni ile mikroemülsiyon formülasyonları hasta uyuncu açısından daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir.

M8, M9 mikroemülsiyon formülasyonlarından ve ticari preparattan elde edilen in-vivo sonuçlar tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Geliştirdiğimiz M8 ve M9 formülasyonlarının antiinflamatuvar etkisi ticari preparata göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($P < 0.05$).

4.7 Sonuç

Sonuç olarak tez çalışmasına başlarken hedeflenen amaçlar doğrultusunda geliştirdiğimiz mikroemülsiyon farmasötik dozaj şeklinin, NP'nin transdermal uygulanmasında uygun bir taşıyıcı sistem olabileceği yapılan in vitro, ex vivo ve in vivo çalışmalar sonucunda söylenebilir. Hatta yapılan in-vivo testler sonucunda özellikle antiinflamatuvar etki istenen durumlarda, NP'nin mikroemülsiyon formülasyonu şeklinde uygulanması sonrası elde edilen antiinflamatuvar etkinin, ticari preparatın uygulaması sonrası elde edilen etki ile karşılaştırıldığında, NP nin mikroemülsiyon şeklinde uygulanması ile daha etkili sonuçlar alınabileceği öngörülmektedir.

Geliştirilen bu formülasyonlardan S/Y tipi M8 ve Y/S tipi M9 mikroemülsiyon formülasyonlarının elde edilen in vitro, ex vivo ve in vivo bulguları ışığında ideal formülasyonlar olduğu belirlenmiştir ve tüm bu veriler doğrultusunda bu iki formülasyonun transdermal olarak ticari preparata alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmekte ve önerilmektedir.

ÖZET

NAPROKSEN İÇEREN FARKLI TRANSDERMAL MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Neslihan ÜSTÜNDAĞ

Bu çalışmanın amacı, model etkin madde olarak seçilen antiinflamatuvar ve analjezik etkili naproksenin transdermal yolla kullanılabilen S/Y ve Y/S mikroemülsiyon formülasyonları geliştirmektir.

Bu amaçla, naproksenin farklı YEMler, YYEM'ler ve farklı su fazları kullanılarak topikal mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanmış ve üçgen faz diyagramı ile ideal formülasyonlar belirlenmiştir.

NP yüklenen ideal formülasyonlardan ve piyasa preparatından naproksenin difüzyonu, difüzyon hücresi kullanılarak, in-vitro olarak nitro selüloz membranda ve selüloz membranda, ex-vivo olarak sıçan derisinde incelenmiştir. İn-vivo olarak geliştirilen formülasyonların etkinliği ise sıçanlarda araştırılmıştır. Geliştirilen formülasyonlar ve ticari formülasyon kullanılarak sıçanlarda antiinflamatuvar ve analjezik etki araştırılmıştır.

Geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla bir seri analizler yapılmıştır. Analiz olarak; pH ölçümü, viskozite tayini, damlacık büyüklüğü tayini, iletkenlik tayini, refraktif indis ölçümleri gerçekleştirilmiş ve ayrıca geliştirilen formülasyonların stabiliteleri incelenmiştir.

Bütün bu çalışmalar sonucunda geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları, ticari preparata bir alternatif olarak önerilebilir.

ABSTRACT

STUDIES ON IN VITRO – IN VIVO EVALUATION OF DIFFERENT TRANSDERMAL MICROEMULSION FORMULATIONS CONTAINING NAPROXEN

Neslihan ÜSTÜNDAĞ

The aim of this study was to develop w/o and o/w microemulsion formulations of the antiinflammatory and analgesic agent naproxen which was chosen as model drug active substance, which can be used via transdermal route.

For this purpose, the topical microemulsion formulations of naproxen using different surfactants, co-surfactants and water phases were prepared, and ideal formulations were determined by using triangle phase diagrams.

The diffusion of naproxen from naproxen loaded formulations and commercial formulation was investigated in nitro cellulose membranes and cellulose membranes using diffusion cell as in vitro studies and in rat skin as ex-vivo studies. In-vivo studies of these microemulsion formulations and commercial formulation were also evaluated antiinflammatory and analgesic effect in rats.

To determine the physicochemical properties of developed microemulsion formulations, a series of analyses were performed. The analyses that were performed include refractive index measurement, pH, viscosity, droplet size and conductivity, and the stability of the formulations were also evaluated.

As a result of all studies, developed microemulsion formulations could be proposed as an alternative to the commercial formulation in therapy.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Ağabeyoğlu, İ. (2002). Transdermal Sistemler, Kontrollü Salım Sistemleri, Ed., A. Z. Gürsoy, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul, 239-260.
2. Altria, K., Broderick, M.F., Donegan, S., Power, J. (2004). The Use of Novel Water-in-Oil Microemulsions in Microemulsion Electrokinetic Chromatography, Electrophoresis, 25; 645-652.
3. Apaydın, Ş., Yegül, İ. (1997). Ağrı Nörofizyolojisi, Galenos, Algoloji, 4-14.
4. Apaydın, Ş., Yegül, İ. (1997). Ağrı Nörofizyolojisi, Galenos, Algoloji, 15-25.
5. Armağan V. (2002). Antitümöral İlaç İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Antitümöral Etkinliğinin Araştırılması Üzerine çalışmalar, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
6. Attwood, D. (1994). Microemulsions, In: Colloidal Drug Delivery Systems, Kreuter J. Editor. New York: Marcel Dekker, 31-71.
7. Ayano, E., Nambu, K., Sakamoto, C., Kanazawa, H., Kikuchi, A., Okano, T. (2006). Aqueous Chromatography System Using pH and Temperature Responsive Stationary Phase With Ion-Exchange Groups, Journal of Chromatography A, 1119; 58-65.
8. Baboota, S., Shakeel, F., Ahuja, A., Ali, J., Shaafiq, S. (2007). Desing, Development and Evuation of Novel Nanoemulsion Formulations for Transdermal Potential of Celecoxib, Acta Pharmaceutica, 57; 315-332.
9. Bayrak, Y., Iscan, M. (2004). Phase Inversion Temperaturas of Triton X-100/1-Butanol/Hydrocarbon/Water Systems, Journal of Surfactants and Detergents, 7(4); 363-366.
10. Beetge, E., Plessis, J., Müller, D. G., Goosen, C., Rensburg, F. J. (2000). The Influence of The Physicochemical Characteristics and Pharmacokinetic Properties of Selected NSAID's On Their Transdermal Absorption, International Journal of Pharmaceutics, 193; 261-264.
11. Binks, B.P., Espert, A., Fletcher, P.D.I., Soubiran, L. (2003). Phase Behaviour of Microemulsions Stabilised by Double Chain Cationic

- Surfactants and Alcohol Co-surfactants, Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects, 212; 135-145.
12. Biochemicals & Reagents Sigma, Alphabetical List of Products, (2002). 1441.
 13. Bly, N.N. (1995). The Use of Ultrasound as an Enhancer for Transdermal Drug Delivery, *Phonophoresis*, 75(6); 539-553.
 14. Bolzinger, M. A., Briançon, S., Pelletier, J., Fessi, H., Chevalier, Y. (2008). Percutaneous Release of Caffeine From Microemulsion, Emulsion and Gel Dosage Forms, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68; 446-451.
 15. Bonina, F. B., Puglia, C., Barbuzzi, T., Caprariis, P., Palagiano, F., Rimoli, M. G., Saija, A. (2001). In Vitro and In Vivo Evaluation of Polyoxyethylene Esters as Dermal Prodrugs of Ketoprofen, Naproxen and Diclofenac, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14; 123-134.
 16. Champe, P. C., Harvey, R. A. (1994). Lippincott's Illustrated Review: Biochemistry, 401-412.
 17. Chandra A., Sharma, P. K. (2008). Proniosome Based Drug Delivery System of Piroxicam, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(9); 184-190.
 18. Chang, X.C., Chen, H.B., Zhao, X.Z., Gao, Z.H., Xu, H.B., Yang, X.L. (2005). High Performance Liquid Chromatography Determination of Triptolide In Vitro Permeation Studies, *Analytica Chimica Acta*, 534; 215-221.
 19. Changez, M., Chander, J., Dinda, A.K. (2006). Transdermal Permeation of Tetracaine Hydrochloride by Lecithin Microemulsion: In Vivo, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48; 58-66.
 20. Changez, M., Varshney, M. (2000). Aerosol-OT Microemulsions as Transdermal Carriers of Tetracaine Hydrochloride, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(5); 507-512.
 21. Charoo, N.A., Anwer, A., Kohli, K., Pillai, K.K., Rahman, Z. (2005). Transdermal Delivery of Flurbiprofen: Permeation Enhancement, Design, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies in Albino Rats, *Pharmaceutical Development and Technology*, 10; 343-351.
 22. Chen, C.C., Tsai, S.W., Villeneuve, P. (2005). Enantioselective Hydrolysis of (R,S)-Naproxen 2,2,2-Trifluoroethyl Ester in Water-Saturated Solvents

- Via Lipases From *Carica Pentagona* Heilborn and *Carica Papaya*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 34; 51-57.
23. Chen, H., Mou, D., Du, D., Chang, X., Zhu, D., Liu, J., Xu, H., Yang, X. (2007). Hydrogel-thickened Microemulsion for Topical Administration of Drug Molecule at an Extremely Low Concentration, *International Journal of Pharmaceutics*, 341; 78-84.
 24. Chen, H.; Chang; X.; Du; D.; Li; J.; Xu; H.; Yang; X. (2006). Microemulsion-Based Hydrogel Formulation of Ibuprofen for Topical Delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 315; 52-58.
 25. Chen; H. ;Chang, X., Weng, T., Zhao, X.,Gao, Z. Yang, Y., Xu, H., Yang, X (2004), A Study of Microemulsion Systems for Transdermal Delivery of Triptolide, *Journal of Controlled Release*, 98; 427-436.
 26. Choi, J.S., Shin, S.C. (2007). Preparation and Evaluation of Pranoprofen Gel for Percutaneous Administration, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33; 19-26.
 27. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, London (1986). s 799-800.
 28. Correa, M.,A., Scarpa, M. V., Franzini, M.C., Oliveira, A.,G. (2005). On the Incorporation of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Naproxen Into Cationic O/W Microemulsions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 43; 108-114.
 29. Csoka, I., Csanyi, E., Zapantis, G., Nagy, E., Feher-kiss, A., Horvath, G., Blazso, G., Erös, I. (2005). In Vitro and In Vivo Percutaneous Absorption of Topical Dosage Forms: Case Studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 291; 11-19.
 30. Çelebi, N. (2007). Emülsiyonlar, *Modern Farmasötik Teknoloji*, Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, s. 277-299.
 31. Çilek, A., Türkyılmaz, A., Çelebi, N. (2002). Mikroemülsiyonlar: Genel Özellikleri ve Farmasötik Amaçla Kullanımları, *Fabad Journal Pharmaceutical Sciences*, 27; 27-41.
 32. Çomoğlu, T., Gönül, N. (1997). Mikroemülsiyonlar, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Ankara, 26/2; 95-108.
 33. Danielsson I., Lindman, B. (1981). The Definition of Microemulsions, *Colloids Surfaces A*, 3; 391-393.

34. Davis, H.T. (1994). :Factors Determining Emulsion Type: Hydrophile Lipophile Balance and Beyond, Colloids and Surfaces A: Phsicochemical and Engineering Aspects, 91; 9-24.
35. Degim, I.T., Pugh, W.J., Hadgraft, J. (1998). Skin Permeability Data: Anomalous Results, International Journal of Pharmaceutics, 170; 129-133.
36. Degim, I.T., Uslu, A., Hadgraft, J., Akay, C., Cevheroglu, S. (1999). The Effects of Azone and Capsaicin On The Permeation of Naproxen Through Human Skin, International Journal of Pharmaceutics, 179; 21-25.
37. Degim, T. (2007). Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar, Modern Farmasötik Teknoloji, Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, s. 337-364.
38. Desai, K.G.H. (2004). Enhanced Skin Permeation of Rofecoxib Using Topical Microemulsion Gel, Drug Development Research, 63;33-40.
39. Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M. (2005). In Vitro Release of Diclofenac Diethylamine from Caprylocaproyl Macrogolglycerides Based Microemulsions, International Journal of Pharmaceutics, 296; 73-79.
40. Donia-Abou, A.H., Toaima, S.M., Hammoda, H.M., Shawky, E. (2007). New Rapid Validate HPTLC Method for the Determination of Lycorine in Amaryllidaceae Plants Extracts, Chromatographia, 65; 497-500.
41. Ege, M.A., Karasulu, H.Y., Güneri, T., (2004). Triangle Phase Diagram Analysis Software, The 4th International postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics. Abstack Book, (İstanbul).
42. Elbabry, F.A., Shoker, A. (2007). Simple High Performance Liquid Choromatographic Assay for Mycophenolic Acid in Renal Transplant Patients, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43; 788-792.
43. Erdal, S. Kuru Deri Tedavisinde Nemlendirici ve Yumuşatıcı Ürünlerin Yeri, www.meslekiyeterlilik.com, 1-12.
44. Escribano, E., Calpena, A.C., Queralt, J., Obach, R., Domenech, J. (2003). Assessment of Diclofenac Permeation With Different Formulations: Anti-inflammatory Study of A Selected Formula, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 19; 203-210.

45. Esser, M.J., Sawynok, J. (1999). Acute Amitriptyline in Rat Model of Neuropathic Pain: Differential Symptom and Route Effects, *Pain*, 80; 643-653.
46. Fang, L., Numajiri, S., Kobayashi, D., Morimoto, Y. (2003). The Use of Complexation with Alkanolamines to Facilitate Skin Permeation of Mefenamic Acid, *International Journal of Pharmaceutics*, 262; 13-22.
47. Ferreira, L. A. M., Seiller, M., Grossiord, J. L., Marty, J.P., Wepierre, J. (1995). Vehicle Influence On In Vitro Release of Glucose: w/o, w/o/w and o/w Systems Compared, *Journal of Controlled Release*, 33; 349-356.
48. Friberg, S.E., Kayalı, İ.H., Margosiak, M., Osborne, D.W., Ward, A.J.I. (1990). Stratum Corneum Structure and Transport Properties, *Topical Drug Delivery Formulations*, Ed. Osborne, D.W., Amann, A.H., *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 43; 29-46.
49. Grubb, B.D. (1998). Peripheral and Central Mechanisms of Pain, *British Journal of Anaesthesia*, 81; 8-11.
50. Gupta, R.R., Jain, S.K., Varshney, M. (2005). AOT Water-in-Oil Microemulsions as a Penetration Enhancer in Transdermal Drug Delivery of 5-fluorouracil, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41; 25-32.
51. Güneli, E., Yavaşoğlu-Karabay, N.Ü., Apaydın, Ş., Uyar, M., Uyar, M. (2007). Analysis of the Antinociceptive Effect of Systemic Administration of Tramadol and Dexmedetomidine Combination on Rats Models of Acute and Neuropathic Pain, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 88; 9-17.
52. Güneş, Y., Işık, G. (2004). Postoperatif Ağrı Tedavisinde Siklooksijenaz-2 İnhibitörleri, *Ağrı Dergisi*, 16(3); 7-16.
53. Hadgraft, J. (2001). Skin the Final Frontier, *International Journal of Pharmaceutics*, 224; 1-18.
54. Heuschkel, S., Alexandra, G., Neubert, R.H.H. (2008). Microemulsions- Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2); 603-631.
55. Heuschkel, S., Shukla, A., Neubert, R.H.H. (2005). Use of Microemulsions For Topical Drug Delivery, *Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany*, 701-718.
56. Hoar, T.P., Schulman. (1943). Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. *Nature*, 152; 102-103.

57. <http://en.wikipedia.org/>
58. <http://www.fda.gov/>
59. Huang, Y., J., Yates, M. Z. (2006). Copper Etching by Water-In-Oil Microemulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 281; 215-220.
60. Huang, Y.B., Lin, Y.H., Lu, T.M., Wang, R.J., Tsai, Wu, P.C. (2008). Transdermal Delivery of Capsaicin Derivative-sodium Nonivamide Acatate Using Microemulsions as Vehicles, *International Journal of Pharmaceutics*, 349; 206-211.
61. Ioffe, V., Kalendarev, T., Rubenstein, I., Zupkovitz, G. (2002). Reverse Phase HPLC for Polar Lipids. Simple and Selective HPLC Procedures for Analysis of Phospholipid-Based Derivates of Valproic Acid and Various Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30; 391-403.
62. Jadhav, K., R., Shaikh, I. M. , Ambade, K. W., Kadam, V., J. (2006). Applications of Microemulsion Based Drug Delivery System, *Current Drug Delivery*, 3; 267-273.
63. Jain, S.K., Chourasia, M.K., Soni, V., Jain, A., Jain, N.K. (2005). Solid Lipid Nanoparticles Bearing Flubiprofen for Transdermal Delivery, *Drug Delivery*, 12; 207-215.
64. Jain, S.K., Gupta, Y., Jain, A., Bhola, M. (2007). Multivesicular Liposomes Bearing Celecoxib- β -Cyclodextrin Complex for Transdermal Delivery, *Drug Delivery*, 14; 327-335.
65. Jantharaprapap, R., Stagni, G. (2007). Effects of Penetration Enhancers On In Vitro Permeability of Meloxicam Gels, *International Journal of Pharmaceutics*, 343; 26-33.
66. Kan, Y., Gökbulut, A., Kartal, M., Konuklugil, B., Yılmaz, G. (2007). Development and Validation of a LC Method for the Analysis of Phenolic Acids in Turkish Salvia Species, *Chromatographia*, 66; 147-152.
67. Kantarcı G., Karasulu H.Y., Özgüney I, Güneri T. (2002). Phase Behaviour of Microemulsion Systems Containing Short-Chain Alcohols as Co-surfactant, *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44; 77-85.
68. Kantarcı G., Özgüney (Sarigüllü) I., Karasulu H.Y., Arzıl S., Güneri T. (2007). Comparison of Different w/o Microemulsions Contain Diclofenac

Sodium; Preparation, Characterization, Release Rate and Skin Irritation Studies, AAPSP PharmSciTech,; 8(4): Article 91.

69. Kantarci G, Ozgungey I, Karasulu H.Y, Guneri T. Basdemir G. (2005). In Vitro Permeation of Diclofenac Sodium From Novel Microemulsion Formulations Through Rabbit Skin, Drug Development Research, 65 (1); 17-25.
70. Karan, A., Eskiurt, N., Öncel, A. (2004). Yaşlılarda Ağrı Sorunu ve Nonsteroid Antiinflatuar İlaç Kullanımı, Ağrı Dergisi, 16(3); 1-7.
71. Karasulu, H.Y. (2008). Microemulsions as Novel Drug Carriers; the Formulation, Stability, Applications and Toxicity, Expert Opinion Drug Delivery, 5(1); 119-135.
72. Karasulu, H.Y. (2009). Formulation, Stability and Application of Microemulsions for Drug Delivery: Promises and Challenges, Ed. Lavasanifer, A., Polimeric Micelles and Reletad Structures for Drug Delivery Applications, Microspheares, Microcapsules and Lipozomes, the MML series, Kentus Books London, (in press).
73. Kemppainen, B.W., Reifenrath, W.G. (1990). Choice of Membranes for In Vitro Skin Uptake Studies and General, Methods for Skin Absorption, 1-23.
74. Kogan, A. Garti, N. (2006). Microemulsions as Transdermal Drug Delivery Vehicles, Advances In Colloid and Interface Science, 123-126; 369-385.
75. Kolesnikov, Y., Abderrahman, A.E.M., Rutinhauser, U., Pasternak, G. (2007). Reorganization of Dorsal Root Ganglion Neurons Following Choronic Sciatic Nevre Constriction Injury: Correlation with Morphine and Lidocaine Analgesia, Europen Journal of Pharmacology, 568; 124-133.
76. Kreilgaard, M. (2002). Influence of Microemulsions On Cutaneous Drug Delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, 54; 77-98.
77. Lawrence, M.J., Rees, G.D. (2000). Microemulsion-Based Media as Novel Drug Delivery Systems, Advanced Drug Delivery Reviews, 45; 89-121.
78. Li, P., Zhao, L. (2007). Developing Early Formulations: Practice and Perspective, International Journal of Pharmaceutics, 341; 1-19.
79. Lu,Z., Xiong, X., Zhang, B., Lin, G., Shi, Y., Meng, J., Zhou, Y., Mei, Q. (2005). Evaluation of 2 celecoxib derivate: analgesic effect and Selectivity to Cyclooxygenase-2/1, Acta Pharmacologica Sinica, 26(12); 1505-1511.

80. Lynch, D.H., Roberts, L.K. (1990). Immunology of the Skin, Topical Drug Delivery Formulations, Ed. Osborne, D.W., Amann, A.H., Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 43; 87-108.
81. Maghraby, G.M. (2008). Transdermal Delivery of Hydrocortisone from Eucalyptus Oil Microemulsion: Effects of Cosurfactants, International Journal of Pharmaceutics, 355; 285-292.
82. Melli, M., Kayaalp, O. S. (2005) Tibbi Farmakoloji, ed. Kayaalp, O., Ankara. s 837-870.
83. Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H., Nishida, M. (2000). Simultaneous Analysis of Naproxen, Nabumetone and Its Major Metabolite 6-Methoxy-2-Naphthylacetic Acid in Pharmaceuticals and Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23; 917-925.
84. Monser, L., Darghouth, F. (2003). Simultaneous Determination of Naproxen and Related Compounds by HPLC Using Porous Graphitic Carbon Column, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32; 1087-1092.
85. Narang, A.S., Delmarre, D., Gao, D. (2007). Stable Drug Encapsulation in Micelles and Microemulsions, International Journal of Pharmaceutics, 345; 9-25.
86. Nayak, S.H., Nakhat, P.D., Yeole, P.G. (2004). Transdermal Drug Delivery System, The Indian Pharmacist, 7-14.
87. Özgüney (Sarigüllü), I., Karasulu H.Y., Kantarcı, G., Sözer, S., Güneri, T., Ertan, G. (2006). Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium Through Rat Skin From Various Formulations, AAPS Pharmaceutical Sciences Technology, 88; 1-7.
88. Padula, C., Nicoli, S., Santi, P. (2009). Innovative Formulations for the Delivery of Levothyroxine to the Skin, International Journal of Pharmaceutics, (in press).
89. Panusa, A., Multari, G., Incarnato, G., Gagliardi, L. (2007). High-performance Liquid Chromatography Analysis of Anti-inflammatory Pharmaceuticals with Ultraviolet and Electrospray-mass Spectrometry Detection in Suspected Counterfeit homeopathic Medicinal Products, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43; 1221-1227.

90. Paolino, D., Ventura, C.A., Nistico, S., Puglisi, G., Fresta, M. (2002). Lecitin Microemulsions for the Topical Administration of Ketoprofen: Percutaneous Adsorption Through Human Skin and In Vivo Human Skin Tolerability, *International Journal of Pharmaceutics*, 244; 21-31.
91. Park, I., Kim, D., Song, J., In, C.H., Jeong, S.W., Lee, S.H., Min, B., Lee, D., Kim, S.O. (2007). Bupredrm™, a New Transdermal Delivery System of Buprenorphine: Pharmacokinetic, Efficacy and Skin Irritancy Studies, *Pharmaceutical Research*, 25(5); 1052-1062.
92. Peira, E., Scolari, P., Gasco, M.R. (2001). Transdermal Permeation of Apomorphine Through Hairless Mouse Skin From Microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, 226; 47-51.
93. Peireira, E., Carlotti, M. E., Trotta, C., Cavalli, R., Trotta, M. (2008). Positively Charged Microemulsions for Topical Application, *International Journal of Pharmaceutics*, 346; 119-123.
94. Peltola, S., Saarinen-Savolainen, P., Kiesvaara, J., Suhonen, T., M., Urtti, A. (2003). Microemulsions for Topical Delivery of Estradiol, *International Journal of Pharmaceutics*, 254; 99-107.
95. Polizelli, M.A., Telis, V.R.N., Amaral, L.Q., Feitosa, E. (2006). Formation and Characterization of Soy Bean Oil/Surfactant/Water Microemulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 281; 230-236.
96. Ramos, G.P., Dias, P.M.B., Morais, C.B., Fröhlich, P.E., Agnol, M.D., Zuanazzi, J.A.S. (2008). LC Determination of Four Isoflavone Aglycones in Red Clover, *Chromatographia*, 67; 125-129.
97. Rautio, J., Nevalainen, T., Taipale, H., Vepsäläinen, J., Gynther, J., Laine, K., Jarvinen, T. (2000). Piperazinylalkyl Prodrugs of Naproxen Improve in Vitro Skin Permeation, *European Journal of Sciences*, 11; 157-163.
98. Rhee, Y.S., Choi, J.G., Park, E.S., Chi, S.C. (2001). Transdermal Delivery of Ketoprofen Using Microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, 228; 161-170.
99. Sculman, J.H., Stoeckenius, W., Prince, L.M. (1959). *Journal of Physical Chemistry*, 63; 1677.
100. Shabir, G.A. (2003). Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis Understanding The Difference 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; 57-66.

101. Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., Shafiq, S. (2007). Nanoemulsions As Vehicles for Transdermal Delivery of Aceclofenac, *AAPS Pharmaceutical Sciences Technology*, 104; 1-9.
102. Sharma, P.K., Bhatia, S.R. (2004). Effect of Anti-inflammatories on Pluronic F127: Micellar Assembly, Gelation and Partitioning, *International Journal of Pharmaceutics*, 278; 361-377.
103. Sintov, A.C., Shapiro, L. (2004). New Microemulsion Vehicle Facilitates Percutaneous Penetration In Vitro and Cutaneous Drug Bioavailability In Vivo, *Journal of Controlled Release*, 95; 173-183.
104. Skoog, D.A. (1989). Molecular Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy, *Principles of Instruments Analysis*, Saunders Golden Sunburst Series, s.182-224
105. Spornath, A., Aserin, A., Ziserman, L., Danino, D., Garti, N. (2007). Phosphatidylcholine Embedded Microemulsions: Physical Properties and Improved Caco-2 Cell Permeability, *Journal of Controlled Release*, 119; 279-290.
106. Swart, H., Breytenbach, J.C., Hadgraft, J., Plessis, J. (2005). Synthesis and Transdermal Penetration of NSAID Glycoside Esters, 301; 71-79.
107. Tarımcı, N., Tezcan- Şatıroğlu, N. (1995). , Desing and Evaluation of Naproksen Tablet Formulations Prepared by Wet Granulation and Direct Compression Methods, *Fabad Journal Pharmaceutical Sciencist.*, 20; 1-6.
108. The Merck Index, (1989). 11. baskı, s. 1014.
109. The United States Pharmacopeia National Formulary Supplement, (1995). USP XXII, NF XVIII, s 1053-1054.
110. The United States Pharmacopeia National Formulary Supplement, (1990). USP XXII, NF XVII, s 1784-1785.
111. Tsai, S.W., Chen, C.C., Yang, H.S., Ng, I.S., Chen, T.L. (2006). Implication of Substrate-Assisted Catalysis On Improving Lipase Activity or Enantioselectivity in Organic Solvents, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764; 1424-1428.

112. Türkyılmaz, A. (1998) Epidermal Büyüme Faktörü'nün Gastrointestinal Sistem Ülserindeki Etkisinin İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
113. Üstünes, L. Rx-Media Pharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, İzmir, 2008.
114. Valenda, C., Schultz, K. (2004). Influence of Carrageenan On The Rheology and Skin Permeation of Microemulsion Formulations, Journal of Controlled Release, 95; 257-265.
115. Valjakka-Kosekela, R., Kirjavainen, M., Mönkkönen, J., Urtti, A., Kiesvaara, J. (1998). Enhancement of Percutaneous Absorption of Naproxen by Phospholipids, International Journal of Pharmaceutics, 175; 225-230.
116. Yavaşoğlu-Karabay, N.Ü., Baykan, Ş., Öztürk, B., Apaydın, Ş., Tuğlular, I. (2006). Evaluation of the Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Satureja Thymbra L. Essential Oil, Pharmaceutical Biology, 44(8); 585-591.
117. Yavaşoğlu-Karabay, N.Ü., Karamenderes, C., Baykan, Ş., Apaydın, Ş. (2007). Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities and Acute Toxicity of Achillea Nobilis Subsp. Neileichii Extract in Mice and Rats, Pharmaceutical Biology, 45(2); 162-168.
118. Yazan, Y. (2002). Emülsiyon Sistemler, Kontrollü Salım Sistemleri, Ed., A. Z. Gürsoy, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul, s.133-150.
119. Yazan, Y. (2004). Emülsiyon Sistemler, Temel Konular Ve Dozaj Şekilleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını No:2 , Ed., A. Z. Gürsoy, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul, s. 273-286.
120. Yuan, J. S., Ansari, M., Saman, M., Acosta, E. J. (2008). Linker-Based Lecithin Microemulsions for Transdermal Delivery of Lidocaine, International Journal of Pharmaceutics, 349; 130-143.
121. Yuan, J.S., Acosta, E.J. (2009). Extended Release of Lidocaine From Linker-based Lecithin Micromulsions, International Journal of Pharmaceutics, 368; 63-71.
122. Yuan, Y., Li, S., Mo, F., Zhong, D. (2006). Investigation of Microemulsion System for Transdermal Delivery of Melexicam, International Journal of Pharmaceutics, 321; 117-123.

123. Yue, Y., San-ming, L., Li-min, Y., Pan, D., Da-fang, Z. (2007). Physicochemical Properties and Evaluation of Microemulsion Systems for Transdermal Delivery of Meloxicam, Chemical Research in Chinese Universities, 23(1); 81-86.
124. Zaghloul, A.A., Hussain, A., Khan, M.A., Ahsan, F. (2003). Development of A HPLC Method for The Determination of Cyclosporin-A in Rat Blood and Plasma Using Naproxen As An Internal Standard, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 31; 1101-1107.
125. Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Valizadeh, H. (2005). Simultaneous Determination of Naproxen, Ketoprofen and Phenol Red In Samples From Rat Intestinal Permeability Studies: HPLC Method Development and Validation, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39; 624-630.
126. Zhao, X., Liu, J.P., Zhang, X., Li, Y. (2006). Enhancement of Transdermal Delivery of Theophylline Using Microemulsion Vehicle, International Journal of Pharmaceutics, 327; 58-64.
127. Zhu, W., Yu, A., Wang, W., Dong, R., Wu, J., Zhai, G. (2008). Formulations Design of Microemulsion for Dermal Delivery of Penciclovir, International Journal of Pharmaceutics, 360; 184-190.

ÖZGEÇMİŞ

21.07.1984 yılında Merzifon’da doğdum. İlkokulu Akhisar’da Misak-ı Milli İlköğretim okulunda, ortaokulu Konya’da Dolapoğlu Anadolu Lisesi’nde okudum. Lise öğrenimimi ise Aksaray Fen Lisesi’nde tamamladım. 2002 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ne başladım ve 2006 yılında mezun oldum. Aynı yıl şubat ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım. Halen aynı Anabilim Dalı’nda eğitime devam etmekteyim.



EGE ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

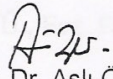
10.04.2008

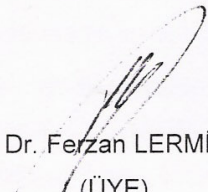
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

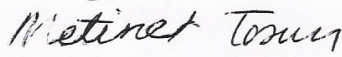
Toplantı No: 2008/3
Başvuru No: 2008/1
Karar No : 2008/ 3-1

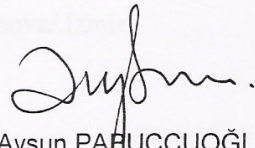
Kurulumuzca, tarafınızdan yürütülen "Naproksen İçeren Çeşitli Topikal Mikroemlsiyon Formülasyonlarının İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar" başlıklı araştırmanız Kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir.

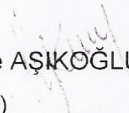
Sonuçta, araştırmalarınızda topikal olarak kullanılan naproksen dozaj şekillerine alternatif yeni dozaj şekli önermek ve bu amaçla transdermal yol ile kullanılabilen,naproksen içeren mikroemlsiyon dozaj formülasyonlarını geliştirmeyi planladığınız anlaşılmıştır. Yapılacak olan çalışmalarda sıçanların kullanılması isteğinizin Etik Kurulumuz açısından bir sakıncası bulunmadığına oy birliği ile karar verilmiştir


Prof. Dr. Aslı ÖZER
(BAŞKAN)


Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU
(ÜYE)


Doç. Dr. Metiner TOSUN
(ÜYE)


Prof. Dr. Aysun PABUÇCUOĞLU
(ÜYE)


Doç. Dr. Makbule AŞIKOĞLU
(ÜYE)



Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Derneği Ege - Akdeniz Şubesi Katkılarıyla

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na
14 - 16 Mart 2008 tarihleri arasında düzenlenen ve
Multidisiplin Laboratuvarı- Deney Hayvanları Birimi'nde yürütülen*

DENEYSEL ARAŞTIRMALAR (İLERİ)

Kursuna

Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ

Öz

Prof. Dr. Osman YILMAZ
Laboratuvar Hayvanları Bilimi
Anabilim Dalı Başkanı

Katılmış ve başarıyla tamamlamıştır.

Abacıoğlu
Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU
Dekan