

**FRANZ DİFÜZYON HÜCRESİ KULLANILARAK
TRANSDERMAL SİSTEMDEN TİYOKOLŞİKOSİDİN
PERMEASYONU VE HPLC İLE ANALİZİ**

HALE KARAGÜZEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEZEN SİVRİKAYA ÖZAK**

DÜZCE, 2024

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FRANZ DİFÜZYON HÜCRESİ KULLANILARAK
TRANSDERMAL SİSTEMDEN TİYOKOLŞİKOSİDİN
PERMEASYONU VE HPLC İLE ANALİZİ

Hale KARAGÜZEL tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sezen SİVRİKAYA ÖZAK
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sezen SİVRİKAYA ÖZAK
Düzce Üniversitesi

Doç. Dr. Murat TUNA
Sakarya Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi İkrime ORKAN UÇAR
Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 11/06/2024

BEYAN

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

11 Haziran 2024

Hale KARAGÜZEL

TEŞEKKÜR

Tezin her aşamasında her türlü desteği veren, gösterdiği sabır ve iyi niyet dolayısıyla danışman hocam sayın Doç. Dr. Sezen SİVRİKAYA ÖZAK'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Çalışmalarimdaki desteğinden dolayı Dr. Aslıhan DALMAZ'a ve en önemlisi beni yüksek lisansa teşvik eden ve laboratuvar kullanımını sağlayan şirketim NOBEL İLAÇ ARGE MERKEZİ'ne, çalışmamda bana yol gösteren Selda ZENGİN KURNALI'ya, laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Mukaddes DİKCİ ve Sinem YETİM'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2023-05-03-1406 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

11 Haziran 2024

Hale KARAGÜZEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.CİLT YAPISI VE İLAÇ	4
2.1. CİLT YAPISI VE FONKSİYONU	4
2.1.1. Derinin Mekanik Özellikleri	5
2.1.2. Derinin Termal Özellikleri	5
2.1.3. Derinin Elektriksel Özellikleri	5
2.2. İLAÇ VE İLAÇ ÇEŞİTLERİ.....	6
2.2.1. Jel Formu	6
2.2.1.1. Jel Yapıcı Maddeler	7
2.2.2. İlacın Cilde Nüfuz Etme Yolları	7
2.2.2.1. Porlardan ya da Boşluklardan Geçiş	9
2.2.2.2. Transselüler Yol	10
2.2.2.3. İnterselüler Yol.....	10
2.2.2.4. Derinin Durumu.....	10
2.2.2.5. Derinin Yaşı	10
2.2.2.6. Artan Kan Artışı	10
2.2.2.7. Deri Bölgesi	11
2.2.2.8. Derinin Türü	11
2.2.2.9. Derinin Hidratasyonu	11
2.2.2.10. Derinin Sıcaklığı	11
2.2.2.11. pH.....	11
2.2.2.12. İlaç Konsantrasyonu	11
2.2.2.13. İlaçların Çözünürlük Özellikleri	11
2.2.2.14. İlacın Molekül ve Partikül Büyüklüğü.....	12
3.ÇALIŞILAN ETKEN MADDE VE VALİDASYONU	13
3.1. TİYOKOLŞİKOSİD YAPISI VE ÖZELLİKLERİ.....	13
3.2. FRANZ DİFÜZYON HÜCRESİ	14
3.2.1. Reseptör Sıvısı	15
3.2.2. Membran Seçimi	15
3.2.3. Numune Alma Süresi	17
3.2.4. Difüzyon Hızı	17
3.3. METOT VALİDASYON PARAMETRELERİ	17
3.3.1. Doğrusallık.....	17
3.3.2. Kesinlik.....	18
3.3.2.1. Tekrarlanabilirlik.....	18
3.3.2.2. Ara Kesinlik	18
3.3.3. Geri Kazanım	18

3.3.4. Sağlamlık.....	18
3.3.5. Dedeksiyon Limiti	18
3.3.6. Tayin Limiti	18
4.YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ.....	20
4.1. TEMEL KROMATOĞRAFİK PARAMETRELER.....	21
4.1.1. Teorik Plaka Sayısı	21
4.1.2. Alıkonma Faktörü.....	21
4.1.3. Kararlılık	21
4.1.4. Kuyruk Faktörü ve Simetri Faktörü.....	22
5.MATERYAL VE METOT	23
5.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	23
5.2. KULLANILAN KİMYASALLAR	24
5.3. HPLC CİHAZININ ÇALIŞMA KOŞULLARI	24
5.4. GELİŞTİRİLEN PROSEDÜR	25
6.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	26
6.1. KARAKTERİZASYON	26
6.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analiz Sonuçları	26
6.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analiz Sonuçları	26
6.1.3. Raman Spektroskopisi Analiz Sonuçları	27
6.2. GELİŞTİRİLEN PROSEDÜRÜN OPTİMİZASYON PARAMETRELERİ	28
6.2.1. Membranın Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi.....	28
6.2.2. Membran Doyurulmasının Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi	29
6.2.3. Numune Miktarının Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi	30
6.2.4. Karıştırma Süresinin Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi.....	31
6.2.5. Karıştırma Hızının Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi	32
6.2.6. Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Sıcaklık Etkisi	32
6.3. HPLC METOT VALİDASYONU	33
7.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	35
8.KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Derinin yapısı.	4
Şekil 2.2. Derideki ilaç nüfuz yolları.	8
Şekil 2.3. Transdermal sistemin kısımları	9
Şekil 3.1. Tiyokolşikosidin molekül formülü	13
Şekil 3.2. Franz Tipi Difüzyon Hücresi.	14
Şekil 3.3. (T) Geliştirilen ilaç ve (R) Referans ilacın Franz Difüzyon Hücresine yerleştirilen konumları.	15
Şekil 4.1. HPLC cihazının çalışma prensibi.	20
Şekil 5.1. Franz Difüzyon Hücresi'nin kullanan bir transdermal ilaç dağıtım sisteminden tiyokolşikosid nüfuzu.	25
Şekil 6.1. a) Referans ilacın ve b) geliştirilen ilaç numunesinin FT-IR spektrumları. ...	26
Şekil 6.2. a) Referans ilacın ve b) geliştirilen ilaç numunesinin DSC termogramları.	27
Şekil 6.3. Referans ilacın Raman spektrumu.	28
Şekil 6.4. Geliştirilen ilacın Raman spektrumu.	28
Şekil 6.5. Membranın tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi	29
Şekil 6.6. 3 saat membran doyurulması sonucunda geliştirilen ilaç ve referans ilacın alan karşılaştırması.	29
Şekil 6.7. Ortam solüsyonuyla doyurulmuş ve doyurulmamış membranların tiyokolşikosid geçirgenliği üzerindeki etkisi.	30
Şekil 6.8. Numune miktarının tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi.	31
Şekil 6.9. Karıştırma süresinin tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi	31
Şekil 6.10. Karıştırma hızının tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi.	32
Şekil 6.11. Tiyokolşikosid geçirgenliğine sıcaklık etkisi	33

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Jel, merhem ve krem özelliklerinin karşılaştırması.	6
Çizelge 2.2. Transdermal sistemin avantajları ve dezavantajları.	9
Çizelge 3.1. Selüloz bazlı ve polimer bazlı sentetik membranlar ve özellikleri.	16
Çizelge 6.1. Metot doğrulama parametreleri.	34



KISALTMALAR

DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
LOD	Dedeksiyon Limiti
LOQ	Tayin Limit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
RID	Kırılma İndeksi Dedektörü
DAD	Diyot Dizili Dedektörü
UV	Ultraviole Işın Dedektörü
PDA	Fotodiyot Dedektör

SİMGELER

k	Alıkonma faktörü
N	Teorik plaka sayısı
t	Tekrarlanabilirlik
R	Tekrar üretilebilirlik
Rs	Kararlılık



ÖZET

FRANZ DİFÜZYON HÜCRESİ KULLANILARAK TRANSDERMAL SİSTEMDEN TİYOKOLŞİKOSİDİN PERMEASYONU VE HPLC İLE ANALİZİ

Hale KARAGÜZEL

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sezen SİVRİKAYA ÖZAK

Haziran 2024, 43 sayfa

Son zamanlarda deri yoluyla ilaç salınımı uygulamaları oldukça popüler hale gelmiştir. Bu ilaç salım uygulamalarının en dikkat çekenlerinden biri de aktif maddenin deri veya yapay zarlar yoluyla sistemik dolaşıma geçmesini sağlayan ilaç salım yöntemleri olan transdermal ilaç salım sistemleridir. Bu çalışmada, tiyokolşikosid etken maddesini içeren bir jel ilacın salınım ve nüfuz testleri için gerekli optimizasyon koşulları, insan veya hayvan derisi içermeyen sentetik membranlar kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Etkeni tiyokolşikosid olan jel formundaki ilacın geçirgenliği Franz Difüzyon Hücresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Tuffryn membran, Selüloz bazlı membran ve Supor hidrofilik polietir sülfon bazlı membran olmak üzere 3 farklı sentetik membran kullanılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda Franz Difüzyon Hücresinde tiyokolşikosid geçirgenliği açısından en iyi sentetik membranın Supor membran olduğu görülmüştür. Ayrıca yöntemin bağıl standart sapma değerleri, dedeksiyon ve tayin limitleri belirlenerek permeasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada korelasyon katsayısı 0,9995, dedeksiyon ve tayin limitleri ise 0,026 ve 0,078 µg/L olarak bulunmuştur. Bu sayede validasyon çalışmasının hassasiyeti ve güvenilirliği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Franz difüzyon hücresi, Transdermal uygulama, Tiyokolşikosid ilaç difüzyonu, Sentetik membranlar, Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ABSTRACT

PERMEATION OF THIICOLCHICOSIDE FROM THE TRANSDERMAL SYSTEM USING FRANZ DIFFUSION CELL AND ANALYSIS BY HPLC

Hale KARAGÜZEL

Düzce University
Graduate School, Department of Chemistry
Master Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Sezen SİVRİKAYA ÖZAK

June 2024, 43 pages

Recently, drug release applications through the skin have become very popular. One of the most remarkable of these drug release applications is transdermal drug release systems, which are drug release methods that allow the active substance to pass into the systemic circulation through the skin or artificial membranes. In this study, the optimization conditions required for the release and permeation tests of a gel drug containing the active substance thiocolchicoside were comparatively investigated using synthetic membranes without human or animal skin. For this purpose, the permeability of the gel drug in gel form and the active ingredient thiocolchicoside was carried out using Franz Diffusion Cell. Three different synthetic membranes were used in the study: Tuffryn membrane, Cellulose-based membrane and Supor hydrophilic polyether sulfone-based membrane. As a result of the investigations, it was observed that the best synthetic membrane for the permeability of thiocolchicoside in the Franz Diffusion Cell was the Supor membrane. In addition, the method's relative standard deviation values, detection, and quantification limits were determined, and permeation studies were carried out. In this study, the correlation coefficient was found to be 0.9995, and the limits of detection and quantification were 0.026 and 0.078 µg/L. In this way, the sensitivity and reliability of the validation study were determined.

Keywords: Franz diffusion cell, Transdermal drug delivery system, Thiocolchicoside, Synthetic membranes, High pressure liquid chromatography

1. GİRİŞ

Canlı hücre üzerinde meydana getirdiği etki ile hastalığın teşhisini, iyileştirilmesi ve tedavisini amaçlayan kimyasal preparatlara ilaç denir. İlaçlar, doğal, yarı sentetik veya sentetiklerdir [1-2]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ilacı “patolojik sistemleri veya fizyolojik durumları, alıcının faydası için incelemek veya farklılaştırmak amacıyla kullanılan madde” olarak açıklamaktadır [3]. Ticari ilaçlar, ilaç şirketleri tarafından geliştirilip, üretilmektedir. Şirketler, genellikle geliştirilen ürünleri için patent almaktadır. İlaçlar; tablet, kapsül, flakon, krem, merhem, paket, toz, losyon, şurup, efervesan tablet, supozitivar, ampul, süspansiyon, emülsiyon, şampuan, damla, sprej, ovül gibi çeşitli farmasötik şekillerde bulunmaktadır. Oral yararlanımın düşük olması kullanımını sınırladığından tedavi yönteminde yüksek konsantrasyonlara ulaşmak için farklı bir dağıtım yöntemi tercih edilir [4]. Oral yolla alındığında vücutta karaciğerde ilk geçiş etkisine uğrayan ya da gastrointestinal sistemde etkisini kaybeden ilaçların deriden emilerek dolaşıma karışacak şekilde uygulanması fikri klasikleşmiş bir yöntemdir. Ancak klasik uygulama şeklinde, uygulanan yüzey alanının değişmesi ve uygulanan ilacın mutlak miktarı sonucu ilacın aynı dozda tekrarlanabilirliği zorlaşmaktadır [5]. Deri üzerine lokal uygulama ile sistemin taşıdığı ilacı kontrollü bir şekilde serbestleştirilerek deri üzerinden sistemik kan dolaşımına ulaştıran sistemlere transdermal terapötik sistem denilmektedir. İlaç dağıtım hızının bu tür sistemlerde sistem tarafından kontrol edilmesi amaçlanmaktadır [5]. Transdermal yol ile etken maddelerin uygulanmasına ilgi artmaktadır. Herhangi bir etken maddeyi lokal etki göstermesi için deriye uygulamak bazı avantajlar veya kolaylıklar sağlamaktadır [6]. Deriye lokal uygulama yapıldığında, olası lokal alerjik veya tahriş edici reaksiyonlar en önemli sakıncalardandır. Derinin düşük permeabiliteye sahip olmasının etkisiyle düşük derişimlerde farmakolojik etki gösteren güçlü ilaçların kullanılmasına yol açmaktadır ve bu nedenle deriden etken maddelerin uygulamasına sınırlama getirmektedir. Yeni transdermal sistem ve formülasyonlarla ilgili araştırmalar daha çok etkili faktörlerin anlaşılmasına ve deriden etken maddelerin permeabilitesinin artırılmasına yöneliktir [7]. Transdermal ilaç uygulama endikasyonları;

kalp damar hastalıklarının tedavilerinde, ilaç emiliminin yavaş ve uzun süreli olmasının istendiği durumlarda, sigarayı bıraktırma tedavilerinde, hormonal tedavilerde oral ilaç uygulamasının sakıncalı olduğu durumlarda tercih edilmektedir.

Çalışmada kullanılacak jel formu etken maddelerin deriye lokal uygulanması ile taşıyıcı olarak kullanılabilir. Küçük katı madde veya çözünmeyen parçacıkların sıvı ortamda dağılması ile jeller oluşmaktadır [8]. *In vitro* difüzyon modeller, çeşitli formülasyonlardaki aktif bileşenlerin penetrasyon kabiliyetini ölçmek için önemli bir araçtır. Deriye nüfuz etmeyi artırıcı özelliklerin, taşıyıcı sistemlerin etki mekanizmasının ve biyoyararlılığın tahmininin güvenilir bir değerlendirmesi, transdermal dağıtım için esastır. Farklı bileşiklerin penetrasyon kinetiğini test etmenin önemi göz önüne alındığında, çeşitli *in vitro* modeller geliştirilmiştir. Cilt geçirgenliğini değerlendirmek için Franz difüzyon hücresi kullanımı; cilt, ilaç ve formülasyon için temel bilgiler sağlar. Yalnızca yeni formülasyonların tasarımı ve geliştirilmesinde değil, aynı zamanda toksisite [9] ve kalite kontrolü için de oldukça faydalıdır [10-11]. Difüzyon hücresi, yarı katı dozaj formlarından ilaç salınımını ölçmek için güvenilir ve tekrarlanabilir bir araçtır. Geçirgenlik testi için tercih edilen membran, cihazın veya dozaj formunun uygulanacağı biyolojik dokudur. Geçirgenlik testinde çoğunlukla sentetik polimer membranlar kullanılır. Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), basit, gözenekli sentetik membranların, bir destek görevi gördükleri, ancak hız sınırlayıcı engeller olmadıkları için topikal farmasötik performansını değerlendirmek için uygun olduğunu öne sürmüştür. Bunlar; derinin simülasyonu ve kalite kontrolüdür. Membranlar mümkün olan en düşük difüzyon direncini sunmalı ve hız kontrol edici olmamalıdır [12]. Yaygın olarak kullanılan membranlar silikon, selüloz ve polisülfon membranlardır. Referans ilaçlar; temeli patentli moleküle dayanan, bilimsel araştırmaların sonucunda ve klinik çalışmalar ile belli bir hastalık üzerinde olumlu etki yaptığı çalışmalar sonucu kanıtlanmış ve daha önceden bir benzeri olmayan ilaçlardır [13]. Dünyada patent belgesi ile yasalarla korunurlar. Bu süre zarfında ilaç şirketleri bu ilacın bir benzerini üretemez ve satışa çıkaramaz. Patent süresi dolan etken maddeye sahip ilaçlara jenerik ilaç denir. Etken madde oranı, jenerik ilaç ile orijinal ilaç için aynı olmalıdır. Aynı formül yapısında olmalı ve orijinal ilaçla aynı etkiyi gösterdiği klinik çalışmalar sonucunda kanıtlanmış olmalıdır. Jenerik ilaçlarda orijinal ilaçlara göre yüksek maliyetli araştırma harcaması yapmadan kanıtlanmış etkinlik ve güvenilirliğine dayanılarak piyasaya sürülmektedir. Dolayısıyla daha az maliyetlere mal edilebilir. Daha ekonomik ve her sosyoekonomik yapıdaki insanların ilaç almalarını

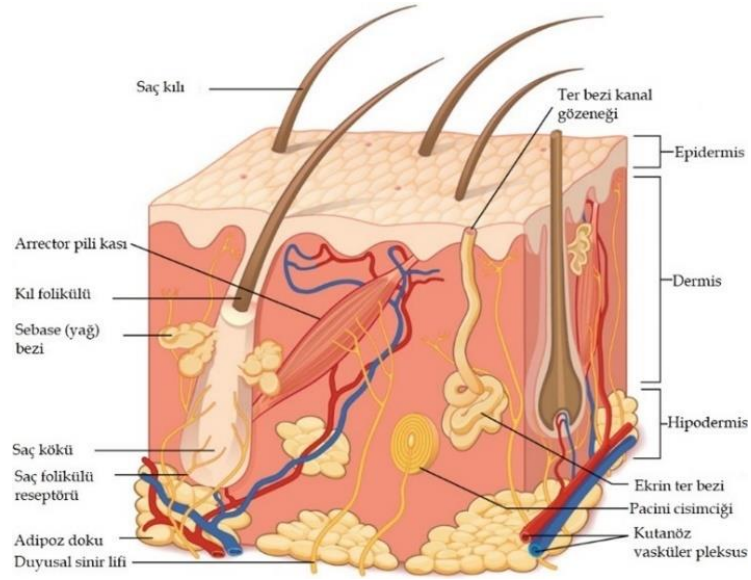
jenerik ilaçlar ile sağlanmış olmaktadır [13]. Ceschel ve arkadaşları, çeşitli permeasyonu güçlendirici yardımcı içeren yeni bir tiyokolşikosid köpük formülasyonunun *in vitro* permeasyonunun taramasını sıçan derisi üzerinden yapmışlardır.

Baz formülasyonunun, ilacın daha yüksek bir nüfuz etme profiline sahip olduğu bulunmuştur. Bu da baz formülasyonunun tek başına ilaç nüfuzunu arttırdığı anlamına gelir [14]. Artusi ve arkadaşları, tiyokolşikosidin biyoyararlanımını arttırmak için yaptıkları çalışmada, tiyokolşikosidin domuz oral mukozası yoluyla *in vitro* permeasyonu ve insanlarda *in vivo* bukkal taşınımı araştırması yapmışlardır. Tiyokolşikosidin domuz bukkal mukozasında oldukça geçirgen olduğunu ve sodyum taurokolat ve sodyum taurodeoksikolat gibi geçirgenlik artırıcıların akışını arttıramadığını göstermiştir [15]. Gayatri ve arkadaşları, tiyokolşikosidin transdermal iletimi için permeasyonu artırıcılar ile *in vivo* farmakokinetiğinin değerlendirilmesini çalışmışlardır. En yüksek deri geçirgenliğini, kimyasal geçirgenlik artırıcı olarak 1,8-sineol kullanıldıklarında da gözlemişlerdir ve sıçan derisi boyunca tiyokolşikosid taşınmasını önemli ölçüde geliştirdi [16]. Çalışmada tiyokolşikosid etkeninin jel formunun geliştirilen ilaç ile referans ilacın Franz difüzyon hücresindeki permeasyonunun sentetik membran korelasyonu kullanılarak karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Numunelerin elde edilen sonuçlarının doğruluğunun ve güvenilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla validasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan bu çalışma literatürde farklı etkenlerle yapılmış olup tiyokolşikosid etkeni ile ilk defa yapılmıştır. Bu çalışmanın temel amacı, model ilaç olarak tiyokolşikosid kullanılarak doğrulanmış Franz hücrelerinde 3 farklı sentetik membran tipinin ilaç difüzyonu üzerindeki etkisini karşılaştırmaktır.

2. CİLT YAPISI VE İLAÇ

2.1. CİLT YAPISI VE FONKSİYONU

Cildin birincil işlevi, vücudu su kaybından, toksik bileşiklerin, alerjenlerin, tahriş edici maddelerin ve mikropların girişinden vücudu korumasıdır. Derinin anatomik yapısı; dermis, epidermis ve hipodermisten oluşur. Şekil 2.1’ de derinin yapısı görülmektedir. Bilim adamları, yağ bezleri ve yağ bezlerinden salgılanan yağ ve oluşturdukları lipofilik tabakanın dördüncü tabakayı oluşturduğunu söylemektedir [6].



Şekil 2.1. Derinin yapısı.

Hipodermis, hücrelerin yağ üretip depoladığı yer olarak bilinmektedir. Kolajenler yoluyla deriye esneklik ve ısı yalıtımı sağlar. Ana kan damarları hipodermis tabakasında bulunur. Ana bileşeni lif demetleri halinde bulunan kolajenlere dermis denir. Bunlar sinirleri, uzantıları, kan damarlarını ve derideki diğer yapıları desteklemekte ve lenf kanallarını içermektedir. En dış tabakada epidermis bulunur. Kan damarı ve lenfatik sistem içermez. Ağrının algılanması için bazı sinir sonlanmaları içerir.

İnsan derisi, epidermisi (yaklaşık 100 mikron kalınlığında damarsız katman), dermisi (yaklaşık 500 ila 3.000 mikron kalınlığında oldukça vaskülarize bir katman) ve altta bulunan deri altı dokusunu ve baştan sona yağ ve ter bezlerini içerir. Dermis epidermise doğrudan bitişiktir ve cilde mekanik destek sağlar [17].

Deri yapısı bir türden diğerine, aynı türün farklı türleri arasında ve hatta aynı türün içinde farklılık gösterir. Bu nedenle perkütanöz emilim anatomik bölgeye, cilt durumuna (hastalığa), yaşa ve cildin nem durumuna bağlıdır. Perkütanöz/dermal emilim süreci, bileşiklerin deriden geçişini tanımlayan genel bir terimdir. Bu süreç üç adıma ayrılabilir:

Penetrasyon; bir maddenin belirli bir katmana veya yapıya girişidir;

Geçirgenlik, yani bir katmandan diğerine nüfuz etmedir;

Rezorpsiyon, bir maddenin merkezi bölme görevi gören vasküler sisteme (lenf ve/veya kan damarı) alınmasıdır [18].

Kimyasalların deri yoluyla taşınması karmaşık bir süreçtir. Deriden emilimin meydana gelebileceği üç ana mekanizma vardır. Hücreler içinden emilim sırasında kimyasal, hücre zarının içine ve dışına bölünerek keratin dolu korneositler yoluyla aktarılır. Hücreler arası emilim, kimyasalın lipid açısından zengin hücre dışı bölgelerdeki korneositlerin etrafına aktarılmasıyla meydana gelir. Kimyasal madde korneositleri bypass ederek kıl folikülleri, ter bezleri ve yağ bezleri tarafından sağlanan şartlara girdiğinde apendiks emilimi uygulanır [19].

2.1.1. Derinin Mekanik Özellikleri

Derinin mekanik özellikleri, stratum korneumun mekanik özellikleri ile bağlantılıdır. Bu tabakada ölü korneositler bulunur. Vücuda uygulanan kuvvetlerin dirençle ilk karşılaştığı bölgedir. Mekanik özellikler su içeriğinden, sıcaktan ve kimyasallardan etkilenir.

2.1.2. Derinin Termal Özellikleri

Deride lokal bir bölgenin sıcaklığı dış ortamın sıcaklığı ile doğrudan ilişkilidir. Membran lipidlerinin esnekliği sıcaklığı fazla olan bölgelerde daha fazladır.

2.1.3. Derinin Elektriksel Özellikleri

Derinin karmaşık elektriksel özellikleri, derinin mozaik yapısından kaynaklanmaktadır. Sıcaklık, bağıl nemle ilişkilendirilen hasarlanma, mekanik deformasyon ve patolojik durumlardan etkilenir. İnsan derisi için birinci direnç; ter kanalları ve ter bezleri, ikinci

direnç ise epidermistir.

2.2. İLAÇ VE İLAÇ ÇEŞİTLERİ

Canlı hücre üzerinde meydana getirdiği etki ile hastalığın tanısı ve tedavisini veya hastalıktan korunmayı amaçlayan kimyasal preparatlara ilaç denir. Tıpta kullanılan ve ona eşdeğer hayvansal veya bitkisel kaynaklı, biyolojik etkinliği olan saf kimyasal madde veya standart miktarda aktif madde içeren bir karışımdır. Kullanım amaçları, hastalığı önleme, tedavi, tanı ve diğer amaçlarla kullanılır [20]. İlaçlar; tablet, ampul, efervesan tablet, süspansiyon, flakon, krem, merhem, kapsül, şampuan, sprey, paket, toz, losyon, şurup, supozituar, emülsiyon, damla, ovül gibi çeşitli farmasötik şekillerde bulunmaktadır.

2.2.1. Jel Formu

Küçük katı madde veya çözünmeyen parçacıkların sıvı ortamda dağılması ile jeller oluşmaktadır [8]. Çizelge 2.1’ de merhem, krem ve jel karşılaştırması gösterilmiştir [21].

Çizelge 2.1. Jel, merhem ve krem özelliklerinin karşılaştırması.

Merhem	Krem	Jel
Yağ bazlı formülasyon	Yağ veya su bazlı formülasyon	Su bazlı formülasyon
Yağlı	Daha az yağlı	Yağlı değil
Çok sert, kremden daha dolgun	Jel ile karşılaştırıldığında dolgun	Hafif ve sulu
Beyaz, kirli beyaz veya renkli	Beyaz, kirli beyaz veya renkli	Yarı saydam ve şeffaf
Yavaşça emilir	Yavaşça emilir	Hızlıca emilir
Yayılma yeteneği daha az	Yayılması kolay	Yayılma hızı yüksek

2.2.1.1. Jel Yapıcı Maddeler

2.2.1.1.1. Protein yapıcı maddeler

Kolajen, hayvansal dokuların bağlayıcı ve temel dokusudur. Oldukça düşük konsantrasyonlarda bile yeterli kıvamda jel oluşturabilmektedir. Jelatin, hayvansal kolajenin asit ile hidrolizi sonucu elde edilmektedir.

2.2.1.1.2. Polisakkaritler

Seyreltik asit muamelesi sonucu deniz ürünlerinden aljinatlar elde edilirler. İki değerli katyonlarla (Ca^{++} gibi) çözünmeyen jeller, tek değerli iyonlarla (Na^+ gibi) çözünen jelleri oluşturur. Karragen, deniz yosunlarından elde edilir. Düşük pH' larda jel oluşturma yeteneği vardır. Glisirizin, meyan kökünden elde edilir. % 2-3 konsantrasyonlarda jel oluşturur.

2.2.1.1.3. Yarı Sentetik Polimerler

Sodyum karboksimetilselüloz; bitkilerden elde edilerek yarı sentetik hale getirilir. Metil selüloz, hidroksipropilmetilselüloz ve hidroksipropilselüloz; farmasötik ürünlerde viskozluğu arttırmak için kullanılır.

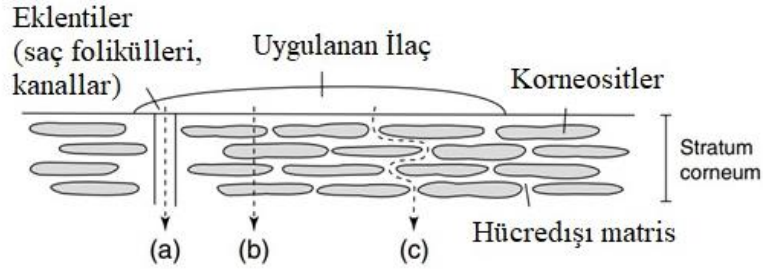
2.2.1.1.4. Sentetik Polimerler

Hidrofilik bir polimer olan polivinil alkol, % 10-15 oranında jel özelliği gösterir. Suda bir süre bekletip şişirilen ve çözüldükten sonra pH değeri 5 ile 10 arasında olan poliakrilik Asit kopolimerleri jelleşip plastik akış özelliği gösterirler. poliakrilamidler, hidrofilik özellikte olup % 4-10 konsantrasyonda jel özelliği gösterirler. Poloksamerler, sıcakta jelleşmektedirler.

2.2.2. İlacın Cilde Nüfuz Etme Yolları

Deriye etken maddenin uygulanması söz konusudur. Formülasyonda bulunan etken ve kullanılan diğer yardımcı maddeler geçirgenliğin etkisi için oldukça önemlidir. Stratum korneum' un dış tabakasında ilaç dağılımı önemli birinci aşamadır. Stratum korneum hidrofobik bir membran gibi davranır. İkinci aşama olarak epidermisten pasif difüzyonla geçer ve üçüncü aşama ise dermise penetrasyondur. İlaç epidermisten ve üst dermisten difüze olur. Sonuçta, emilimi ile sistemik dolaşıma katılır. Şekil 2.2' de gösterildiği gibi deriden geçiş için üç değişik yol saptanmıştır.

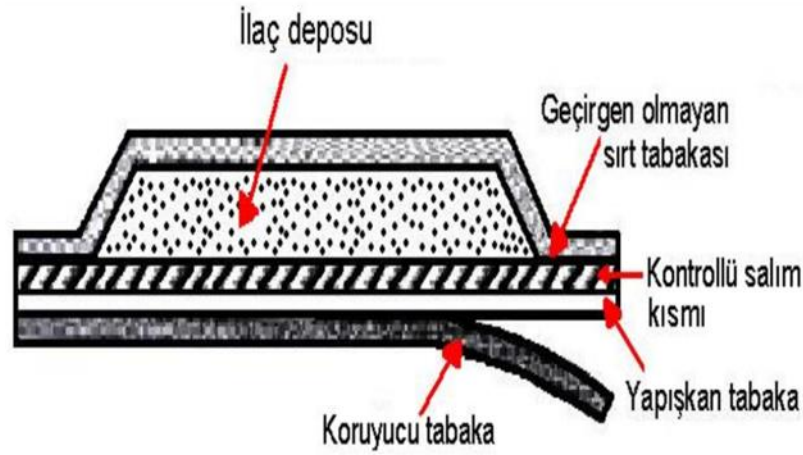
Bu üç yolun birleşik akışı, cildin geçirgenliğini belirlemektedir [22]. Transdermal sistemin terapötik etkinliğini gözlemlemek ve test etmek için, ilaç salınım geçirgenliğini ölçebilen, güvenilir, tekrarlanabilir, doğrulanmış ve doğru tahmin verileri elde edebilen *in vitro* teknik ve model sistemlere ihtiyaç vardır [23-28].



Şekil 2.2. Derideki ilaç nüfuz yolları.

Hadgraft ve Guy, geleneksel ilaç uygulamaları ile transdermal uygulamanın üstünlüklerini karşılaştırmıştır [29], etken madde transdermal yolla verilirse oral yolla uygulama görülen karaciğerden ilk geçiş etkisi görülmemektedir. Transdermal uygulama, hasta uyuncunun artırılması ve yan etki görülme olasılığının azalmasını sağlar. Uygulama esnasında istenmeyen etki görüldüğünde, etkenin deriden basitçe uzaklaştırılması ile sonlandırılabilir [30-34].

Deriye ilaç uygulaması esnasında, en önemli sakınca olası lokal alerjik veya tahriş edici reaksiyonlardır. Derinin düşük permeabiliteye sahip olmasının etkisiyle düşük derişimlerde farmakolojik etki gösteren güçlü ilaçların kullanılmasına yol açmaktadır ve bu nedenle deriden etken maddelerin uygulamasına sınırlama getirmektedir. Yeni transdermal sistem ve formülasyonlarla ilgili araştırmalar daha çok penetrasyon mekanizması, etkili faktörlerin anlaşılmasına ve deriden etken maddenin geçişinin artırılmasına yöneliktir. Şekil 2.3' te gösterildiği gibi sırt tabakası, sistemi dış etkilerden korumaktadır. İnert olmalı, dış etkilerden korunmalıdır. Kontrollü salımı sağlayan kısım, ilaç salım hızını kontrol eden membran görevi görür. Basınca duyarlı yapışkan (adezif) tabaka, deride artık bırakmamalı ve alerjen olmamalıdır. Koruyucu tabaka, depolama sırasında ilacı korumalıdır. İlaç endüstrisinde giderek artan önemi ve ticarileşmesi nedeniyle düzenleyici otoriteler tarafından onaylanmasına yol açmıştır [35-38].



Şekil 2.3. Transdermal sistemin kısımları.

Transdermal sistemin avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.2’ de gösterilmiştir [39]. Lokal uygulama oral yolla tablet kullanamayan insanlar için her ne kadar avantajlı olsa da dezavantajlı durumlarda göz önünde tutulmalıdır.

Çizelge 2.2. Transdermal sistemin avantajları ve dezavantajları.

Avantajı	Dezavantajı
Oral yolla ilaç alamayan hastalar için alternatif ilaç dağıtım yolu olmasıdır.	Deri geçirgenliğinin düşük olması ilaç sayısını sınırlamaktadır.
Sabit plazma seviyesine ihtiyaç duyan ilaçlar için uygundur.	İlaç nedeniyle lokal ödem, kaşıntı, tahriş yaşanabilir.
Aktivasyon süresini uzatır.	Stratum korneum bütünlüğünün lipidlerle bozulması meydana gelebilir.
Dozlama sıklığını azaltır.	Polimorfik dönüşme olasılığı vardır.

2.2.2.1. Porlardan ya da Boşluklardan Geçiş

Polar yol olarak da adlandırılan bu yol, molekülün ter bezi ve kıl folikülünden geçerek ana bariyeri aşmasını sağlayan düşük dirence sahip kısa bir yan geçittir. Bu kanal, maddenin derinin dış tabakası ile kılcal yatak arasında geçmesi için olası bir kanal sunar. Yağ ve ter kanallarından oluşan yolların önemli geçiş yolları olabileceği öne sürülmektedir [22].

2.2.2.2. *Transselüler Yol*

Etken bu yol boyunca bariyer hücrelerinden geçer. Hücrelerin çoğunluğu keratin ve keratohyalin nedeniyle neredeyse geçişi zorlaştıran korneositlerden oluşur. Bu yol polar olmayan maddeleri taşıyabilir [22]. Kıl folikülü kesit alanı cilt yüzey alanının % 0,1-0,2'sini oluşturmaktadır. Deride çok sayıda kıl folikülü olduğunda, deriye nüfuz etmede gözle görülür bir artış meydana gelmektedir.

2.2.2.3. *İnterselüler Yol*

Madde, stratum korneum' dan hücrelerarası geçişi kolaylaştırmak için membrandaki lipitler ve proteinlerle birleşir. Baskın olması durumunda, hücreler arası yolun korneositlerden maddeyi ayıran lipit katmanlarını geçmesi de mümkündür. Çeşitli hidrokortizon esterlerinin stratum korneum lipitlerine ne kadar iyi etki ettiği belirlenmiştir. Bazı teorilere göre, geçirgenliğin stratum korneumdan sapmasında anahtar faktör, lipit bileşenlerinin bölünme kapasitesidir. Stratum korneum ile su arasındaki bölme katsayısı, oktanol/su bölme katsayısı ile doğrudan ilişkilidir. Hücreler arası yol, oktanol ve suyun dağılımına dayanan çalışmalarla birincil penetrasyon yolu olarak desteklenmektedir [22].

2.2.2.4. *Derinin Durumu*

Penetrasyonu etkileyen en önemli faktörlerdendir. Stratum korneum hasara uğradığı zaman deri yüzeyi ile temasta bulunan hemen her maddenin absorpsiyonu artmaktadır.

2.2.2.5. *Derinin Yaşı*

Derinin geçirgenliği çocuklarda yetişkinlere göre daha fazladır. Erken doğan bebeklerin epidermisi diğer bebeklerinkinden fazla geçirgenlik gösterir. Yaşlılarda önemli dermal fonksiyonlarda azalma ve büyük epidermal değişiklikler absorpsiyonu da değiştirir [22].

2.2.2.6. *Artan Kan Artışı*

Dermal kanallarında kan akışının artışı, penetre olan materyalin ortamdan çabuk uzaklaştırılması nedeniyle absorpsiyonu arttırır. Kan damarlarında daralma penetrasyonu azaltır.

2.2.2.7. Deri Bölgesi

Deride anatomik farklılıklar engel tabakanın farklı kalınlıkta olmasına bağlı olabilmektedir. Şu anatomik sıra ile hız artar; taban, ön kol, ayak üstü, kafa derisi, karın derisi, kulak arkası.

2.2.2.8. Derinin Türü

Tavşanların, farelerin ve sıçanların derisinde ter bezleri yoktur. Fakat kıl folikülleri fazladır. Kemirgenlerin derisinin insanlarınkinden daha geçirgen olduğu bildirilmiştir [22].

2.2.2.9. Derinin Hidratasyonu

Stratum korneum' un hidratasyonu penetrasyonun artmasına etki eden en önemli faktörler arasındadır. Hidratasyon ile nikotinic asitin ve salisilik asit esterlerinin penetrasyon hızının arttığı tespit edilmiştir [22].

2.2.2.10. Derinin Sıcaklığı

Normal *in vivo* koşullarda sıcaklık çok dar bir aralıkta değişmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda 60 °C' ye kadar sıcaklıklarda birkaç saat bırakıldığında permeabilitenin değiştiği, pH<3 veya pH>9 olduğu sulu ortamda ve 65 °C' nin üzerinde çalışıldığında stratum korneum' un dönüşümsüz yapısal değişikliklere uğradığı bildirilmiştir. Sıcaklığın, ilacın deriden absorpsiyonu yanında jelin stabilitesi üzerinde de etkisi vardır.

2.2.2.11. pH

Salisilatların pH' sına bağlı olarak absorpsiyonunun arttığı görülmüştür. En yüksek pH=10,78 iken en düşük absorpsiyonun pH=2,97 olduğu tespit edilmiştir.

2.2.2.12. İlaç Konsantrasyonu

Absorpsiyonda ilaç miktarı konsantrasyona bağlı olarak artar. Bu artış yüzey alanının genişlemesi ve temas süresi ile doğru orantılı olarak artmaktadır [22].

2.2.2.13. İlaçların Çözünürlük Özellikleri

İlaçların absorpsiyonunda ilacın çözünürlük özelliğinin etkisi Mayer-Overton teorisi ile önem kazanmıştır. Epidermal hücre membranı lipid ve protein moleküllerinin heterojen karışımından oluşmuştur. Bu teoriye göre yağda çözünen maddeler lipit içerdiğinde hücre membranından geçmektedir. Suda çözünen maddeler ise hücre duvarındaki protein parçacıklarının filtrasyonundan sonra geçerler.

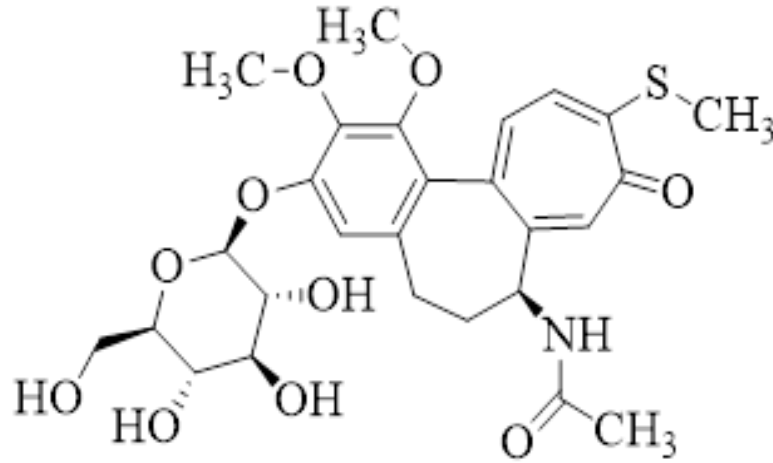
2.2.2.14. İlacın Molekül ve Partikül Büyüklüğü

Küçük moleküllerin büyük moleküllere nazaran daha kolay, küçük partiküllü ilaçların da büyük partiküllere nazaran daha kolay absorbe olduğu yapılan çalışmalarla gözlenmiştir.

3. ÇALIŞILAN ETKEN MADDE VE VALİDASYONU

3.1. TIYOKOLŞİKOSİD YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Kolşikosid, *Colchicum sonbaharale* bitkisinde bulunan bir glikozittir. Kolşikosidin yarı sentetik kükürt türevine tiyokolşikosid adı verilir. Tiyokolşikosid, amino bütirik asit (GABA) reseptörlerine olan özel afinitesi nedeniyle kas kontraktürünü değiştiren GABA-nerjik inhibitör yolakları aktive ederek güçlü bir kas gevşetici görevi görür (Şekil 3.1). Klinik ortamlarda madde nörolojik, romatizmal, kas ve travmatik sorunları tedavi etmek için kullanılır. Hayvan modellerinde antiinflamatuvar ve analjezik etkiler de belgelenmiştir. Hepatik ilk geçiş etkisi ve sınırlı gastrointestinal emilim nedeniyle ilacın oral biyoyararlanımı yaklaşık % 25' tir. Oral yararlanımın düşük olması kullanımını sınırlandırdığından, tedavi yönetiminde yüksek kan konsantrasyonlarına ulaşmak için farklı bir dağıtım yöntemi tercih edilir [40-47].



Şekil 3.1. Tiyokolşikosidin molekül formülü.

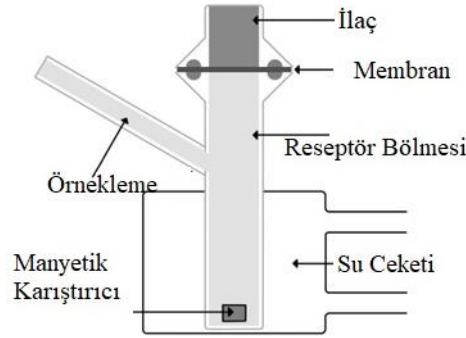
Tiyokolşikosid, kas spazmları ile ilişkili semptomların tedavisinde kullanılır [48]. Güçlü konvülsan aktiviteye sahiptir ve nöbet geçirmeye eğilimli bireylerde kullanılmamalıdır. Etki şekli, kemokin ve prostanoid üretiminin modülasyonunu ve eklem iltihabının

başlatılmasına ve güçlendirilmesine müdahale eden nötrofil ve endotelyal hücre yapışma moleküllerinin inhibisyonunu içerir. Tiyokolşikosid, artrit tedavisinde, ilk gün 8 mg' a eşdeğer olağan dozda, günde 12-16 mg' a kadar oral olarak verilen bir kas gevşeticidir.

İskelet kası gevşeticilerin yan etkileri şunları içerebilir: Uyuşukluk, bulanık veya çift görme, kabızlık veya ishal, baş dönmesi ve uyuşukluk, baş ağrısı, mide ekşimesi, hıçkırık ve mide bulantısı, uykusuzluk, mide krampları, titreme, kusma, halsizlik ve uzun süreli kullanımın ardından olası bağımlılık, ışığa duyarlılık reaksiyonları verir [49].

3.2. FRANZ DİFÜZYON HÜCRESİ

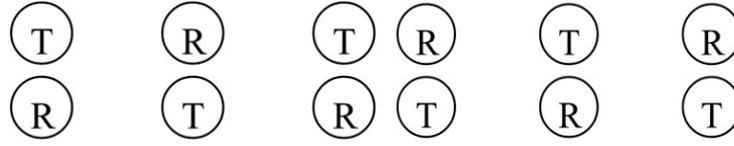
In vitro geçiş çalışmalarında kullanılan cihazlardan biri de Franz tipi difüzyon hücresidir. Bunlar ya ısıtma ceketleri yardımı ya da su banyosuna oturtularak sabit sıcaklıkta çalıştırılırlar. Bir membran, reseptör bölmesini, Franz hücresine giren maddeyi tutan donör bölmesinden ayırır. Franz difüzyon hücresinin şematik gösterimi Şekil 3.2' te verilmiştir.



Şekil 3.2. Franz Tipi Difüzyon Hücresi.

Difüzyon hücreleri, yaklaşık 0,5 – 10 mL' lik reseptör odası hacimlerine ve yaklaşık 0,2 – 2 cm²' lik açıkta kalan membranların yüzey alanlarına sahip, inert adsorbe etmeyen malzemeden oluşmalıdır [50]. İnsan derisi ile yapılacak çalışmalarda 9 mm çaplı Franz Difüzyon Hücresi ideal seçenektir; yapay membranlarda ise en iyi seçenek 15 mm çaplı Franz Difüzyon Hücresi' dir. Test uygun sayıda (en az altı) membran ile gerçekleştirilmelidir [51]. Aparatın her çalışması için, karşılaştırılan iki ürün altı hücreye Şekil 3.3' teki gibi test T ile referans ilaç ise R ile gösterildiği gibi atanmalıdır. Cilt geçirgenliğini değerlendirmek için Franz Difüzyon Hücresinin kullanımı; cilt, ilaç ve formülasyon için temel bilgiler sağlar. Yalnızca yeni formülasyonların tasarımı ve geliştirilmesinde değil, aynı zamanda toksisite taraması [51] ve kalite kontrolü için de

oldukça faydalıdır. Difüzyon hücresi, yarı katı dozaj formlarından ilaç salınımını ölçmek için güvenilir ve tekrarlanabilir bir araçtır.



Şekil 3.3. (T) Geliştirilen ilaç ve (R) Referans ilacın Franz Difüzyon Hücrelerine yerleştirilen konumları.

3.2.1. Reseptör Sıvısı

Test maddesini çözündürmek için yeterli kapasiteye sahip olması gereken reseptör sıvısı, uygulama zamanından reseptör sıvısının toplanmasının sonuna kadar derinin alt tarafı ile temas halinde tutulur. Reseptör sıvısının sıcaklık kontrolü deney boyunca çok önemlidir. Difüzyon hücresindeki cilt yüzeyi sıcaklığı, *in vivo* cilt sıcaklığı olan 32 ± 1 °C’ de tutulmalıdır. Statik hücrelerdeki reseptör sıvısı çalışma boyunca iyice karıştırılmalıdır. Reseptör sıvısının bileşimi, test maddesinin difüzyon kapsamını sınırlamayacak şekilde seçilir; yani araştırılan kimyasalın reseptör sıvısındaki çözünürlüğü ve stabilitesi garanti edilmelidir.

Bazen uzun süreli cilt nüfuz deneyleri için çözeltiye bir koruyucunun (sodyum azid) eklenmesi tavsiye edilir [52]. Kullanılan farklı ortamlar arasındaki ayırt etme gücündeki önemli farklılıklar Baert tarafından gösterilmiştir [53]. Hidrofilik bileşikler için yaygın olarak salin veya tamponlu salin solüsyonları kullanılır. Sıvı analitik prosedüre müdahale etmemelidir. Genel bir kural olarak reseptör sıvısının fizyolojik bir pH’ ya sahip olması gerekir. Deney sırasında kabarcık oluşumunu önlemek için reseptör sıvısının gazı giderilmelidir. Dermal absorpsiyonun eksik tahmin edilmesine neden olabilecek serbest difüzyon sürecine müdahaleyi en aza indirmek amacıyla, reseptör sıvısındaki nüfuz eden madde miktarı hiçbir zaman doyumluk seviyesinin % 10’ unu aşmamalıdır. Madde, *in vitro* test ve sonraki analiz süresince reseptör sıvısında stabil olmalıdır [53].

3.2.2. Membran Seçimi

Membran tipi ve kalınlığı önemli faktörlerdendir. Geçirgenlik testi için tercih edilen membran, cihazın veya dozaj formunun uygulanacağı biyolojik dokudur. Biyolojik cilt hazır olarak bulunamadığından topikal farmasötiklerin geçirgenlik testinde çoğunlukla

sentetik polimer membranlar kullanılır.

Amerika Birleşik Devletleri Sağlık Bakanlığı' na bağlı Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), basit, gözenekli sentetik membranların, bir destek görevi gördükleri, ancak hız sınırlayıcı engeller olmadıkları için topikal farmasötik performansını değerlendirmek için uygun olduğunu öne sürmüştür. Kullanılan sentetik membranların iki işlevi vardır. Bunlar; derinin simülasyonu ve kalite kontrolüdür.

Membranlar mümkün olan en düşük difüzyon direncini sunmalı ve hız kontrol edici olmamalıdır [54]. Sentetik membran kullanmanın mantığı, sentetik membran kullanımının hayvan veya insan derisiyle ilişkili değişkenliği en aza indirmesidir [55].

Çizelge 3.1' de Franz Difüzyon Hücre deneylerinde kullanılan sentetik membranları göstermektedir. Membran kalınlığı, nominal gözenek boyutu, gözeneklilik ve bireysel üreticiler de gösterilmektedir. 'Polimerik' ve 'selüloz' bazlı olarak gruplandırılırlar.

Çizelge 3.1. Selüloz bazlı ve polimer bazlı sentetik membranlar ve özellikleri.

Membran	Polimer	Gözenek boyutları (µm)	Kalınlık (µm)	Marka	Referans numarası
Selüloz Bazlı	Rejenere Selüloz	0,45	170	Sartorius	1120 18406 2005453
Polimer Bazlı					
Durapore	PVDF (Poliviniliden florür)	0,45	125	Merck Durapore	GVWP04700- R0SB67826
Supor	PES (Hidrofilik polietersülfon)	0,45	140	Pall- Supor	60172- 27574621
Nylone	Nylone (Hidrofilik Nylon Net filtre)	0,45	170	Merck	HNWP04700- R9KA74223
Tuffryn	PS (Poli sülfon)	0,45	145	Pall	60669

Genellikle selüloz ve poliakrilonitril membranlarda esnekliği artırmak, kırılabilirliği azaltmak için gliserol kullanılır, gliserol ilaç difüzyon katsayısını değiştirebilir ya da reseptör kısma geçerek membran gözeneklerini tıkamaktadır. Bu durumu önlemek için membran uzun süre reseptör içerisinde bekletilerek gliserol yok edilebilir. Hidrofilik bir membran kullanılması durumunda da membranın sıvıya doyurulmuş olduğundan emin olunmalıdır. Gerekirse 12 saate kadar kullanılacak reseptör içerisinde bekletilerek ortama doyurulmalıdır.

3.2.3. Numune Alma Süresi

Numune alma süresi maruz kalma süresini yansıtmalıdır. Bu nedenle maruz kalma süresi, ürün için birkaç dakikadan, maksimum 24 saate ve endüstriyel ürünler için 6 – 8 saate kadar değişebilir [56]. Numune alma sıklığı, absorpsiyon derecesinin/oranının ve absorpsiyon profilinin belirlenmesine olanak tanıyacak şekilde seçilmelidir. Emilim kinetiğini tahmin edebilmek için, en erken zaman noktası (30 dakika) dahil olmak üzere en az 6 uygulama sonrası zaman noktası için kinetik ölçümlerin elde edilmesi gerekir.

3.2.4. Difüzyon Hızı

Difüzyon hızını etkileyen en önemli parametre konsantrasyon farkıdır. Konsantrasyon farkı ne kadar büyük olursa difüzyon hızı da o kadar fazla olur. Bu nedenle ürünün pH' sı ve ortamın pH' sı çok önemlidir. Diğer etkileyen parametrelerden biri olan sıcaklık, ne kadar yüksek olursa parçacıkların kinetik enerjisi de o kadar fazla olur, dolayısıyla daha hızlı hareket edip karışırlar. Membran yüzey alanı da hızı etkileyen parametreler arasındadır. Yüzey alanı ne kadar büyük olursa teması arttırdığından dolayı difüzyon hızı artar.

3.3. METOT VALİDASYON PARAMETRELERİ

3.3.1. Doğrusallık

Dedektör tepkisinin ölçülen analitin konsantrasyonuyla doğrudan orantılı olma derecesi analitik prosedürün doğrusallığını belirlemektedir. Bir kalibrasyon eğrisi oluşturulurken kalibrasyon standartları hedeflenen ölçüm aralığını içine almalıdır.

En az 0,95 düzeyinde düzeltme faktörü elde edilmelidir. Sıfırdan büyük 7 standarttan en az 5' i LOQ' dan büyük ve en yüksek konsantrasyon dahil olmak üzere, yukarıdaki kriterlere uymalıdır [57-58].

3.3.2. Kesinlik

Belirli koşullar altında aynı homojen numunenin çeşitli numunelerinden yapılan bir dizi ölçüm arasındaki uyum derecesi, analitik yöntemin kesinliği olarak adlandırılır. Üç doğruluk düzeyi ayırt edilebilir; tekrarlanabilirlik (t), ara kesinlik ve tekrar üretilebilirlik (R). Kesinlik araştırmaları orijinal, homojen numunelerle yapılmalıdır. Bir ölçüm dizisinin varyansı, standart sapması veya varyasyon katsayısı, analitik bir sürecin kesinliğini temsil etmek için sıklıkla kullanılır.

3.3.2.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, aynı çalışma koşulları altında kısa bir zaman aralığında yani aynı analist, aynı ekipman, kısa zaman içerisinde analiz yapma, aynı kimyasallar ve aynı laboratuvar gibi kesinliği ifade eder. Tekrarlanabilirlik aynı zamanda analiz içi kesinlik olarak da adlandırılır.

3.3.2.2. Ara Kesinlik

Ara kesinlik laboratuvar içi farklılıkları ifade etmektedir: farklı analistler, farklı günler, farklı ekipmanlar vb.

3.3.3. Geri Kazanım

Ölçülen değer doğru ya da kabul edilen değere yakınlığını gösterir. Numune ortamına sağlanan bir analitin miktarından kaynaklanan dedektör tepkisinin, saf orijinal standardın cevabına oranı, bir analitin geri kazanım oranı olarak bilinir.

3.3.4. Sağlamlık

Metot parametrelerinde yapılan küçük değişikliklerden etkilenmeden zorlu koşullarda da aynı sonucu vermesinin bir ölçüsü olarak yapılan sağlamlık, kullanım sırasındaki güvenilirliği sağlar. Çözelti stabilitesi, filtre çalışması buna örnektir.

3.3.5. Dedeksiyon Limiti

Dedeksiyon limiti, tespit edilebilecek en düşük analit miktarı olarak adlandırılır. Genellikle metotlarda LOD olarak kısaltılmış haliyle kullanılır.

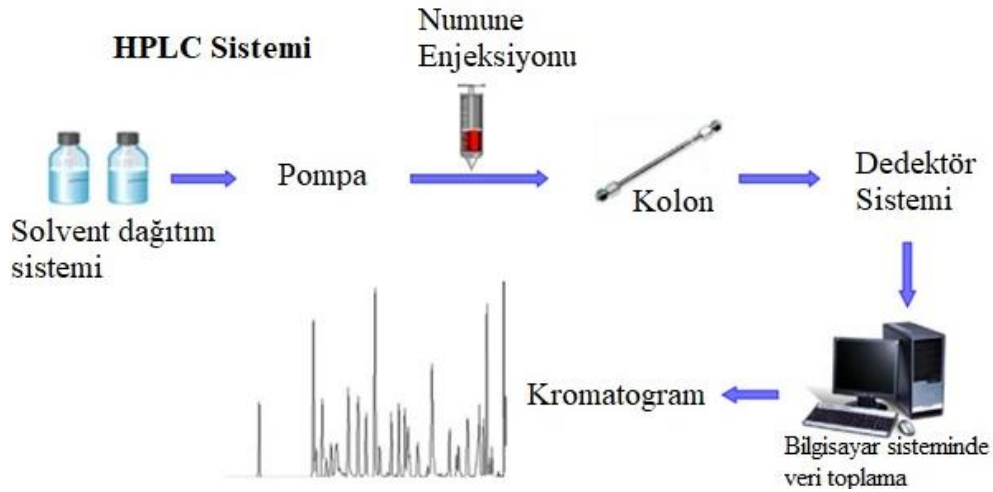
3.3.6. Tayin Limiti

Tayin limiti, kabul edilebilir tekrarlanabilirlik ve doğrulukla belirlenebilecek en düşük analit konsantrasyonunu gösterir. Literatürde LOQ olarak ifade edilir. Başka bir deyişle,

tüm analitik sistemin tanınabilir bir sinyal ve kabul edilebilir bir kalibrasyon noktası ürettiği konsantrasyondur. Özellikle safsızlıkların ve/veya bozunma ürünlerinin tanımlanması için nicelik sınırı, numune matrislerindeki düşük kimyasal konsantrasyonları için niceliksel analizlerin bir parametresidir.

4. YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

İlaç, gıda ve kozmetik dahil olmak üzere birçok farklı alanda kimyasal bileşim bilgisini derinlemesine inceleme ihtiyacı, analitik karakterizasyonu, belirli bir numunede bulunan bileşenlerin niteliksel ve/veya niceliksel tanımlanması için bir araç haline getirilmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), düşük molekül ağırlıklı maddelerden çok yüksek moleküle sahip maddelere kadar farklı özelliklere sahip bileşiklerin analizi için uygulanabilen bir ayırma tekniğidir. Bu kromatografik ayırma, hareketli bir fazda çözünmüş bir karışımın, sabit faz adı verilen başka bir malzemeden geçirilmesini içerir ve hem hareketli hem de sabit fazlar birbiriyle karışmaz. Çözünür forma geçebilen tüm bileşikler (antibiyotikler, şekerler, aminoasitler, gıda tatlandırıcıları, vitaminler, pestisitler ve renklendiricileri ve bunların türevleri vb.) bu teknik ile güvenilir ve hızlı şekilde tespit edilebilmektedir [59]. Mobil faz, dedektörler, kolon ve kolon fırını, degazör, pompa, otoörnekleyici ve enjektör cihazı oluşturan temel parçalarıdır. Analitlerin doğasına, kimyasal yapısına ve moleküler ağırlığına bağlı olarak sıvı kromatografisinin türü seçilmektedir. Bu anlamda, incelenen numunenin bireysel bileşenleriyle ilgili niteliksel ve niceliksel bilgiye olanak tanıyan farklı HPLC türleri ortaya çıkmıştır. Şekil 4.1’ de HPLC cihazının çalışma prensibi gösterilmiştir.



Şekil 4.1. HPLC cihazının çalışma prensibi.

Mobil faz, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözücü karışımlarıdır. Analizi yapılacak etkenin ve yardımcı maddelerin özellikleri, kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri gibi parametrelere mobil faz seçiminde dikkat edilmelidir.

Pompa, numuneyi ve mobil fazı dedektöre ve kolona taşıyan araçtır. Kolon, maddelerin özelliklerinden yararlanarak ayırt edilmesini sağlar. Mobil faz kolona ulaşana kadar sistemde oluşabilecek hava kabarcıkları degazör tarafından elimine edilir. Autoörnekleyici ve enjektör kullanılarak uygun hacimde numune çekilip mobil fazla birlikte kolona verilir. Dedektörler, niceliksel analize olanak sağlamak için analitleri ölçülebilir sinyallere dönüştürür. Örneğin tatlı kimyasalları araştırmak için bir kırılma indiri dedektörü(RID) gereklidir (glikoz, fruktoz, sakkaroz gibi). Ancak pestisitler, antibiyotikler ve fenolik kimyasallar gibi maddeler üzerinde yapılan araştırmalarda ultraviyole ışın dedektörü(UV) veya diyot dizili dedektörlerinden(DAD) yararlanılabilir. DAD dedektörünün UV' ye göre daha duyarlı olduğu vurgulanmalıdır [59-60].

4.1. TEMEL KROMATOĞRAFİK PARAMETRELER

4.1.1. Teorik Plaka Sayısı

Kolon verimliliği, farklı kolonların performansını karşılaştırmak için kullanılır. Muhtemelen kolon performansının en sık bahsedilen parametresidir ve teorik plaka numarası N olarak ifade edilir [61]. Plaka sayısı yüksek olan kolonlar daha verimlidir. Yüksek N' ye sahip bir kolon, belirli bir tutma süresinde, daha düşük N sayısına sahip bir kolona göre daha dar bir pike sahip olacaktır.

4.1.2. Alıkonma Faktörü

Numune bileşeninin mobil fazda kaldığı süreye göre sabit bir fazda kaldığı süreyi ölçmektedir. Alıkonma süresinin, alıkonulmamış bir tepe noktasına (t_0) ilişkin süreye bölünmesiyle hesaplanır, k ile gösterilir [61].

4.1.3. Kararlılık

Kararlılık, bir kolonun ilgilenilen pik noktalarını ayırma yeteneğini tanımlar ve dolayısıyla kararlılık ne kadar yüksek olursa, iki pik noktası arasındaki temel ayrımın elde edilmesi o kadar kolay olur. Aslına bakılırsa seçicilik, kararlılığın optimize edilmesinde en etkili araç olabilir, R_s ile gösterilir[61].

4.1.4. Kuyruk Faktörü ve Simetri Faktörü

Ölçülecek pik noktası simetrik ise simetrinin hesaplanması kromatografik sistemin kontrolünde veya karakterize edilmesinde de faydalı olacaktır. Pik simetrisindeki artış, kromatografik kararlılık ve hassasiyetteki azalmadan sorumludur.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Çalışmada in vitro permeasyon deneyleri için Hanson marka MicroettePlus model Franz Difüzyon Hücresi kullanıldı. Franz Difüzyon Hücresinde kullanılan tampon çözeltinin pH değeri İmolab markalı 7310P modeli ile kontrol edildi. Nüfuz etme yoluyla elde edilen numunelerdeki tiyokolşikosidin miktarının belirlenmesi WATERS marka 2487 seri numaralı HPLC sistemi ile doğrulandı.

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) cihazı, numuneye giren veya çıkan ısıyı ölçmektedir. Bir numunenin ısıısını bir referansa göre ölçer ve numuneyi doğrusal bir sıcaklık artışı ile ısıtır. Bu termal etkileşim endotermik veya ekzotermik olarak kendini gösterir [62]. Analizin biteceği sıcaklığı en fazla numunemizin bozunma sıcaklığından öncesinde belirlemek gerekmektedir. Bu da cihazda kirliliğe neden olur. Jel formunda geliştirilen ve referans olarak kullanılan iki ilaç üzerinde DSC analizleri yapıldı. Kalorimetrik ölçümler TA Instruments marka DSC250 model DSC cihazı kullanılarak yapıldı. Numunelerin N₂ atmosferinde 10°C dk⁻¹ sıcaklık artışıyla ölçümleri gerçekleştirildi.

Bir tür titreşim spektroskopisi olan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisinde (FT-IR) kızılötesi ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Yüksek ve hızlı çözünürlükte spektrum ve kısa sürede sonuç vermektedir. Stereokimyasal özelliklerinin bulunması, yapılarının aydınlatılması, organik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizi ve saflık kontrolü gibi amaçlarla kullanılmaktadır [63]. Agilent marka Carry 630 model FT-IR cihazı kullanılarak referans ve geliştirilen ilacın çalışmaları yapıldı.

Raman spektroskopisi yöntemi kristalleşme proseslerini izlemek ve reaksiyon mekanizmalarını ve kinetiği açığa çıkarmak için kullanılır [64]. Renishaw marka RA802 model farmasötik analizör Raman cihazı ile analizleri yapılmıştır. Referans ilaç ve geliştirilen ilaç numunesi karşılaştırılarak benzerlik değerlendirmesi yapılmıştır.

5.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

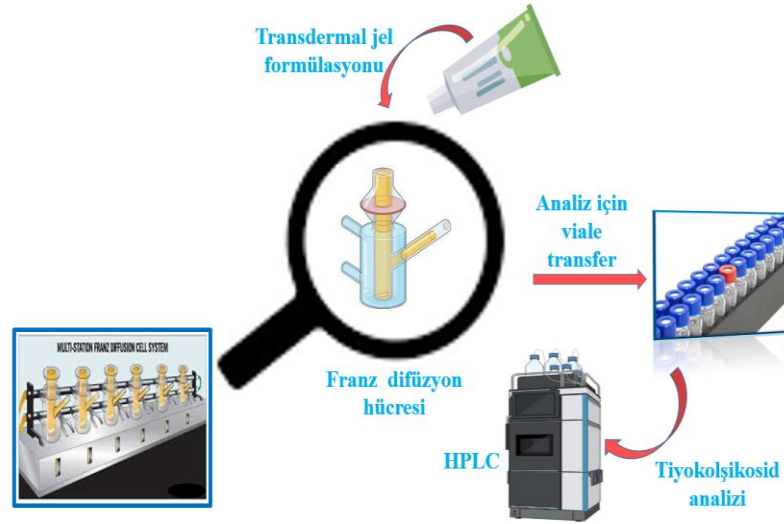
Kullanılan tüm reaktifler analitik saflıktadır. Potasyum monobazik fosfat (KH_2PO_4), potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), trifloroasetik asit, HPLC kalitesinde asetronitril ve metanol MERCK marka kullanılmıştır. Kullanılan reaktifler, % 96 ila 99.7 değişen derecelerde saflığa sahiptir. Çözeltilerin filtrelenmesinde 0,45 mm' lik politetrafloroetilen (PTFE) filtreler kullanıldı (Millex Millipore, İstanbul, Türkiye). Ultra saf su, Sartorius marka su arıtma cihazı (Sartorius Arium, ABD) kullanılarak elde edildi. Tiyokolşikosid standardı (Seri No: M062300088) INDIA GLYCOLS' tan satın alındı ve çalışmalarda kullanıldı. Ticari olarak temin edilebilen, tiyokolşikosid etken maddesini içeren jel formundaki referans ilaç Düzce' deki (Türkiye) bir eczaneden temin edilmiştir. Satın alınan tiyokolşikosid standardı ile laboratuvar ortamında yeni formülasyona sahip jel formunda geliştirilen bir ilaç kullanıldı. Ticari membran olarak PALL Supor 450 membran disk filtre 0,45µM 47 mm, düz (REF:60173), PALL HT-450 Tuffryn 100/PK membran Filtre 0,45µM 47 m (Ref: T42575), Sartorius Rejenere Selüloz (RC) 0,45 Mm özellikteki membran filtreleri Franz difüzyon hücresi deneylerinde (Ref: 1122 18406 2201853) kullanıldı.

5.3. HPLC CİHAZININ ÇALIŞMA KOŞULLARI

Yöntem	: HPLC
Dedektör	: PDA
Kolon	: ACE 5 C18 150 x 4.6mm, 5µm (veya eşdeğeri)
Dalga boyu	: 280 nm
Akış hızı	: 1.2 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	: 50 µL
Kolon sıcaklığı	: 25°C
Numune sıcaklığı	: 25°C
Akış süresi	: 10 dakika
Tampon çözelti	: Saf suyun pH'ı 2.7 ±0.05' ye trifloroasetik asit ile ayarlanır.
Hareketli Faz	: Tampon çözelti: Asetonitril (83:17)
Seyreltme çözeltisi	: Tampon çözelti: Metanol (500 : 500)

5.4. GELİŞTİRİLEN PROSEDÜR

Franz Difüzyon Hücresi analizinde kullandığımız pH 7,4 ortamı, 1 litre saf su içerisinde 8,4 gram sodyum klorür, 1,44 gram disodyum hidrojen fosfat, 0,24 gram potasyum monobazik fosfat ile 0,2 gram potasyum klorür çözünerek hazırlanır. Membranlar, reseptörün etkili difüzyon alanını kaplamaya yetecek kadar dairesel diskler halinde kesildi ve daha sonra en az 6 saat boyunca reseptör sıvısında ıslatıldı. Reseptör üzerine yerleştirilmeden önce bir kez reseptör sıvısı ile durulandı. Üreticinin belirttiği gibi, Franz Difüzyon Hücresine parlak tarafı yukarı bakacak şekilde uygulandı, üzerine disk yerleştirildi. Disk' in ortasına taşmayacak şekilde numune tüpten sıkıldı ve üzeri kapalı bir sistem olacak şekilde Franz Difüzyon Hücresi aparatlarıyla kapatıldı. Şekil 5.2' de Franz Difüzyon Hücresi çalışma prensibi gösterilmiştir. Franz Difüzyon Hücresi başlatılarak 30.dakika, 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat ve 6. saat numuneler çekildi. Çekilen numuneler HPLC sisteminde analiz edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Analiz bitiminde ise sistem etkenin çözücüsü olan metanol ve ultra saf su ile yıkandı.



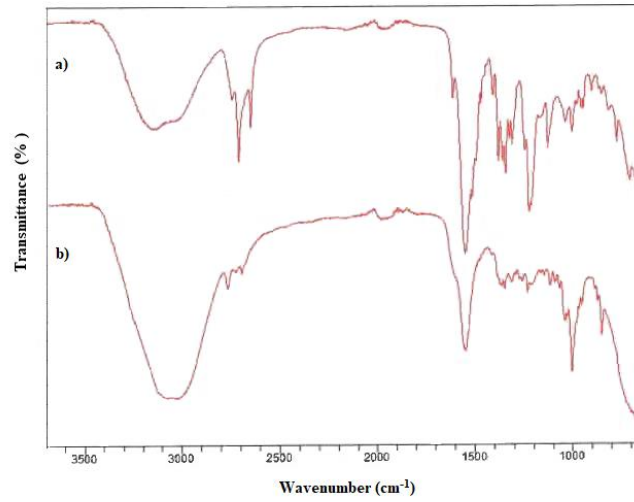
Şekil 5.1. Franz Difüzyon Hücresi kullanan bir transdermal ilaç dağıtım sisteminden tiyokolşikosid nüfuzu.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1. KARAKTERİZASYON

6.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analiz Sonuçları

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), tiyokolşikosid ve yardımcı maddeler arasındaki kimyasal etkileşimlerin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. FT-IR spektrumunda görülen soğurma bandları bize yapıda bulunan fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. Referans ve geliştirilen jel ilacın FT-IR spektrumları Şekil 6.1’ de gösterilmektedir. FT-IR spektrumları incelendiğinde geliştirilen jel ilaç örneğinde tüm bandların mevcut olduğu görüldü. Spektrumda jel ilacın yapısında bulunması gereken fonksiyonel grupların parmak izi tanımlama pikleri görülmektedir. Bu tepe noktaları tüm karakteristik etkileşim spektrumlarında gözlemlenebilir. FT-IR spektrumundaki 1647 ve 1525 cm^{-1} ’ deki karakteristik fonksiyonel pikler, tropan halkasındaki C=O ve amid gruplarına karşılık gelir. Ayrıca O-H gerilme titreşimine karşılık gelen genişleme bandı 3200 ile 3600 cm^{-1} arasında gözlenmektedir. Ayrıca 2953 cm^{-1} ’ deki pik yapıda alifatik C-H gerilme gruplarının varlığına işaret etmektedir.

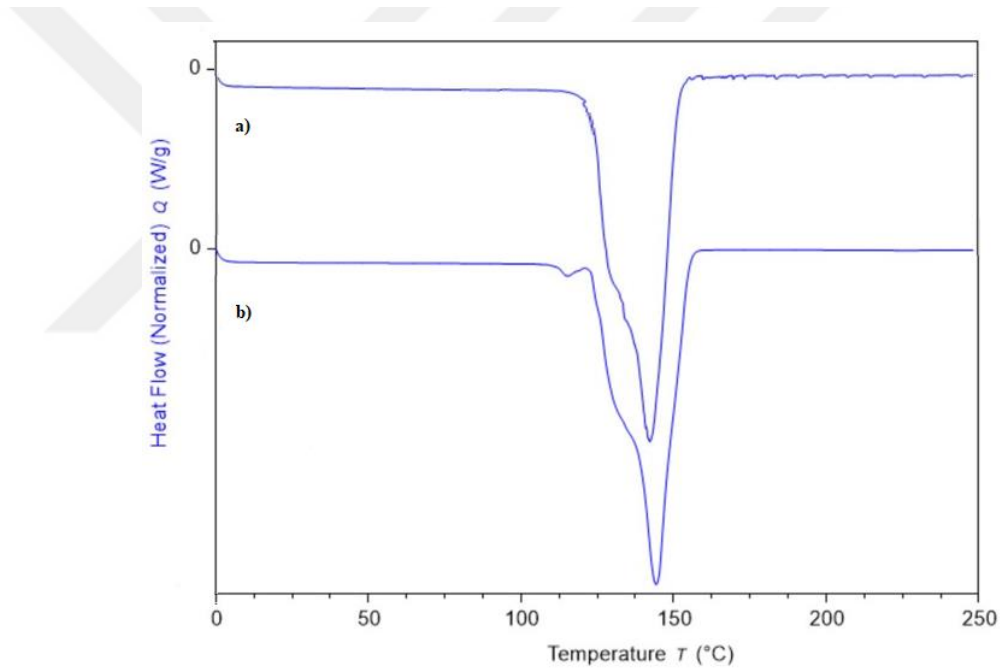


Şekil 6.1. a) Referans ilacın ve b) geliştirilen ilaç numunesinin FT-IR spektrumları.

6.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analiz Sonuçları

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi, endotermik/ekzotermik pikler, erime, salınım ve tiyokolşikosid ile ürün arasındaki uyumluluk hakkında bilgi sağlayarak hızlı kanıt sağlamaktadır. Şekil 6.2, geliştirilen jel ilacın ve referans ilacın DSC termogramlarını göstermektedir. DSC termogramları hem yeni bir pikin yokluğunu hem de karakteristik bir endotermik pikin varlığını gösterir.

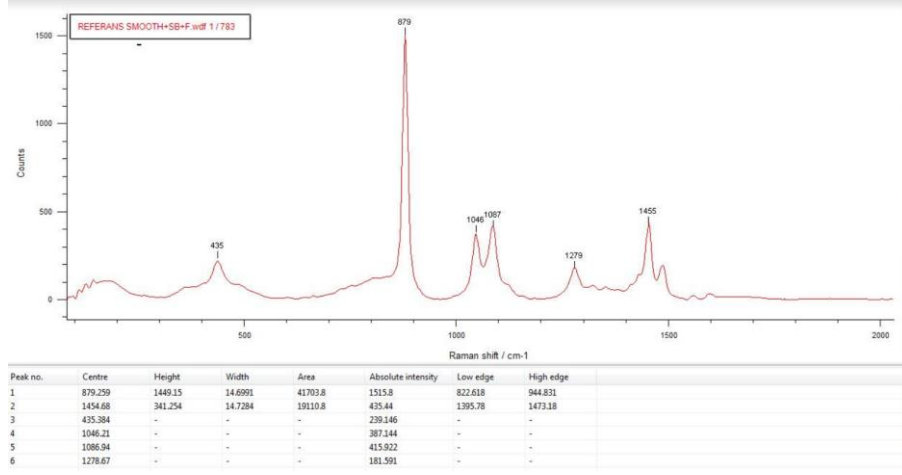
Bu pik, aktif madde tiyokolşikosid ile ilaç içeriği arasında herhangi bir uyumsuzluk olmadığını gösterir. DSC termogramlarında maksimum 144,3 °C olan endotermik bir tepe noktası erimeden kaynaklanmaktadır. Analiz sonuçları incelendiğinde geliştirilen jel ilaç ile referans ilacın termogramlarının uyumlu olduğu görülmektedir [65-67].



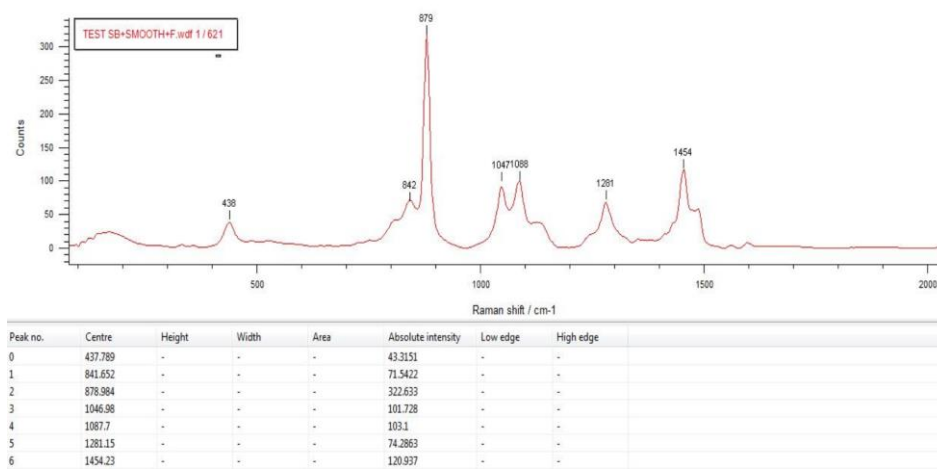
Şekil 6.2. a) Referans ilacın ve b) geliştirilen ilaç numunesinin DSC termogramları.

6.1.3. Raman Spektroskopisi Analiz Sonuçları

Şekil 6.3 ve 6.4' te gösterilen geliştirilen jel formuna sahip ilaç ve referans ilaca ait raman spektrumları gösterilmektedir. Spektrumlar incelendiğinde, analiz sonucunda elde edilen piklerin iki ilaç için benzer oldukları ve referans ilacın spektrumunda görülen farklı piklerin ise içeriğindeki farklı yardımcı maddelerden kaynaklandığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.3. Referans ilacın Raman spektrumu.

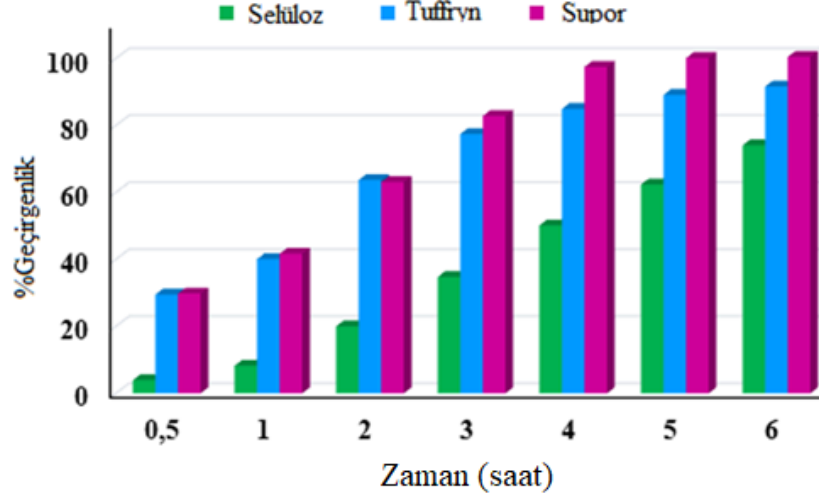


Şekil 6.4. Geliştirilen ilacın Raman spektrumu.

6.2. GELİŞTİRİLEN PROSEDÜRÜN OPTİMİZASYON PARAMETRELERİ

6.2.1. Membranın Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi

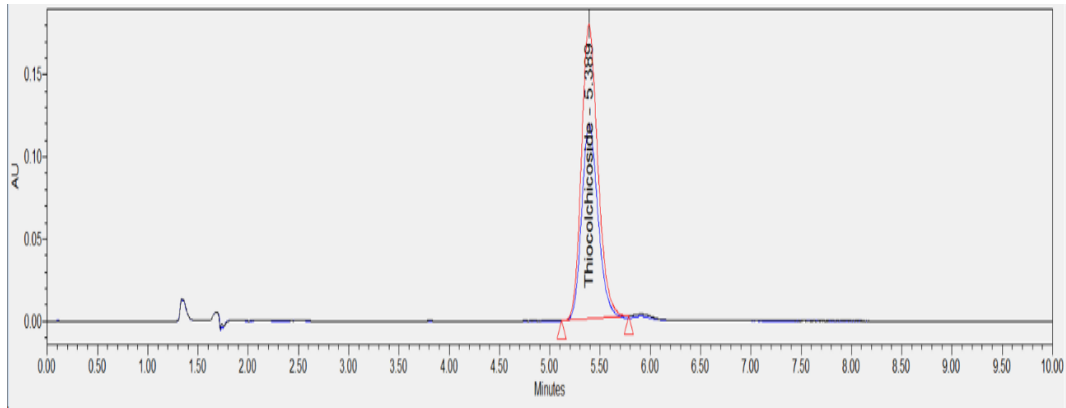
Çalışmada farklı özelliklere sahip üç farklı membran kullanılmıştır. Bu membranların *in vitro* geçirgenliğinde pH 7,4 ortam çözeltisi, 600 rpm karıştırma hızı, 32 °C sıcaklık ve 400 mg tiyokolşikosid optimum parametreler kullanılarak referans ilaçla ne kadar benzer sonuçlar elde edildiği belirlendi. Şekil 6.5 incelendiğinde, Selüloz, Tuffryn ve Supor membranlarından formülasyonu geliştirilen ilaçtaki tiyokolşikosidin geçirgenliği referans ilaçla karşılaştırıldığında membranlar arasındaki geçirgenlik farklılıkları görülmektedir. Şekil 6.5’ te görülebileceği üzere en iyi geçirgenlik Supor membran kullanıldığında elde edilmiştir, dolayısıyla çalışmaya Supor membran kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 6.5. Membranın tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi (Optimizasyon koşulları: ortam pH: 7.4, karıştırma hızı: 600 rpm, numune alma süresi: 6 saat, sıcaklık: 32 °C, tiyokolşikosid miktarı: 400 mg).

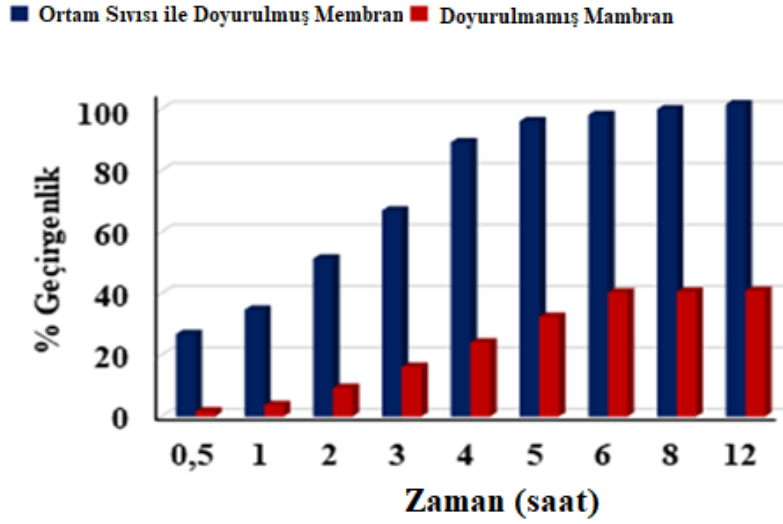
6.2.2. Membran Doyurulmasının Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi

Franz hücre çalışmalarındaki en kritik parametrelerden biri membranın yeterli ortam solüsyonuyla doyurulmasıdır. Ortam solüsyonuyla doyurulmuş membranın referans ilaca daha benzer olduğunu ve doymuş membran ile yapılan çalışma 6 saatlik doyurma süresinin yeterli olduğu tespit edildi. Bu nedenle çalışmada membran doygunluk süresi 6 saat olarak belirlendi. Membran için analiz başlamadan önce ortamda bekletilmeden, 3 saat ve 6 saat bekletilerek elde edilen sonuçlar incelendi. Şekil 6.6’ da 3 saat membran doyurulması sonucunda geliştirilen ilaç ve referans ilacın alan karşılaştırması verilmiştir.



Şekil 6.6. 3 saat membran doyurulması sonucunda geliştirilen ilaç ve referans ilacın alan karşılaştırması.

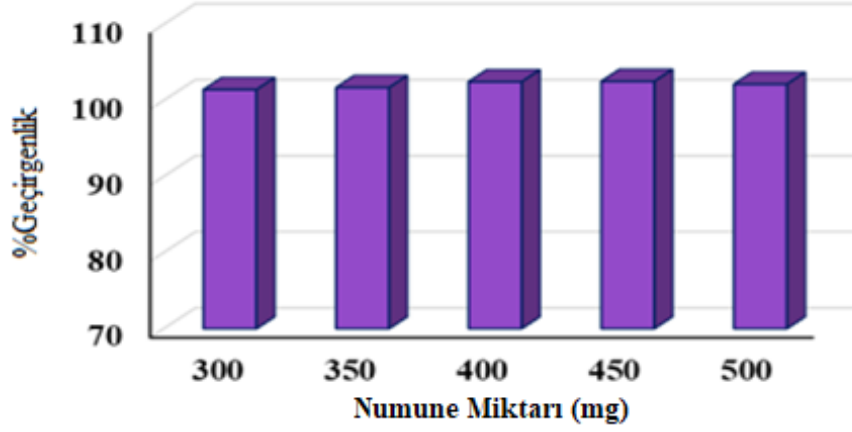
Şekil 6.7’ de ortam solüsyonuyla doyurulmuş membranın referans ilaca daha çok benzediği görülmektedir. Doymuş membran ile yapılan çalışma, 6 saatlik duygunluk süresinin yeterli olduğunu gösterdi. Bu nedenle çalışmada, membran doygunluk süresi 6 saat olarak belirlendi.



Şekil 6.7. Ortam solüsyonuyla doyurulmuş ve doyurulmamış membranların tiyokolşikosid geçirgenliği üzerindeki etkisi. (Optimizasyon koşulları: Supor membran, çözelti pH: 7,4, karıştırma hızı: 600 rpm, numune alma süresi: 6 saat, sıcaklık: 32 °C, tiyokolşikosid miktarı: 400 mg)

6.2.3. Numune Miktarının Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi

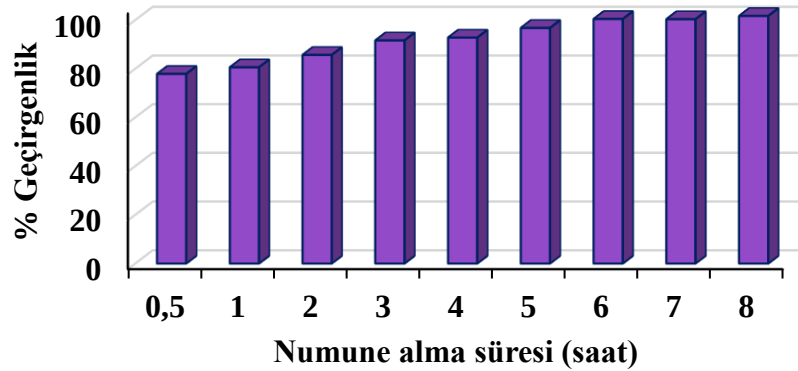
Etkisi incelenen bir diğer parametre ise Franz Difüzyon Hücrelerine yerleştirilen numune miktarıdır. 300 ila 500 mg arasında değişen numune miktarları disk ortasına yerleştirildi ve bunun tiyokolşikosid geçirgenliğini etkileyip etkilemediği incelendi. Şekil 6.8 incelendiğinde, Franz Difüzyon Hücrelerine yerleştirilen numune miktarının hiçbir etkisinin olmadığını belirledi. Bu nedenle çalışmada optimum numune miktarı olarak 400 mg tiyokolşikosid numunesi seçildi ve kullanıldı.



Şekil 6.8. Numune miktarının tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi (Optimizasyon koşulları: Supor membran, ortam pH: 7.4, karıştırma hızı: 600 rpm, numune alma süresi: 6 saat, sıcaklık: 32 °C).

6.2.4. Karıştırma Süresinin Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi

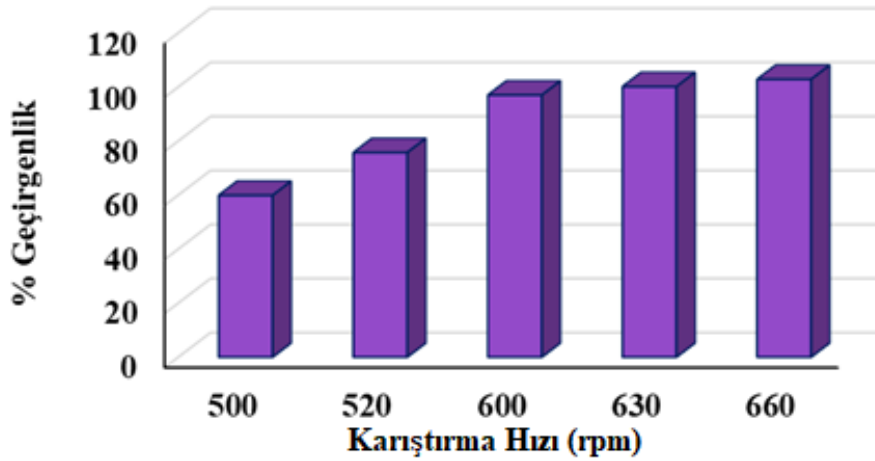
Referans ilaç ile geliştirilen ilaç numunesinin geçirgenliğini etkilediği düşünülen karıştırma süresi değerlendirildi. Belirlenen ideal koşullar altında tiyokolşikosid miktarı 0,5 ila 8 saat arasında değişen sürelerde ölçülmüş ve referans ilaca benzerliği tespit edilmiştir. Şekil 6.9’ da görüldüğü gibi membrandan hücreye geçen etken miktarı 6 saat ve daha uzun sürede değişmedi. Referans ilaç ile benzer olduğundan çalışmanın karıştırma süresi için 6 saatin yeterli olduğu tespit edildi ve karıştırma süresi 6 saat olarak belirlendi.



Şekil 6.9. Karıştırma süresinin tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi (Optimizasyon koşulları: Supor membran, ortam pH: 7.4, karıştırma hızı: 600 rpm, membran doyurma süresi: 6 saat, sıcaklık: 32 °C, tiyokolşikosid miktarı: 400 mg)

6.2.5. Karıştırma Hızının Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Etkisi

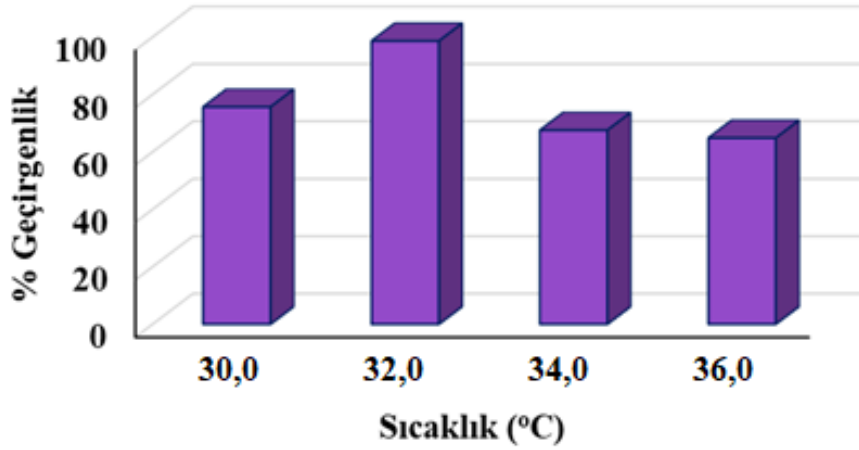
Karıştırma süresi belirlendikten sonra bir diğer parametre ise karıştırma hızının etkisinin incelenmesidir. Bu parametre için karıştırma hızı 500 ile 660 rpm arasında değiştirilerek tiyokolşikosidin geçirgenliğindeki değişim araştırıldı. Şekil 6.10 incelendiğinde, 600 rpm’ de karıştırıldığında referans ilaçla benzerliğin % 100’ e ulaştığı görülmektedir. Bu nedenle çalışma karıştırma hızı olarak 600 devir/dakika tercih edilmiştir.



Şekil 6.10. Karıştırma hızının tiyokolşikosid geçirgenliğine etkisi (Optimizasyon koşulları: Supor membran, ortam pH: 7.4, numune alma süresi: 6 saat, sıcaklık: 32 °C, tiyokolşikosid miktarı: 400 mg).

6.2.6. Tiyokolşikosid Geçirgenliğine Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığın tiyokolşikosidin permeasyonuna etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada gerekli sıcaklık, vücut sıcaklığı olan 32 °C olarak belirlendi. Tiyokolşikosid geçirgenliği, sıcaklıklar 30 ila 36 °C arasında değiştirilerek farklı sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Şekil 6.11, referans ilaca karşı en iyi geçirgenliğin 32 °C vücut sıcaklığında elde edildiğini göstermektedir. Bu nedenle çalışmada optimum sıcaklık 32 °C olarak belirlenmiş ve kullanılmıştır.



Şekil 6.11. Tiyokolşikosid geçirgenliğine sıcaklık etkisi (Optimizasyon koşulları: Supor membran, ortam pH: 7,4, karıştırma hızı: 600 rpm, numune alma süresi: 6 saat, tiyokolşikosid miktarı: 400 mg)

6.3. HPLC METOT VALİDASYONU

Bu çalışmada, ticari bir referans ilacın ve tiyokolşikosid etken maddesini içeren bir jelin *in vitro* permeasyon çalışmaları için analitik bir yöntem geliştirildi. Kromatografik yöntem için doğrusalılık, hassasiyet, doğruluk, dedeksiyon limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) parametreleri doğrulanmıştır. Analiz sonuçları, analitik prosedürlerin, ilaç alanında dünyadaki kuralları belirleyen Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) validasyonu:metin ve metodoloji Q2(R1) kriterleri dikkate alınarak belirlenmiştir [68-70].

Çalışılan çözücü ve geliştirilen ilaç numunesinin içerisinde tiyokolşikosidi tam olarak çözeltiye alıp alınmadığının kontrolü için doğruluk çalışması yapılmıştır. Üretim sırasında oluşacak hatalardan kaynaklı miktar tayini sonucundaki sapma ve varyasyonları tespit edebilmek adına bu çalışma % 30 ile % 120 geri kazanım aralıklarında yapılmıştır. Geri kazanım sonuçları % 99,85 ile %100,08 aralığındadır. Doğrusallık çalışması için, 0,078 ile 40,0 µg/mL arasında değişen yedi tiyokolşikosid standardı hazırlandı. Elde edilen alanlar doğrultusunda doğrusal grafik oluşturuldu ve buna bağlı olarak değerlendirme yapıldı. Regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı sırasıyla $y = 56778285,0642x + 2317,8268$ ve 0,9995' dir. Bu analitik yöntemin kesinliği için aynı konsantrasyonda hazırlanan 5 farklı numune çözeltisinin sonuçları arasındaki bağıl standart sapma (%RSD) değerinin % 3' ten az olduğu belirlendi.

Doğruluk ve geri kazanım çalışmalarında % 100 olarak belirlenen değerin konsantrasyonu 26 µg/mL’ dir. Bu değerin yüzdeleri oranlanarak diğer konsantrasyon değerleri belirlendi. Analitik yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için doğrusal bölgede dört farklı konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltilerin % geri kazanım değerleri hesaplandı. % 100-% 102 aralığında elde edilen veriler yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır. LOD ve LOQ değerlerini belirlemek için sinyal/gürültü (S/N) kullanıldı. S/N, gürültünün LOD’ sinin 3 katını ve LOQ’ sunun on katını ifade eder. LOD ve LOQ değerleri 0,026 µg/mL ve 0,078 µg/mL olarak hesaplandı. Çizelge 6.1’ de standart konsantrasyonu farklı yüzdelerde çalışılarak metot güvenilirliği test edilmiştir.

Çizelge 6.1. Metot doğrulama parametreleri

Validasyon Parametreleri		
	%	%
	Konsantrasyon Limiti	Sonuçlar
Doğruluk	50	101,2±0,3
	80	101,8±0,5
	100	101,1±0,9
	120	100,4±0,6
	150	100,2±0,5
Tekrarlanabilirlik	100	100,1±0,7
Geri Kazanım	30	99,9±0,1
	80	100,1±0,1
	100	100,2±0,2
	120	100,1±0,7

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İlaç sektöründe önemi giderek artan sistemlerden biri de yenilikçi ve başarılı bir araştırma alanı oluşturan transdermal ilaç dağıtım sistemidir. Bu çalışmada çeşitli ilaç uygulamalarıyla vücuda alınan etken madde olan tiyokolşikosidin Franz Difüzyon Hücresi ile geçirgenliği, jel formunda geliştirilen ilacın ve referans ilacın belirlenen zaman aralıklarında geçirgenliğinin takip çalışması yapıldı. Bu yöntem bir ürünün kalite kontrolünü, doğrulanmasını ve stabilitesinin test edilmesini sağlayabilmektedir. Elde edilen sonuçlar, Franz Difüzyon Hücresi analizinde kullanılan farklı özellikteki membran denemelerinde Supor membranın en az varyasyon ve en fazla uyumlu membran olduğunu göstermiştir. Membran ve Franz Difüzyon Hücresindeki farklı tip ilaç ve etkenlerin zaman içerisinde salınması sayesinde hesaplanabilir düzeyde çalışmalara öncülük edebilecektir. İlaç etken madde transdermal difüzyonunda, insan veya hayvan derisini temsil edebileceği göz önüne alındığında, geçirgenlik çalışmalarında sentetik membranların alternatif olabileceği, zaman, maliyet, güvenilirlik ve pratiklik açısından umut verici bir çalışma olduğu ifade edilebilir. Numunelerden elde edilen sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek için analitik yöntem parametrelerinin çalışması yapılmıştır. Ayrıca tiyokolşikosid etkeni ile farklı çalışmalar mevcut olsa da jel formundaki referans ilaç ile yapılan ilk karşılaştırmalı çalışma olacaktır. Numune ve referans çözeltilerin enjeksiyonu sonucunda tiyokolşikosid için elde edilen kromatogramların 0,9995 korelasyon katsayısı elde edilen doğrusallığın kullanılan analitik yöntem için güvenilir olduğu belirlendi.

Ayrıca dedeksiyon limitinin 0,026 µg/mL olduğu, bağıl standart sapma değerlerinin % 3' ün altında olduğu ve doğruluk değerlerinin % 100 ile % 102 arasında olduğu gözlemlendi. Elde edilen bu değerler çalışmanın doğruluğunu ve güvenilirliğini kanıtlamaktadır. Ayrıca yöntem, çok fazla işlem adımı gerektirmemesi, az malzeme tüketmesi ve toksik çözelti kullanımını gerektirmemesi hızlı bir şekilde uygulanabilmesi nedeniyle çevre dostudur.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, doğrulama parametreleri ile kontrol edilen HPLC metodu ile desteklenen Franz Difüzyon Hücresi analizinde Geliştirilen ilaç ile referans ilacın en benzer profili veren membranın Supor olduğu bulunmuştur. Ayrıca FT-IR, DSC

ve Raman gibi farklı analiz yöntemleri ile çalışma sonuçları desteklenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde benzer çalışmalar için yol gösterici niteliktedir.

8. KAYNAKLAR

- [1] A. Nuray, (2024, Mart) “İlaç Etkileşimleri”, *Ankara Üniversitesi açık ders malzemeleri*, [Çevrimiçi] Erişim: <http://www.acikders.ankara.edu.tr>.
- [2] Konukoğlu, D., “İlaç ve toksinlere yönelik atık yönetimi”, *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çevre Bilimi Tehlikeli Atık Birimi*, ss. 1, 19(Kasım), 2013.
- [3] M. Yılmaz, N. Güler, S. Kocabaş, & G. Güler, “Bir grup kadının ilaç kullanımı ile ilgili bazı davranışları: Akılcı mı?”, *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, sayı 33, ss. 266–267, 2018.
- [4] M. Trellu, A. Filali-Ansary, D. Françon, R. Adam, P. Dubruc, & J. P. Thénod, “New metabolic and pharmacokinetic characteristics of thiocolchicoside and its active metabolite in healthy humans”, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, c. 18, ss. 493–501, 2004.
- [5] E. Pişkin, “Transdermal Sistemler’ in Kontrollü İlaç Serbestleştiren Sistemler”, *Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, 1989.
- [6] F. Acartürk, İ. Ağabeyoğlu, N. Çelebi, T. Değim, Z. Değim, T. Doğanay, & S. Takka, “Modern Farmasötik Teknoloji”, *Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını*, ss. 337-347, 2009.
- [7] I. T. Değim, “New tools and approaches for predicting skin permeability”, *Drug Discovery Today*, c. 11, sayı 11-12, Haziran, 2006.
- [8] J. L. Zats, & G. P. Kushla, “Gels”, *Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems*, c. 1, ss. 495–510, 1988.
- [9] S. Zorin, F. Kuylenskierna, & H. Thulin, “In vitro test of Nicotine's permeability through human skin”, *Risk evaluation and safety aspects. in. occupational hygiene*, ss. 405–413, 1999.
- [10] M. Siewart, J. Dressman, & C. K. Brown, “FIP/AAPS guidelines to dissolution/In vitro release testing of novel/special dosage form”, *The American Association of*

Pharmaceutical Scientists, c. 4, sayı 7, 2003.

[11] C. T. Ueda, V. P. Shah, K. Derdzinski, G. Flynn, H. Maibach, M. Marques, H. Rytting, S. Shaw, K. Thakker, & A. Yacobi, “Topical and Transdermal Drug Products”, *Pharmacoepial Forum*, ss. 750–764, 2009.

[12] Supac-ss non-sterile semisolid dosage forms. scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing and controls. in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation, *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, ss. 19–24, Mayıs, 1997. [Çevrimiçi] Erişim: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/supac-ss-nonsterile-semisolid-dosage-forms-scale-and-post-approval-changes-chemistry-manufacturing>

[13] H. Ceylan, M. Tezcan, M. A. Korkut, & P. Çıvrıllı, “Kimyasal maddeler”, *Dokuz Eylül Üniversitesi*, 2016.

[14] G. C. Ceschel, P. Maffei, S. Porzio, G. Melillo, G. F. Caselli, & M. C. Dragani, “Clavenna, G. In Vitro Permeation Screening of a New Formulation of Thiocolchicoside Containing Various Enhancers”, *Drug Delivery*, c. 9, sayı 4, ss. 259–263, 2002.

[15] M. Artusi, P. Santi, P. Colombo, & H. Junginger, “Buccal delivery of thiocolchicoside: in vitro and in vivo permeation studies”, *International Journal of Pharmaceutics*, c. 250, sayı 1, ss. 203–213, 2003.

[16] P. Gayatri, M. Ajihta, P. Kiran, & Y. Madhusudan Rao, “Chemical permeation enhancers for transdermal delivery of thiocolchicoside: assessment of ex-vivo skin flux and in-vivo pharmacokinetics”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2017.

[17] J. A. Bouwstra, & P. L. Honeywell-Nguyen, “Skin structure and mode of action of vesicles”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, c. 54, sayı 1, ss. 41–55, 2002.

[18] J. Kielhorn, S. Melching-Kollmuss, & I. Mangelsdorf, “Dermal absorption””, *WHO/IPCS Environmental Health Criteria*, Şubat, 2005.

[19] S. C. Wilkinson, R. P. Chillcott, & S. Price, (2008) “Principles and practice skin toxicology”, *John Wiley & Sons: Chichester*, ss. 69-82.

[20] G. Merey, “İlaç kimyası ve endüstriyel uygulamaları”, *Hitit Üniversitesi Farmakoloji I*, ss. 11–18, 2006.

- [21] S. Adepu, & S. Ramakrishna, “Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions”, *Molecules*, sayı 3, ss. 41–46, 2021.
- [22] O. Ozgur, & O. Ozguner, (2020) “Farmasötik Teknoloji I”, *Ege Üniversitesi Yayınları*.
- [23] N. Thakur, B. Kaur, C. Sharma, & M. Goswami, “Evaluation of the dermal irritation and skin sensitization due to thiocolchicoside transdermal drug delivery system”, *International journal of health sciences*, c. 6, ss. 3057–3066, 2022.
- [24] M. Paradkar, & S. Vaghela, “Thiocolchicoside niosomal gel formulation for the pain management of rheumatoid arthritis through topical drug delivery”, *Drug Delivery Letters*, sayı 8, ss. 159–168, 2018.
- [25] Y. Rao, P. Gayatri, M. Ajitha, & P. Kumar, “Chemical permeation enhancers for transdermal delivery of thiocolchicoside: assessment of ex-vivo skin flux and in-vivo pharmacokinetics”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, sayı 10, ss. 3827-3835, 2017.
- [26] L. Allen, & H. Ansel, (2013)“Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”, *Lippincott Williams & Wilkins*, c. 10.
- [27] P. Panda, & A. Sahu, “Permeation enhancers for transdermal drug delivery: strategies and advancements focusing macromolecules”, *International journal of pharmaceutical sciences research*, c. 6, sayı 11, 2023.
- [28] R. Saudagar, & P. Gangurde, “Formulation, development and evaluation of film-forming gel for prolonged dermal delivery of miconazole nitrate”, *Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences*, sayı 8, ss. 19–29, 2017.
- [29] R. H. Guy, J. Handgraft, & D. A. Bucks, “Transdermal drug delivery and cutaneous metabolism”, *Xenobiotica*, c. 17, sayı 2, 1987.
- [30] Y. Yang, P. Manda, N. Pavurala, Y. S. Krishnaiah, & M. A. Khan, “Development and validation of in vitro–in vivo correlation (IVIVC) for estradiol transdermal drug delivery systems”, *Journal of Controlled Release*, sayı 210, ss. 58–66, 2015.
- [31] A. Arunachalam, M. Karthikeyan, D. V. Kumar, M. Karthikeyan, M. Prathap, S. Sethuraman, S. Ashutoshkumar, & S. Manidipa, “Transdermal drug delivery system: a review”, *Journal Of Current Pharma Research*, sayı 1, ss. 70-75, 2010.

- [32] A. D. Mali, “An updated review on transdermal drug delivery systems”, *Skin*, c.1, ss. 234–244, 2015.
- [33] G. M. Shingade, “Review on: recent trend on transdermal drug delivery system”, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, c. 2, ss. 62–75, 2012.
- [34] A. V. Patel, & B. N. Shah, “Transdermal drug delivery system: a review”, *Pharma Science Monitor*, sayı 9, ss. 378–390, 2018.
- [35] P. Chinchole, S. Savale, & K. Wadile, “A novel approach on transdermal drug delivery system”, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, sayı 5, ss. 932–958, 2016.
- [36] D. D. Biradar, & N. Sanghavi, “Technologies in transdermal drug delivery system: a review”, *Small*, sayı 6, ss. 528–541, 2014.
- [37] P. M. Satturwar, S. V. Fulzele, & A. K. Dorle, “Evaluation of polymerized rosin for the formulation and development of transdermal drug delivery system: a technical note”, *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, c. 6, ss. E649–E654, 2005.
- [38] M. A. Kassem, M. H. Aboul-Einien, & M. M. El Taweel, “Dry gel containing optimized felodipine-loaded transferosomes: a promising transdermal delivery system to enhance drug bioavailability”, *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, c. 19, ss. 2155–2173, 2018.
- [39] Y. Yi-Qun, Y. Xue, X. Wu, & Y. Fan, “Enhancing Permeation of Drug Molecules Across the Skin via Delivery in Nanocarriers: Novel Strategies for Effective Transdermal Applications”, *Frontiers*, 2021.
- [40] F. Bigucci, A. Abruzzo, B. Saladini, T. Cerchiara, B. Luppi, & M. C. Gallucci, “Development and characterization of chitosan/hyaluronan film for transdermal delivery of thiocolchicoside”, *Carbohydrate Polymers*, c. 130, ss. 32–40, 2015.
- [41] M. Artusi, P. Santi, P. Colombo, & H. E. Junginger, “Buccal delivery of thiocolchicoside: in vitro and in vivo permeation studies”, *International Journal of Pharmaceutics*, c. 250, ss. 203–213, 2003.
- [42] G. C. Ceschel, P. Maffei, S. Porzio, G. Melillo, G. F. Caselli, & M. C. Dragani, “In vitro permeation screening of a new formulation of thiocolchicoside containing various enhancers”, *Drug Delivery*, sayı 9, ss. 259–263, 2002.

- [43] M. Artusi, S. Nicoli, P. Colombo, R. Bettini, A. Sacchi, & P. Santi, “Effect of chemical enhancers and iontophoresis on thiocolchicoside permeation across rabbit and human skin in vitro”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 93, ss. 2431–2438, 2004.
- [44] C. Aguzzi, S. Rossi, M. Bagnasco, L. Lanata, G. Sandri, F. Bona, F. Ferrari, M. C. Bonferoni, & C. Caremella, “Penetration and distribution of thiocolchicoside through human skin: comparison between a commercial foam and a drug solution”, *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, sayı 9, ss. 1185–1190, 2008.
- [45] S. Bhamburkar, S. Khandare, S. Patharkar, & S. Thakare, “Thiocolchicoside: An Updated Review”, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, c. 12, ss. 213–218, 2022.
- [46] M. Carta, L. Murru, P. Botta, G. Talani, G. Sechi, P. De Riu, E. Sann, & G. Biggio, “The muscle relaxant thiocolchicoside is an antagonist of GABAA receptor function in the central nervous system”, *Neuropharmacology*, c. 51, ss. 805–815, 2006.
- [47] M. Trelu, A. Filali-Ansary, D. Françon, R. Adam, P. Lluet, C. Dobruc, & J. P. Thénot, “New metabolic and pharmacokinetic characteristics of thiocolchicoside and its active metabolite in healthy humans”, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, c. 18, ss. 493–501, 2004.
- [48] Government of India, Ministry of Health & Family Welfare; The Indian Pharmacopoeia Commission, *Indian Pharmacopoeia*, c. 3, 2010.
- [49] A. R. Umarlar, S. R. Bavaskar, & P. N. Yewale, “Thiocolchicoside As Muscle Relaxant: A Review”, *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2011.
- [50] K. R. Brain, K. A. Walters, & A. C. Watkinson, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, ss. 161–187, 1998.
- [51] Opinion on basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 51. European Commission, Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), c. 7, Haziran, 2010.
- [52] S. Bodé, B. Baert, M. Vangele, J. Lambert, C. Burvenich, G. Sseggers, & B. De Spiegeleer, “Stability of the OECD model compound benzoic acid in receptor fluids of Franz diffusion cells”, *Die Pharmazie*, c. 62, sayı 6, ss. 470, 2007.
- [53] B. Baert, J. Boonen, C. Burvenich, N. Roche, F. Stillaert, P. Blondeel, J. Van Boxclaer, & B. A. De Spiegeleer, “New discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals”, *Journal of Pharmaceutical*

Sciences, c. 62, sayı 6, ss. 218–230, 2010.

[54] Non-sterile Semisolid Dosage Forms. Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, ss. 19–24, 1997. [Çevrimiçi] Erişim: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/supac-ss-nonsterile-semisolid-dosage-forms-scale-and-post-approval-changes-chemistry-manufacturing>

[55] V. P. Shah, J. Elkins, J. Hanuz, C. Noorizadeh, & J. P. Skelly, “In vitro release of hydrocortisone from topical preparations and automated procedure Drug Discovery Research, ss. 55–59, 1991.

[56] Skin absorption: in vitro method, *Organisation for economic co-operation and development guideline for the testing of chemicals*, ss. 1–8, Nisan, 2004. [Çevrimiçi] Erişim: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en#page1

[57] ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, “Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, European Medicines Agency, 1995. [Çevrimiçi] Erişim: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>

[58] J. Gilbert, & H. Z. Şenyuva, (2006) “Metot geliştirme ve validasyonu için basit kullanım klavuzu”.

[59] A. Ş. Bengü, “HPLC Tekniği ve kullanım alanları”, *Bingöl Üniversitesi Sağlık Dergisi*, c. 2, sayı 1, ss. 64–69, 2021.

[60] B. Dsa, B. Richards, D. Vishwanath, & N. Amreen, “Stability indicating RP-HPLC method development and validation of Terbinafine in pure and pharmaceutical formulations”, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, ss. 102–106, 2020.

[61] R. Panchumorthy, S. Anusha, U. A. Kumar, & S. Kommanaboina, “Fundamental Chromatographic Parameters”, *Department of Pharmaceutical Analysis and Quality Assurance, Vignan Pharmacy College*, 2019.

[62] M. Certel, & Z. Ertugay, “Differential Scanning Calorimetry(DSC) ve yöntemin genel karakteristikleri”, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknoloji Bölümü*, 1991.

- [63] T. Büyüksırt, & H. Kuleaşan, “Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Ve Gıda Analizlerinde Kullanımı”, *Gıda*, c. 29, sayı 4, ss. 235–241, 2014.
- [64] M. A. Akçe, & Y. K. Kadioğlu, “Raman Spektroskopisinin İlkeleri ve Mineral Tanımlamalarında Kullanılması”, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2010.
- [65] H. Annepogu, H.A. Ahad, & D. Nayakanti, “Determining the best poloxamer carrier for thiocolchicoside solid dispersions”, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 17, ss. 372–377, 2020.
- [66] N. Thakur, B. Kaur, M. Goswami, & C. Sharma, “Compatibility studies of the Thiocolchicoside with Eudragit RLPO”, *Combination Drug Therapy, Eudragit E100 and Eudragit L100 using thermal and non-thermal methods*, c. 10, sayı 1, 2021.
- [67] R. R. Joshi, & K. R. Gupta, “Solid-state characterization of thiocolchicoside”, *International Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences*, c. 4, ss. 1441–1450, 2013.
- [68] G. A. Shabir, “Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration”, *The US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization*, ss. 57-66, 2003.
- [69] Validation of Compendial Procedures, The United States Pharmacopeia and National Formulary, *United States Pharmacopeia*, 2015. [Çevrimiçi] Erişim: http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c1225.html
- [70] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human*, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hale KARAGÜZEL

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya	Düzce Üniversitesi	2024
Lisans	Kimya Müh.	Gazi Üniversitesi	2018
Lise	Sayısal	Düzce 15 Temmuz Şehitler Lisesi	2012

TEZDEN ÇIKAN YAYIN

- H. Karagüzel, A. Dalmaz, S. Sivrikaya Özak (2024). Investigation of Permeability of Thiocolchicoside Through Transdermal Drug Delivery System Using Franz Diffusion Cell, *Sakarya University Journal of Science*, In Press.