



ScienceDirect'te bulunan içerik listeleri

Eczacı İlişkilerindeki Sonuçlar

dergi ana sayfası : www.elsevier.com/locate/rinphs

Ağızdan ilaç vermede hümkik maddelerin karşılaştırılması değerlendirilmesi

Mohd. Aamir Mirza ^A, Niyaz Ahmad ^A, Suraj Prakash Agarwal M. ^A,
Danish Mahmood ^B, Khalid Anwar ^C, Z. İkbāl ^{BİR}^A Eczacı İlişkiler Bölümü, Eczacı İlişkiler Fakültesi, Jamia Hamdard, Yeni Delhi 11006, Hindistan^B Eczacı İlişkiler Fakültesi, Eczacı İlişkiler Anabilim Dalı, Jamia Hamdard, Yeni Delhi, Hindistan^C Eczacı İlişkiler Bölümü, Eczacı İlişkiler Fakültesi, Al-Kharj Üniversitesi, Suudi Arabistan

Makale Bilgisi

Makale Geçmişi:

3 Haziran 2011'de alındı
Revize edilmiş formda alındı

8 Haziran 2011

14 Haziran 2011'de kabul edildi

12 Temmuz 2011'de çevrimiçi olarak erişilebilir

anahtar kelimeler:

Şilajit

Fulvik asit

Hümkik asit

Karbamazepin ve beyin geçirgenliği

soyut

Doğal organik maddenin (NOM) ana ve biyolojik olarak en çok keşfedilen bileşenleri hümkik asit (HA) ve fulvik asittir (FA). Bir NOM kaynağı olarak rock shilajit'i araştırıldı. Öte yandan karbamazepin (CBZ) iyi bilinen bir antikonvülsan ilaçtır ve beyne erişimi sınırlıdır. CBZ'nin biyoyararlanımı ve farmakokinetik profilleri, kompleksleştirme ve farklı tekniklerle geliştirilmiştir.

Mevcut çalışmada, CBZ'nin farmakokinetik profilini ve beyne erişilebilirliği geliştirmek için CBZ için kompleks oluşturma maddesi olarak FA ve HA'nın karşılaştırılabilir yeteneklerini değerlendirmiştir. Bu iki kompleks oluşturma ajanı, kompleksleşmeye neden olma ve çözünürlüğü, geçirgenliği ve çözünmeyi arttırmaya yetenekleri gibi çeşitli indekslerde karşılaştırılmıştır. Bu çalışma aynı zamanda komplekslerin oral uygulanmasından sonra farmakodinamik ve biyokimyasal profilleri karşılaştırdı. Dondurarak kurutma, fiziksel karışım, yoğurma ve solvent buharlaştırma gibi çeşitli farmasötik tekniklerin yardımıyla, kompleksleştirme için iki molar oran (1:1 ve 1:2) seçildi ve konformasyonel analiz (moleküler modelleme) için değerlendirildi. Oluşan kompleks ayrıca diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), kütle spektroskopisi ve X-ışını kırınımı (XRD) ile karakterize edildi.

CBZ-HA ve CBZ-FA'lı kemirgenler üzerinde yapılan prelinik çalışma, antikonvülsan ve antioksidan aktiviteleri açısından kayda değer sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, CBZ-HA (1:2) diğer tüm komplekslerden daha iyi sonuç göstermiştir.

& 2011 Elsevier BV Tüm hakları saklıdır.

1. Giriş

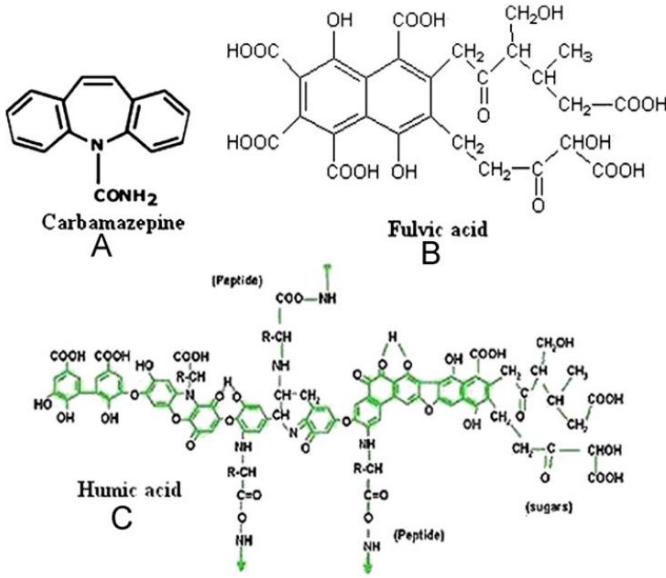
Doğal Organik Maddeler daha çok hümkik maddelerden (HS) ve hümkik olmayan maddelerden oluşur. Hümkik olmayan maddeler, şekerler, amino asitler, yağlar, vb. gibi ayrı bileşik kategorilerinden birine yerleştirilebilen tüm malzemelerdir. Hümkik maddeler, ikincil sentetik reaksiyonlarla oluşturulan nispeten yüksek moleküler ağırlıklı, kahverengi ile siyah renkli maddeler serisidir. Hümkik maddeler çoğunlukla, çözünürlük özelliklerine dayalı olarak elde edilen renkli materyali veya onun fraksiyonlarını tanımlamak için genel bir isim olarak kullanılır.

Shilajit, dünyanın birçok dağırsındaki kayalardan, özellikle de Hint Yarımadası'ndaki Himalayalar ve Hindukuş'tan çıkarılan zengin bir hümkik asit kaynağıdır [1]. Hindistan dahil birçok ülkenin geleneksel tıps sistemlerinde kullanılan canlandırıcı, canlandırıcı bir ajandır. 1980'lerde yapılan yoğun araştırmalar, esas olarak humustan (%60-80) oluşan ve benzoik asit, hippurik asit, yağ asidi, iktiyol,

ellagik asit, reçine, triterpenler, sterol, aromatik karboksilik asit, 3,4-benzokumarinler, amino asitler ve fenolik lipidler). Aktif bileşenler için taşıyıcı moleküller olarak hareket eden hümkik asit (HA) ve fulvik asit (FA) (Şekil 1B-C) ile birlikte dibenzo-alfa-pironlar gibi biyoaktif bir bileşimin varlığı, shilajite fizyolojik özellikler kazandırdı [2,3]. HA (Ort. mol. ağırlık 6500) koyu kahverengi ile siyahımsı renktedir, asidik koşullarda suda çözünmez, ancak daha yüksek pH değerlerinde çözünür. FA (Avg. mol. wt. 1200) açık sarımsı renktedir ve HA'dan [4,5] daha yüksek karboksilik grup yüzdesine sahiptir, bu da onu herhangi bir pH değerinde suda çözünür kılar.

Karbamazepin (CBZ), basit ve karmaşık nöbetler, trigeminal nevralji ve bipolar afektif bozukluğun [6] tedavisinde kullanılan iyi bilinen bir antikonvülsan ajandır ve basit ve karmaşık nöbetler için tercih edilen bir ilaçtır (Şekil 1A). CBZ pratik olarak suda çözünmez (0.200 mg/ml) ve Biyofarmasötik Sınıflandırma Sisteminin II. Sınıflında yer alır [7] ve çözünme hızı sınırlı bir absorpsiyona sahiptir [8]. Değişken absorpsiyon profiline katkıda bulunan dört polimorfik formda elde edilir. İlaçın düşük sulu çözünürlüğü ve zayıf sızınabilirliği, öngörülemez absorpsiyonuna katkıda bulunur ve bu da tutarsız biyoyararlanım sağlar [9]. CBZ yaygın olarak şu ülkelerde bulunur:

^N Sorumlu yazar. Tel.: +91 9811733016; faks: +91 11 26059663.
E-posta adresi: ziqbalh@yahoo.co.in (Z. İkbāl).



Şekil 1. (A) karbamazepin, (B) fulvik asit ve (C) hümik asidin moleküler yapıları .

4–32 saat boyunca pik plazma konsantrasyonları nı veren tablet dozaj formları . Bu nedenle, CBZ'nin çözünme özelliklerini daha da geliştirmek için absorpsiyon hızını ve derecesini artırmak ve sonuç olarak terapötik etkinliği artırmak için pek çok fırsat vardı . Çözünme özellikleri ve oral biyoyararlanım yeteneği, uygun bir kompleks oluşturma madde ile kompleks haline getirilerek artırılabilir. Bu nedenle, mevcut çalışma, CBZ'nin farmakokinetik profilini geliştirmek ve beyne erişilebilirliği artırmak için FA ve HA'nın kompleks oluşturma ajan olarak karşılaştırılması yeteneklerini değerlendirmeye çalışmaktadır .

2. Malzemeler ve yöntemler

Kaya şilajiti, Dabur Araştırma Vakfı, Ghaziabad, Hindistan'dan alındı ve doğrulandı . Karbamazepin, Novartis Pharmaceuticals Ltd., Hindistan'dan bir hediye numunesi olarak kürlendi.

Çalışma için kullanılan kimyasallar ve reaktifler ARS'nin fiyandıydı .

2.1. Kaya şilajitinden fulvik ve humik asit elde etme yöntemi

FA ve HA'yı ekstrakte etmek için daha önce Ghosal [2] tarafından açıklanan biraz değiştirilmiş bir yöntem kullanıldı . Yöntem, biyoaktif bileşenleri uzaklaştırmak için artan polariteye sahip sıvı organik çözücülerle kaya ve toz haline getirilmiş şilajitin art arda ekstraksiyonundan oluşuyordu. Tortu (març), nitrogen varlığına aralıklı çalkalama ile 0.1 N NaOH [10] içinde çözüldü.

Süspansiyon süzüldü ve süzüntü, hümik asitleri çökeltilmek için 3'ün altıda bir pH'a asitleştirildi. Süzüntü, daha sonra 0.1 N sulu sodyum hidroksit çözeltileri kullanılarak yavaş yavaş FA'ları elde etmek için makro gözenekli iyon değişim reçinesi ile çalkalandı .

2.2. Faz çözünürlüğü davranışı ve komplekslerin gelişimi

Faz çözünürlüğü çalışmaları, Higuchi ve Connors [11] tarafından bildirilen yöntemlere göre oda sıcaklığında (25°C) üç kopya halinde gerçekleştirildi. Bir dizi stoper konik şişede (100 ml) çeşitli konsantrasyonlarda (% 0.2-2 w/v) kompleks oluşturma ajanlar (FA ve HA) içeren damıtılmış suya fazla miktarda karbamazepin ilave edildi ve bir döner şişe çalkalayıcı da 48 saat çalkalandı . . bu

süspansiyonlar membran filtreden (0.45 mm) geçirildi ve damıtılmış suya aynı HA/FA konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan körlere karşı 285 nm'de bir UV spektroskopisi (Shimadzu, UV 1601) kullanılarak karbamazepin açısı analiz edildi.

2.3. İnklüzyon komplekslerinin hazırlanması

Karbamazepin kompleksleri, 1:1 ve 1:2 olmak üzere iki farklı molar oranda (ilaç:kompleksleyici ajan) farklı teknikler kullanılarak şilajitten ekstrakte edilen fulvik asit ve hümik asit ile hazırlandı . Nihai kütle, bir cam havanda toz haline getirildi ve 100 gözenekli bir elekten geçirilerek düzgün boyutlu ince bir toz elde edildi [12]. İşlemin etkisini kontrol etmek için eşit miktarda ilaç da aynı şekilde denemeden geçirildi.

2.3.1. Fiziksel karışım (PM)

Karbamazepin kompleksleri, karışımın 60 dakika boyunca temiz, kuru bir cam tokmağı ve havanda öğütülmesiyle hazırlandı ve elde edilen kütle, 100 gözenekli bir elekten geçirilerek düzgün boyutlu ince bir toz elde edildi [12].

2.3.2. Dondurarak kurutma (FD)

Tartılan miktardaki karbamazepin co-solvency (etanol) kullanılarak suda eritildi ve ayrıca kompleks yapıcı ajanların sulu çözeltileri hazırlandı . Her iki çözelti de karıştırıldı ve karıştırıldı (200 rpm, 60 dakika) ve ardından bir saat ultrasonik banyoya tabi tutuldu. Çözelti, bir Lyph-lock aparatında 24 saat süreyle donduruldu ve ardından 12 saat süreyle dondurularak kurutuldu (Dry kazan, DW-8-85 Heto Holten, Danimarka). Sükröz solüsyonu (%2 w/v) bir kriyoprotektan olarak eklendi.

Nihai kütle daha sonra bir cam havanda toz haline getirildi ve 100 gözenekli bir elekten geçirilerek düzgün boyutlu ince toz elde edildi [12].

2.3.3. Solvent buharlaşması (SE)

Hesaplanan ilaç miktarı birkaç damla etanol yardımıyla su içinde çözüldü ve sulu HA/FA çözeltisine döküldü. Çözelti daha sonra bir saat ultrasonik banyoya tabi tutuldu. Elde edilen solüsyon döner buharlaştırıcı da vakum altında kurutuldu (Hahn shin science Co., Hs-2001N, Güney Kore) ve 100 gözenekli bir elekten geçirilerek homojen boyutta ince toz elde edildi [12].

2.3.4. Yoğurma (KD)

Karbamazepinin katı kompleksleri de yoğurma yöntemiyle hazırlandı [12]. Tartılan miktardaki karbamazepin ve HA/FA temiz kuru cam havanda 15 dakika toz haline getirildi. Toz haline getirme işlemi sırasında, macunun kıvamını ayarlamak için empirik olarak etanol eklendi. Ürün harç duvarlarında kurumaya başlayana kadar toz haline getirmeye devam edildi.

Ürünler ayrıca sıcak hava etüvünde 60°C'de 30 dakika kurutuldu, toz haline getirildi, 100 gözlü elekten geçirildi ve desikatörlerde saklandı [13].

2.4. Katı komplekslerin karakterizasyonu

2.4.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) çalışması için katı kompleks, saf ilaç ve FA/HA (10 mg) numuneleri düz tabanlı bir alüminyum tavaya alınmış ve 30–350°C sıcaklık aralığında sabit bir hızda ısıtılmıştır. Diferansiyel tarama kalorimetresinde (DSC-7, Perkin Elmer Pyris 6 cihazı, ABD) referans standart olarak alümina kullanılarak nitrojenin (50 ml/dak) temizlenmesiyle 10°C/dak.

2.4.2. Fourier Dönüşümleri Kı zı lötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Karbamazepin, FA/HA ve inklüzyon komplekslerinin FT-IR spektrumları , potasyum bromür (KBr) disk tekniği kullanılarak Perkin Elmer'e kaydedildi. Beş mg önceden kurutulmuş numune, 100 mg KBr ile karıştırıldı ve bir IR hidrolik pres üzerinde bir pelet halinde sıkıştırıldı. Taban çizgisi düzeltildi ve tarama 4000–400 cm⁻¹'de yapıldı.

2.4.3. Toz X-ışını kırınımı (XRD)

Karbamazepin, FA/HA ve bunların inklüzyon komplekslerinin X-ışını kırınımı , bir X-ışını difraktometresi (PW 1830, Phillips, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Oryantasyon etkilerini azaltmak için veri toplama sırasını da numuneler (1000 mg) döndürüldü. Katı kompleks, saf ilaç ve FA'nın PXRD şablonları , 35 kV ve 30 mA'da 2θ=101 ve 701 arası nda kaydedildi.

2.4.4. Kütle spektroskopisi

Numuneler (HA ve FA), 1 mg/mL'lik bir stok yapmak için Milli-Q su içinde eritildi ve ardından Milli-Q su:metanol (50:50) içinde ilave seyreltme hazırlandı. Son olarak 100 ng/mL'lik bir konsantrasyon hazırlandı ve pozitif modda elektrosprey iyonizasyonu üzerinde kütle enjekte edildi (Snap Küttle Spektrometresi, UPLC'li Q-TOF). Kılcık, örnekleme konisi ve ekstraksiyon voltajları sırasıyla 2,51, 21 ve 5,3 birimdir. Kaynak ve desolvasyon sıcaklıkları sırasıyla 80 ve 250 1C idi. Azot gazı , sırasıyla 50 ve 600 L/h'de koni ve desolvasyon gazı olarak kullanıldı.

Tuzak çarpışma enerjisi kullanıldı (6.0 birim). Sistem, seri no. JAA 272 suları , ABD. Yazılı m MassLynx V 4.1 suları kullanıldı.

2.5. Hesaplamalı yöntemle konformasyonel analiz

3D moleküler yapı lar, Chem 3D-Ultra 8.0 yazılı m ile üretildi ve optimize edildi. Kullanılan tüm hesaplamalar geometrik optimizasyon için yapı lı rken, tüm enerji minimizasyonları RMS gradyanı 0,08'den küçük olana kadar gerçekleştirildi. Hümkik ve fulvik asitlerde moleküler modelleme için optimize edilmiş moleküler yapı lar ve kı smi atomik yükler kullanıldı . H-bağı analizi ORTEP III'e [v1.0.3] dayanı yordu.

2.6. Karbamazepinin in vitro HPLC analizi

Karbamazepin in vitro örneklerinin konsantrasyonu , kuaterner LC-10A VP pompası , SPD-10AVP kolon fı rını , değişken dalga boyu programlanabilir UV/VIS detektöründen (285 nm) oluşan bir Shimadzu LC2010 sistemi (Kyoto, Japonya) kullanılarak doğrulanmış yöntemle [14] belirlendi.), SCL 10AVP sistem denetleyicisi, 20 mL döngü, gaz giderici ve bir veri işlemcisi ile donatılı mış Rheodyne enjektör . Kromatografik ayırma, su ve asetonitrilden (60:40::su:asetonitril) oluşan bir hareketli faza sahip 5 mm parçacıklarla doldurulmuş bir LiChrosphers 100 ters fazlı C-18 kolonu (250 4.6 mm2) kullanılarak elde edildi. Mobil faz, ortam sıcaklığı nda (2572°C) 1.0 ml/dak akış hızı nda pompalandı . Eluent, 285 nm'lik bir dalga boyunda ultraviyole emilimi ile izlendi ve CBZ için tutma süreleri 4.870.35 dakika idi.

2.7. Komplekslerde karbamazepinin tayini (suda dengede)

Kompleksin fazlası 10 ml distile su içeren amber renkli şişelerde bekletildi ve termostatlı mekanik çalkalayıcı da (Grower Enterprises, New Delhi, Hindistan) 25 1C'de 5 gün karıştırıldı . Süspansiyonlar 0.22 mm filtreden geçirildi.

"Millipore" filtresi, damıtılı mış su ile yeterince seyreltilmiş ve l=285 nm'de bildirilen HPLC ile analiz edilmiştir [14].

2.8. Karbamazepinin kompleksten salınması

API (40 mg CBZ çözümü) ve inklüzyon komplekslerinin (40 mg CBZ'ye eşdeğer) ilaç salınması , USP II çözünme aparatı (Hanson Research SRS , ABD) kullanılarak 37.50.5 1C'de (75 rpm, 60 dakika) çalkalama, süspansiyonun (5 ml) diyaliz torbasına (Spectra-Por diyaliz torbası , Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 12,000–14,000 Da kesme ile) konmasıyla gerçekleştirildi. Çeşitli zaman aralıklarında çözelti içindeki ilacın konsantrasyonu, 285 nm'de HPLC ile analiz edildi. Tüm çözünme çalışmaları üç kopya halinde gerçekleştirildi. Karbamazepin miktarı , ilacın önerilen dozuna göre seçilmiştir [15]. Süspansiyon dozunda bulunan hümkik madde miktarı da izin verilen sınırlar içindeydi, yani 512 mg/kg1 vücut ağırlığı [16].

2.9. İn vitro dişüğürsak bağırsak kesesi geçirgenliği çalışması

Sıçanlara, kapaklı bir cam kap içindeki bir parça pamuk üzerine serpilmiş eterle anestezi uygulandı . Karında bir orta hat insizyonu yapıldıktan sonra, ince bağırsak iki pozisyonda kesildi: midenin yaklaşık 18 cm distalinde ve yaklaşık 30 cm'de (medial jejunum). Bu segment daha sonra çıkarıldı ve bir cam çubuğun bir ucuna ipek iplikle bağlandı ve dikkatlice çubuk üzerine ters çevrildi, salın solüsyonuyla durulandı ve sonra kesildi ve 1 ml'lik tek kullanımlık bir şişirici haznesinin ucuna sabitlendi.

Bağırsak kesesi, modifiye edilmiş KRPB tampon çözeltisi ile dolduruldu ve daha sonra sürekli olarak köpüren (%95 O₂ ve %5 CO₂) 100 ml test çözeltisi içeren banyoya yerleştirildi [17]. Stabilizasyondan sonra keseye 3 ml (yaklaşık 10 mg ilaca eşdeğer) CBZ (API), 1:2 dondurularak kurutulmuş (HA ve FA kompleksleri) ve 1:2 yoğurma (HA ve FA kompleksleri) kompleks solüsyonu ilave edildi. Tüpler 37°C'de tutuldu ve köpüren oksijen kaynağı ile 60 rpm'de sürekli çalkalandı . Çözünme medyumundan 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 saat aralıklarla 100 ml numune alındı ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Millipore filtresinden (0.45 mm) süzülödükten sonra bunlar HPLC [14] ile analiz edildi .

2.10. Maksimal Elektro Nöbet (MES) kaynaklı konvülsiyon

Deney için her iki cinsiyetten ortalama vücut ağırlığı na (20-30 g) sahip İsviçre albino fareleri kullanıldı . Hayvanlar Merkez Hayvan Evinde 2 hafta polipropilen kafeslerde büyütölerken standart hayvan yemi ve su ile beslendi. CBZ dozu literatüre göre alınmıştı r, yani MES'te hayvana %100 koruma sağlayan farelerin vücut ağırlığı 30 mg/kg [18], buna göre kompleksin dozu CBZ dozunun bir fraksiyonu (yani 1/1) olarak seçilmiştir. 3.), ilk deneylerden önce kaç göröldüğü gibi, kompleksler tek başına API'den 2-3 kat daha iyi etki gösteriyordu.

Kompleks oluşturucu maddenin antiepileptik potansiyelini kontrol etmek için dozda bulunan FA ve HA miktarı da alınmıştı r. Hayvanlar sekiz gruba ayrıldı , yani kontrol, saf CBZ, HA, FA, HA-CBZ kompleksi (1:2 dondurularak kurutulmuş, 1:2 yoğurma) ve FA-CBZ kompleksi (1:2 dondurularak kurutuldu, 1:2) yoğurma) her birinin ortalama grup ağırlığı 25 g olan 6 hayvanla. Kontrol ve farklı dozlarda kompleksler, ayrı fare grupları na MES'in indüklenmesinden 30 dakika önce verildi. Ardından, elektrokonvülsiyometre (Techno India) aracı lı ғы yla kulak klipsi elektrodu (50 mA, 0.2 s, ortalama voltaj 200–250 V) aracı lı ғы yla uyaran dizisi uygulandı . Ekstansör tonusun insidansı ve süresi not edildi. Nöbetlerin süresi (tonik-klonik konvülsiyonlar) kaydedildi [19].

İlaç ve komplekslerin çözeltileri (qs ila 5 ml) hazırlandı .

Gliserin. Bu çözeltilerden 0.2 ml farelere ağı zdan verildi. Tüm hayvan deneyleri, Jamia Hamdard Animal Ethics Committee'ye uygun olarak gerçekleştirildi.

2.11. yaşlanma çalı şması

Dondurularak kurutulmuş hüyük asit (1:1 ve 1:2) ve fulvik asit (1:1 ve 1:2) kompleksleri, oda sı caklı ğı nda hermetik olarak kapatı lı ş kaplarda 6 ay süreyle saklandı . Herhangi bir yaşlanma etkisi [20] için TLC ile analiz edildi ve taze örneklerle karşı laştı rı ldı . Daha önce bildirilen [21] mobil faz, etil asetat-toluen-metanol::7.0:2.0:1.0 (v/v) kromatogramı n geliştirilmesi için kullanı ldı . Ön kaplamalı silika jel lincosphere alüminyum levhalar 60 F254 (20 cm 10 cm: 200 mm kalı nlı k, E. Merck, Darmstadt, Almanya) kullanı ldı .

2.12. Pikrotoksin kaynaklı oksidatif stres

2.12.1. Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBAR'lar)

%10 doku homojenatı ndan 1 ml süspansiyon ortamı alı ndı . Üzerine 0,5 ml %30 TCA ve ardı ndan 0,5 ml %0,8 TBA reaktif eklendi. Daha sonra tüplerin üzeri alüminyum folyo ile kapatı larak 80 1C'deki çalkalamalı su banyosunda 30 dakika bekletildi.

30 dakika sonra tüpler çı karı ldı ve 30 dakika buzlu suda bekletildi. Daha sonra bunlar 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.

Süpernatanı n absorpsansı , uygun boşluğa karşı oda sı caklı ğı nda 540 nm'de okundu. Kır, 1 ml distile su, 0,5 ml %30 TCA ve 0,5 ml %0,8 TBA'dan oluşur. MDA konsantrasyonu, TEP [22] kullanı larak hazı rlanan standart eğriden okunacaktır .

2.12.2. Doku glutatyonu 0.02 M

EDTA'da %10'luk beyin doku homojenatı hazı rlandı ve üzerine 4 ml soğuk distile su eklendi. Vorteks karı ştı rı cı ile 10 dakika aralı klı çalkalama ile iyice karı ştı rı ldı ve daha sonra içerikler santrifüj tüplerine aktarı lacak (EDTA'da durulanmı ş) ve 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenecek.

Daha sonra 2 ml süpernatana 4 ml tris tamponu (0,4 M, pH 8,9) ile iyice karı ştı rı ldı ve üzerine 0,1 ml 0,01 M DTNB eklendi. Homojenat içermeyen bir kör reaktif karşı 410 nm'de DTNB eklendikten sonraki 5 dakika içinde absorpsans okundu [23].

2.13. Farmakokinetik çalı şması

Toplam dokuz erkek wistar sı çanı (250-300 g) alı ndı . Hayvanlar Merkez Hayvan Evinde polipropilen kafeslerde yetiştirildi ve standart hayvan yemi ve su ile beslendi. CBZ ile oral dozlamadan önce, sı çanlar gece boyunca aç bı rakı ldı . API ve kompleksler gliserin içinde dağı tı ldı ktan sonra sı çanlara 5 mg/kg vücut ağı rlı ğı CBZ'ye eşdeğer bir doz verildi. Her zaman noktası nda retro-orbital yoldan 0.25 ml kan örneği toplandı ve heparin içeren bir şişeye yerleştirildi ve işlenene kadar buzdolabı nda saklandı .

Örnekleme için seçilen zaman noktaları 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 16 ve 24 saat idi.

Karbama zepin ve ana metaboliti karbamazepin 10, 11-epoksitin sı çanda kan plazma analizi için [24] tarafı ndan aç ı klanan LC/MS/MS sistemi kullanı ldı . Yöntem, bir sı vı -sı vı ekstraksiyon prosedürü ve elektrosprey UPLC/MS/MS analizinden oluşur. Kromatografik ayı rma, Milli-Q su/asetonitril/asetik asitten (69.5:30:0.5, v/v/v) oluşan bir mobil faza sahip bir Acquity UPLC BEH C8(2.1 100, 1.7 mm) kolonu kullanı larak 5 dakika içinde sağlandı . 0.25 ml/dakika akı ş hı zı nda. Tüm bileşimler için iç standart olarak d10-Karbama zepin kullanı ldı .

Analitler, pozitif iyon modunda elektrosprey iyonizasyon sinapt kütle spektrometresi ile belirlendi. Karbamazepin

m/z 237-194, karbamazepin 10, 11- epoksit m/z 253-210 ve d10-karbamazepin m/z 247-204 taranarak izlendi. Alt kantifikasyon limiti (LLOQ) her biri için 5 ng/ml idi. 0.1 ml sı çan plazması alikuotları na dayanan analit. Analitlerin sı çan plazması ndan ekstraksiyon geri kazanı mı %84.9'un üzerindeydi. Gün içi ve günler arası analiz varyasyon katsayı ları sı rası yla %3,6-4,5 ve %2,0-3,6 aralı ğı ndaydı . 5-2000 ng/ml aralı ğı nda doğrusallı k gözlemlendi.

3. Sonuçlar ve tartı şma

3.1. Katı komplekslerin karakterizasyonu

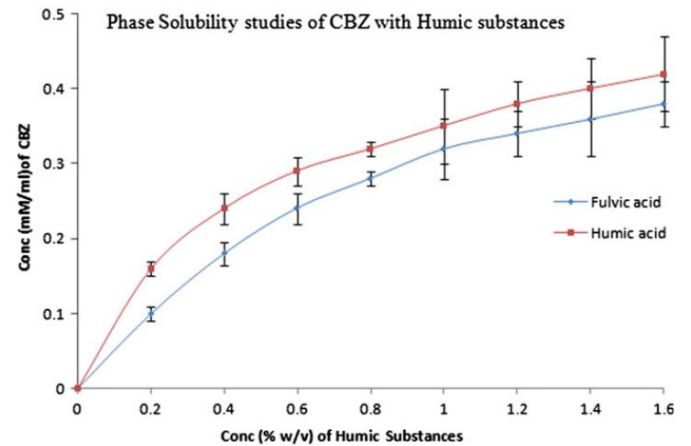
Faz çözünürlüğü çalı şmaları , hüyük maddelerin artan konsantrasyonu ile sulu ilaç çözünürlüğü için doğrusal olmayan bir ilişki (Şekil 2) ortaya çı kardı . Eğriler, farklı r değerleri ile karakteristik AN tipi idi (Higuchi ve Connors'a göre). HA-CBZ için 0,864 ve FA-CBZ için 0,916 idi. Her iki durumda da, CBZ'nin %10'lu doğrusal konsantrasyonuna daha sonra doğrusal değildi ve başlangı ç bölgelerine kı yasla CBZ'nin kompleksleştirilmesi için daha fazla hüyük madde tüketildi. Bu nedenle, kompleks oluşturma için seçtiğimiz molar oranlar, her iki kompleks oluşturuucu madde (HA ve FA) için 1:1 ve 1:2 idi.

Verilerden çı karabileceğimiz başka bir bulgu, daha yüksek H2S konsantrasyonları nda (%1-2 w/v), CBZ'nin çözünürlüğünün, sapmalar çok belirgin olduğu için çok değişken çözünürlük sergilemesidir.

Her iki kompleks oluşturuucu madde karşı laştı rı ldı ğı nda HA, Y eksenine daha fazla eğimli olduğu için daha iyi etkileşim gösteriyordu. HA'nı n daha iyi bağlanma kapasitesi, model kimyasallara birkaç kat daha yüksek bağlanma [25] gösterdiği için literatürden de aç ı kça görülmektedir . İnküzyon dı şı nda başka bir mekanizmanı n varlı ğı da elde edilen verilerden anlaş ı lmaktadır . Hüyük asitlerin yüksek moleküler ağı rlı ğı ve bazik hidrofobik yapı sı , su tarafı nda hidrofilik gruplar ve yüzeyel adsorpsiyon ve ayrı ca dahili adsorpsiyon sağlamak için yararlı hidrofobik çekirdek ile "misel" benzeri yapı ları n [5,26] oluşumunu da destekler. organik parçaları n [27].

Bağlanma sabitini ve Gibb'in serbest enerjisini bulmak için faz çözünürlük grafiği de kullanı ldı [28]. Bağlanma sabiti, $K_s = \frac{[eğim] / S_0(1 - [eğim])}{[S]}$ formülüne göre hesaplanmı ştı r , burada S_0 , hüyük maddeler olmadan karbamazepinin çözünürlüğüdür. Kapanmanı n kendiliğindenliğini ve fizibilitesini termodinamik yaklaşı mla kontrol etmek için Gibb'in serbest enerjisindeki (DG) değişiklikler hesaplandı (sabit sı caklı k ve bası nçta). Yararlı iş için mevcut olan net enerjidir.

$DG = 2.303RT \log[S_0/S]$, burada, S_0 ve S ,



Şekil 2. Oda sı caklı ğı nda (25 1C) üçlü modda HA ve FA ile CBZ'nin faz çözünürlüğü çalı şmaları .

hümik maddelerin varlığında ve yokluğunda ilaç. DG0 daha negatif hale geldikçe, reaksiyon daha uygun hale gelir. Mevcut durumda, fiziksel olgunun (CBZ'nin HS'ye dahil edilmesi) bir süreç olduğu ve değerlendirildiği varsayılabilir. Bağlanma sabitleri, HA-CBZ kompleksi için 5503.73 (M1) ve FA-CBZ kompleksi için 5410.44 (M1) olarak bulundu. Benzer şekilde, farklı kompleksler için DG0'lar Tablo 1'de gösterilmiştir.

XRD analizinden ve DG'nin olumsuz eğilimlerinden, CBZ'nin hümik maddelere hapsolmesiyle sistemdeki düzensizliğin azaldığı görülmüştür. Düzensizlikteki değişim değerlerini bulmak için entropi (DG=DHTDS) formülüne göre hesaplanmıştır. Burada DH, CBZ makromoleküle (HA ve FA) girerken entalpidaki değişiklikler van't Hoff denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm termodinamik parametreler Tablo 1'de verilmiştir. DG, DH ve DS'nin negatif değerlerinden, bu fiziksel olgunun (CBZ'nin hümik maddelere dahil edilmesi) düşük sıcaklıkta kendiliğinden olduğunu ancak yüksek sıcaklıkta kendiliğinden olmadığını söyleyebiliriz.

3.1.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Saf karbamazepinin DSC'si 189°C'de (Şekil 3) keskin bir ekzotermik tepe noktası ve literatürde bildirilen erime noktasına uygun olarak yaklaşık 156.45 J/g'lik DH gösterir [29]. Fulvik asit, 100-200 °C bölgesinde künt endoterm ve ekzoterm gösterirken, hümik asit künt endoterm ve 100-340 °C aralığında ekzoterm [30].

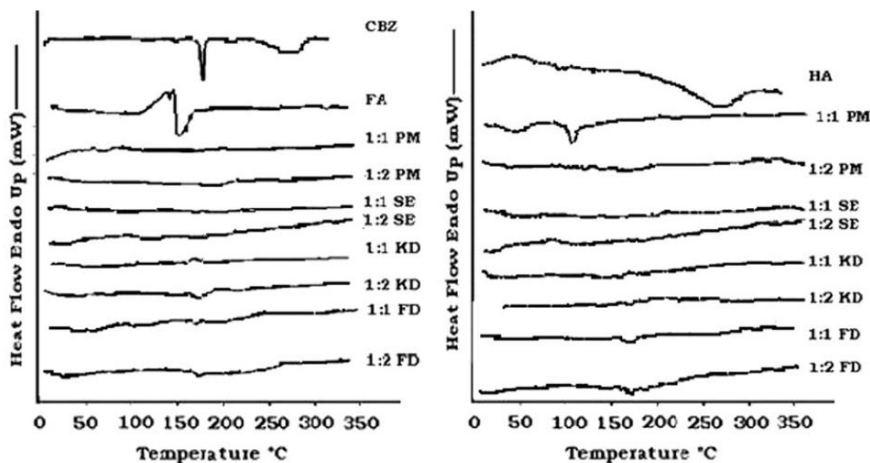
DSC analizinde, kullanılan tüm yöntemler, fiziksel karışım (1:1 HA-CBZ) hariç, komplekslerin gelişimini göstermiştir.

tablo 1

Oda sıcaklığında (25 °C) suda (pH 7) CBZ ve komplekslerinin çözünürlüğü ve termodinamik verileri.

Kompleks Çözünürlüğü	Çözünürlükteki FA artışı %	FA- için DG0 (kal)	FA kompleksleri oluştururken DH (J/g) değeri	DS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	çözünürlüğü HA kompleksinde	% CBZ'nin HA komplekslerinde çözünürlüğündeki artışı	HA- için DG0 (kal)	DH (J/g) CBZ kafesi oluşurken HA kompleksleri	DS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) FA kompleksleri oluşturduğu için CBZ kafesinin				
13:1 ÖS	94.6679.63	648.30716.19	1191.94	102.47710.21	145.22	98.49	76.4571.21	504.348715.38	1065.40	84.472.17	148.21	102.65	
1:2 ÖS	710.0372.17	1238.89	119.3274.19	843.24715.38	144.29	97.09	567.1937716.19	1123.99	141.3675.21	1017.47721.13	145.51	99.69	
1:1 GD	1329.05	137.36719.93	985.84719.73	1412.43	145.95	97.14	1429.43	157.89713.13	128805479723	872172973	2.59	148,83	97,71
1:2 GD	156.6575.01	1138.34721.13	1490.26	187.33713.23	144	94,42	1347.28	135.674.19	971.9368718.93	1404.80	176.7272.02	147,05	95,68
1:1 KD	1380.67721.19	1596.18	198.15729.73	1466.43714.2	111,85	67,80	1296.996714.2	1561.65	233.1271.35	1742.846729.73	117,21	74,07	
1:2 KD	1629.44	299.6571.35	2268.75729.73	1874.38	104,73	60,65	1725.69				111,33	68,59	
1:1 FD					107,54	62,41					104,33	60,82	
1:2 SG					107,22	58,71					102,34	56,93	

DG0, Gibb'in kalori cinsinden ifade edilen standart serbest enerjisidir. DH, J/g cinsinden ifade edilen entalpidaki değişikliklerdir. DS, kompleks geliştiği entropideki değişimdir. Tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi.

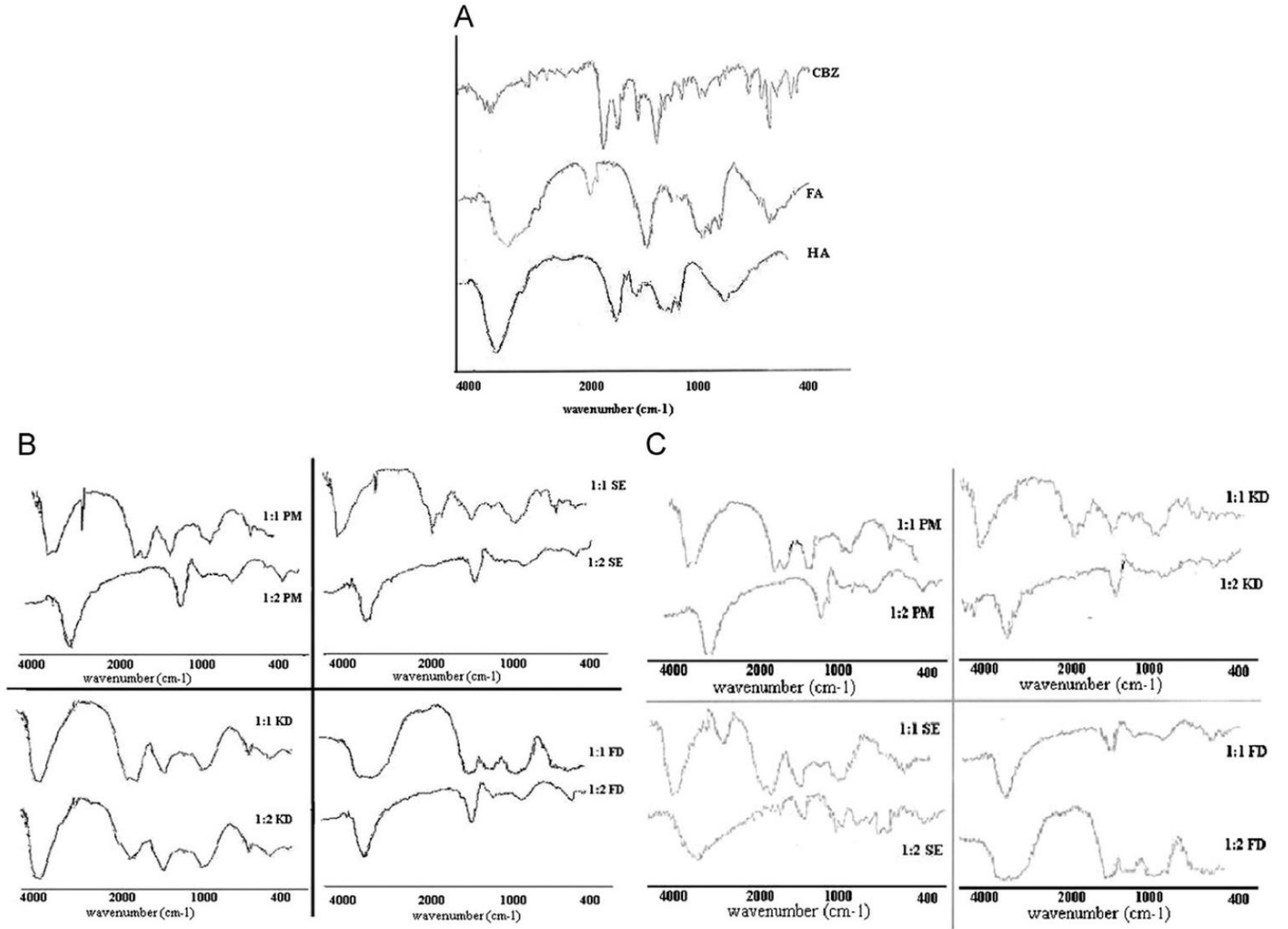


Şekil 3. CBZ, HA, FA ve farklı komplekslerin temsili diferansiyel tarama kalorimetri profilleri.

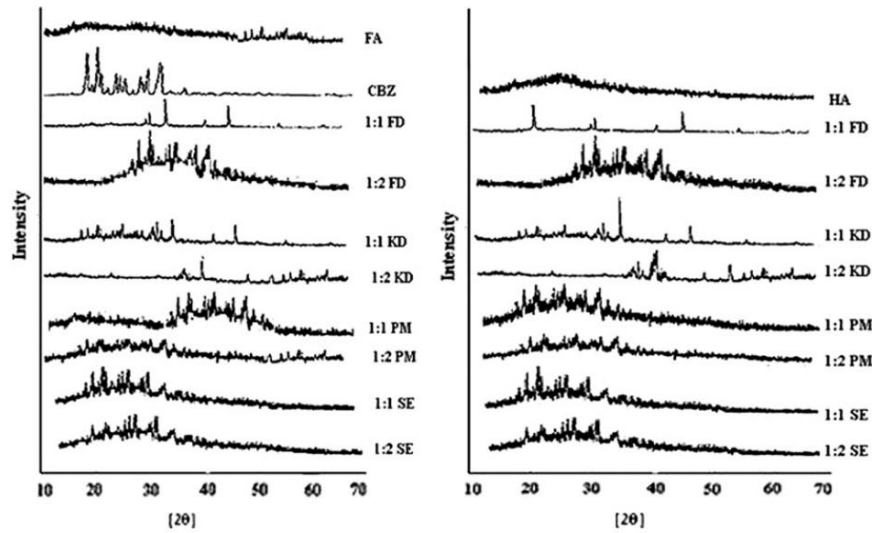
karışımı. İlaçın tepenoktaları ve kaybolması veya kayması, kompleks oluşumunun güçlü bir göstergesiydi. Fiziksel karışım yönteminde ilaç molekülünün H2S ile kompleks oluşturması yardımcı olabilecek herhangi bir çözelti ortamı yoktu. Ancak, kompleksler geliştirmek için farklı fonksiyonel gruplarla etkileşim kurulduğundan, kompleksleştirmeye yardımcı olabilecek titiz öğütme [31]. Böylece, 1:1 HA-CBZ kompleksinde bir ekzoterm gözlemlendi. Oranlar karşılaştırıldığında, termogram daha doğrusal olduğu için 1:2 daha umut vericiydi. Bu gözlem, faz çözünürlüğü çalışmalarından elde edilen verilerle uyumluydu (kompleksleyici ajanın daha yüksek konsantrasyonunda farklı mekanizmaları varlığı). Farklı kompleks oluşturucajanlar arasında, DSC analizi ile gözlemlenen önemli farklılıklar yoktu.

3.1.2. Fourier Dönüşümlü Kırmızı Işığı Spektroskopisi

FT-IR spektrumu, 1752 cm⁻¹ (C=O esnemesi), 3460 cm⁻¹ (K-H titreşimi) ve 1550 cm⁻¹ (fenil C=C esnemesi) [29] daki karbama zepin (Şekil 4A) piklerinin karakteristik piklerini gösterir. Şilajitten ekstrakte edilen fulvik asit ve hümik asidin (4A) FT-IR absorpsiyon bantları literatürde bildirilenlerle uyumlu olarak bulundu [32]. Karbamazepinin karbonil pikinin HS'nin karboksilik grubu ile etkileşimleri, CBZ'nin N-H (3460 cm⁻¹) titreşimini O-H titreşimi ile germe gözlemlendi. İlaçın olefinik ve karbonil pikleri, kompleks oluşturuca maddedeki benzer bantlarla zayıf etkileşimi gösterecek şekilde yaygın ve dağılımı (Şekil 4B ve C). Parmak izi bölgelerinin tepenoktaları (1300-400 cm⁻¹) daha azdır, bu da ilaç ile kompleks oluşturuca madde arasında daha fazla etkileşim olduğunu gösterir.



Şekil 4. (A) CBZ, HA ve FA'nın FT-IR spektrumları . (B) Farklı HA-CBZ komplekslerinin FT-IR spektrumları . (C) Farklı FA-CBZ komplekslerinin FT-IR spektrumları .



Şekil 5. İlaç, HA, FA ve farklı komplekslerin X-ray kırınım modelleri.

FT-IR spektrumlarında, etkileşimler, fiziksel karışımıyla hazırlanan ve çözücünün buharlaştırıldığı komplekslerde daha az belirgindi, bu da daha düşük derecede kompleksometrik etkileşimi gösteriyor. Öte yandan, her iki türün dondurularak kurutulmuş ve yoğurma kompleksleri

daha iyi etkileşim sergiliyorlardı. Farklı oranlar karşılaştırıldığında, 1:2 oranlı kompleksler daha dağıntılı spektrumlar ve daha yüksek derecede etkileşim sergiliyordu; aynı şekilde HA kompleksleri, FA komplekslerinden daha umut verici görünüyordu.

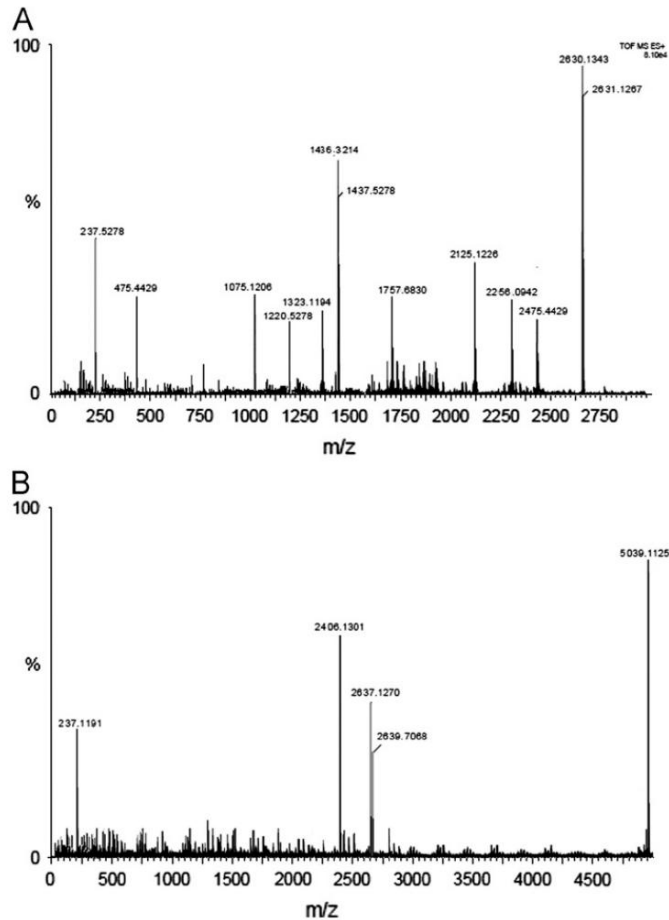
3.1.3. Toz X-ışını kırınımı

Karbamazepinin XRD'si farklı açılarda çeşitli pikler gösterir; en yoğun pikler 15.411°'de (%100), ardından 13.181° (%83), 27.841° (%66), 27.321° (%60) ve 27.661°'de (%56) gelir (Şekil 5), karbamazepinin kristal doğasını açığa çıkarır. Fulvik asidin X-ışını kırınım modelleri, 391° (%90) ve 471° (%100) açılarında zirveler gösterir, ancak doğası gereği daha şekilsizdir. Benzer şekilde HA, XRD difraktogramlarında da amorf yapı göstermiştir.

XRD çalışmalarında, tüm komplekslerde çok az kristallik gözlemlendi, ancak her iki kompleks oluşturucu ajan için dondurularak kurutulmuş ve yoğurma komplekslerinde çok daha azdır. Farklı HS'ler (HA ve FA) karşılaştırıldığında, farklı işlemler arasındaki benzerlik gözlemlendi. Farklı oranlar karşılaştırıldığında, 1:2 oranı daha iyi bir seçenek olarak ortaya çıktı yor çünkü daha iyi performans gösteren işlemlerde (yoğurma ve dondurarak kurutma) daha az kristallik ve iyi ilaç molekülü içermesi gösteriyordu.

3.1.4. Kötü spektroskopisi

Kötü spektrometrik analiz sonuçları da tatmin edici bir sonuç göstermektedir (Şekil 6A ve B). Spektrumda, moleküllerin makromoleküler ve poliyonik yapıları dikkate alındığında beklenen önemli miktarda gürültü mevcuttu. Ancak her iki kompleks türünden gelen spektrumlar, bazı ortak sonuçlara yol açıyordu. Spektrumlar, bağlı yoğunluğun yaklaşık %40'ında kompleks olmayan ilacı (m/z 237) zirvelerini gösteriyordu. Benzer şekilde, kullanılmayan kompleks oluşturucu maddeler de gözlenmiştir (hümik asit için m/z 2406.13 ve fulvik asit için 1220.52). Her iki spektrumdaki en yoğun zirveler yaklaşık 1:2 kompleksleşme oranlarıydı. 1:1 oranında her iki spektrumda kayda değer nispi yoğunlukla gözlendi. Öyle görünüyor



Şekil 6. (A) Fulvik asit-CBZ kompleksinin kötü spektrogramu. (B) Hümik asit-CBZ kompleksinin temsili kötü spektrogramu.

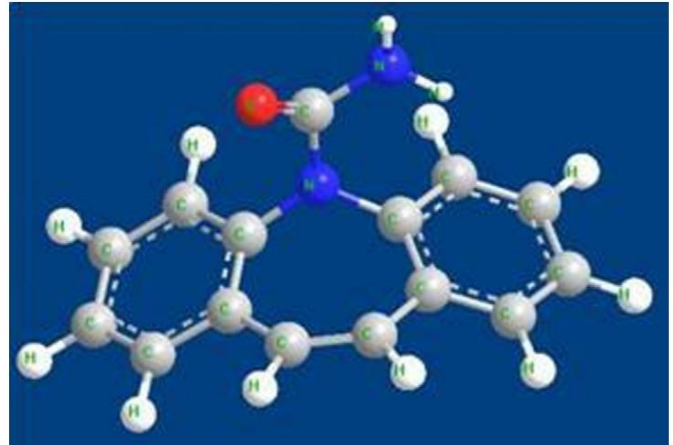
Kompleks oluşurmada tüm kompleks oluşturucu ajanların tüketilmediği ve çalışmadan hem 1:1 hem de 1:2 oranlarını elde edildiği çalışmadan elde edilmiştir. Diğer çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar, tüketilmemiş makromoleküllerin olumlu etkilerini başka bir şekilde ortaya koyduğunu gösteriyor.

3.2. Hesaplamalı yöntemle konformasyonel analiz

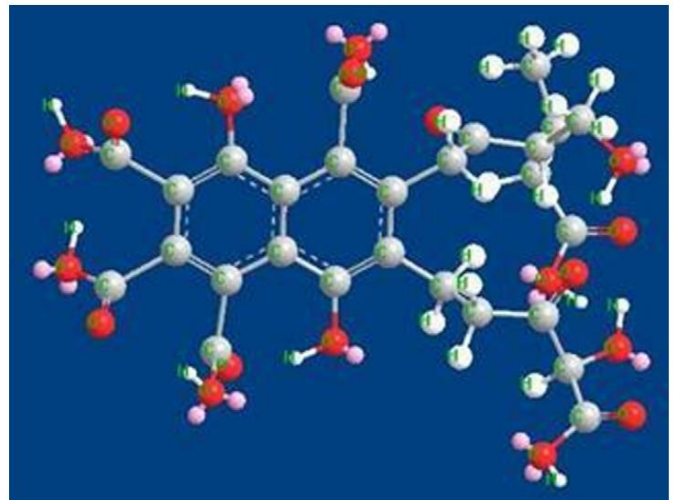
Moleküler modelleme, CBZ-HA ve CBZ-FA komplekslerinin kararlı olduğunu göstermiştir. İki kompleks arasındaki stabilizasyon enerjisindeki farklar marjinaldir. Hümik/fulvik asitlerin karbamazepin ile kompleks oluşturma yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Gözlenen moleküller arasında hidrojen bağları, molekülün kararlılığına katkı da bulunur. Şekil 7'de gösterilen karbamazepin durumunda, amid hidrojen, karbonil grubundan uzağa yönlendirilir, ancak aromatik kışılmadan birine doğru yaklaşır. Şekil 8, fulvik asidin enerjisi en aza indirilmiş yapıyı göstermektedir. Bu yapı en az beş molekülü içi H-bağı gösterir. Beş molekülü içi H-bağı ndan  OHyO tipindedir, bu da bunların güçlü H-bağları olduğu anlamına gelir. Bu hidrojen bağlarını molekülün stabilitesini arttırdığı varsayılmazken, fulvik asit ile bir ilaç kompleksi optimizasyonu, karbamazepinin fulvik asit ile güçlü bir NHyN etkileşimi ile stabilize edildiğini gösterir (Şekil 9).

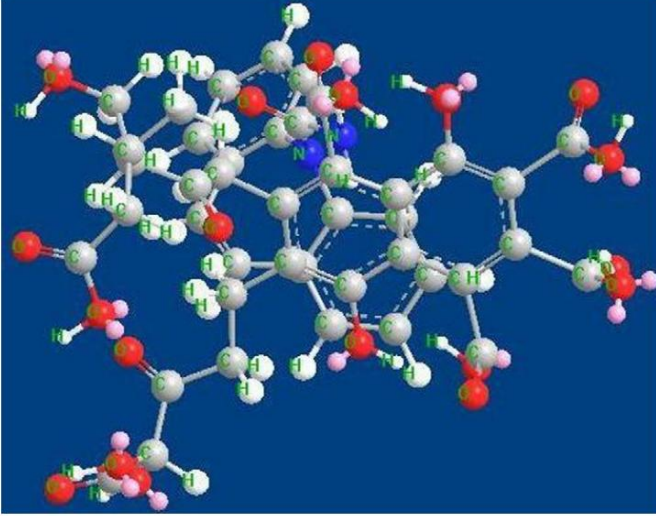
Hümik asidin yapıyı henüz tam olarak belirlenememekle birlikte, bu çalışmada olası bir yapı modellenmiştir. Hümik asit ve ilaç molekülünün toplam potansiyel enerjileri,



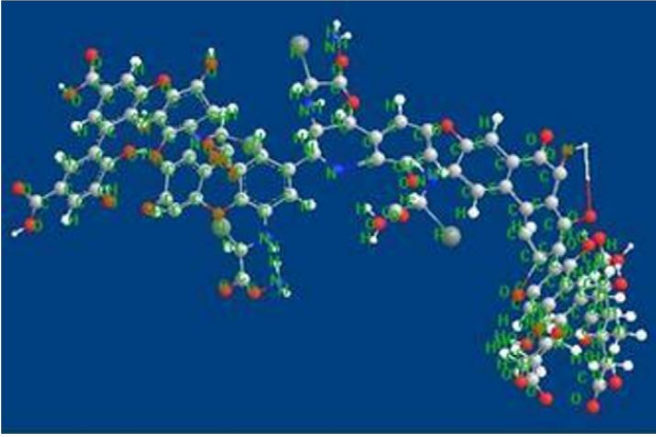
Şekil 7. Karbamazepinin enerjisi en aza indirilmiş yapıyı .



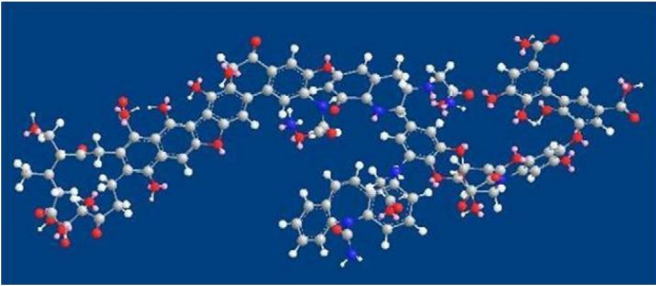
Şekil 8. Fulvik asidin enerji açısından optimize edilmiş yapıyı .



Şekil 9. Fulvik asit ile kompleks haline getirilmiş karbamazepin.



Şekil 10. Hüyük asit modelinin enerjisi en aza indirilmiş modeli.



Şekil 11. Hüyük asit ile kompleks haline getirilmiş karbamazepin.

karşı laştı rı ldi . Chem 3D-Ultra 8.0 yazı lı mı kullanı larak hüyük asidin toplam potansiyel enerjisi yaklaşı k 45,896 kcal/mol'e (Şekil 10) gelirken, bir karbamazepin ve hüyük asit kompleksi 22,584'te stabilize edilir (Şekil 11), bu CBZ olarak daha kararlı dı r yalrı z. Karbamazepinin enerji optimizasyonu 6.84 kcal/mol ile sonuçlandı . Bu komplekste, CBZ'nin amidi H'si, HA'nı n OH'si ile bir H-bağı na sahiptir.

3.3. Komplekslerde karbamazepinin tayini (suda dengede)

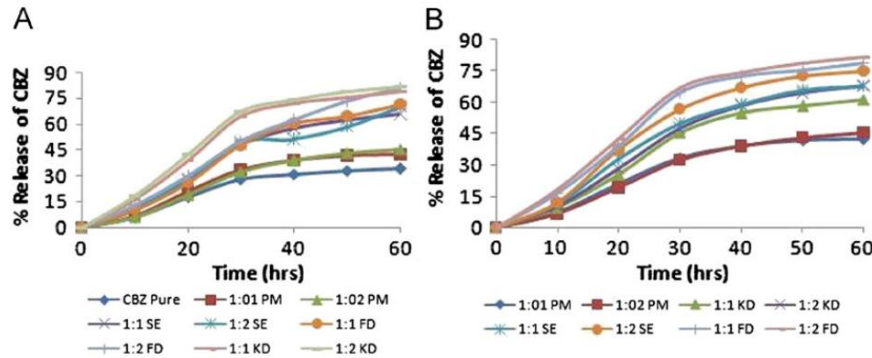
Karbamazepin pratik olarak suda çözünmez, karbamazepinin sulu doygunluk çözünürlüğü 12.65 mg/ml bulunmuştur. Karbamazepinin kompleksleşmesi çözünürlüğü büyük ölçüde artı rdı (Tablo 1). Yine tüm yöntemlerle, dondurarak kurutmanı n daha iyi bir teknik olduğu ve 1:2 oranı nı n daha iyi bir seçenek olduğu ortaya çı ktı . Komplekslerin boyutunun "Millipore" filtre boyutu olduğu için 0.22 mm'den küçük olduğu varsayı lmı ştı r.

1:2 oranları nı n daha iyi performansı , sulu ortamda CMC'nin gelişmesine bağlanabilir. Çünkü benzer bir çalı şmada [33] hüyük asit benzeri maddelerin CMC'sinin 2 g/L konsantrasyonda miseller oluşturduğu bulunmuştur. Bu çalı şma aynı zamanda bizim bulguları mı zla uyumlu olarak HA benzeri maddelerin gramı başı na çözünen ilaç miktarı nı da bildirmektedir. Burada fulvik asidin ilacı n çözünürlüğü üzerinde daha belirgin bir etki bı raktı ğı görülmektedir.

Hüyük maddeler, çeşitli fonksiyonel grupları n varlı ğı ve hidrofobik parçaları n dahil edilmesi nedeniyle metal iyonu etkileşimi gibi her iki tür etkileşimi sunar [34,35]. HA'nı n FA ile karşı laştı rı ldı ğı nda farklı bağlama kapasiteleri ile ilgili olarak, literatürden HA'nı n model kimyasalları FA'dan daha fazla bağladı ğı açı ktı r. Hüyük asit örneklerinden fulvik asit örneklerine geçişte kabaca on kat azalma vardı r [25]. Ancak hidrofobik bir maddenin artan çözünürlüğüne ilişkin bulgumuz farklı bir sonuç gösteriyor. Bunun nedeni, hüyük maddelerin soğurulması nı n/komplekslenmesinin, onun içsel özelliği olmaması olabilir; genellikle pH değerlerine [36,37] ve diğer iyonları n varlı ğı na [38] bağlı dı r. Farklı pH aralı kları nda olduğu gibi bunlar farklı davranı r.

3.4. Karbamazepinin kompleksten salı nması

60 dakika boyunca incelenen farklı yöntemlerle hazı rlanan saf karbamazepin ve komplekslerinin salı m profilleri, Şekil 12A ve B'de gösterilmektedir. 60 dakikada %34 gösteriyor ve sonrası nda platoya ulaşı yor. Tüm yöntemler arası nda dondurarak kurutma ve yoğurma en iyi salı nı mı gerçekleştirmiştir (%80). Önceki bulguları n sonuçları nı n korunması 1:2 oranı nda daha iyi sonuç verdi. Hüyük asit kompleksinin salı m profili, fulvik asitten biraz daha iyiydi. Kullanı lan farklı teknikler arası nda fiziksel



Şekil 12. (A) Karbamazepin ve FA komplekslerinin salı m profili. (B) HA komplekslerinin salı nı m profili.

karşı m yönteminin en az kompleksleştirici olduğu görülmektedir. Daha iyi kompleks oluşturma etkileşiminin, belirli bir zaman diliminde daha yüksek sulu konsantrasyonla sonuçlandı ğı sonucuna varabiliriz. Sonuç, çözünürlük analizinden ve farklı enstrümantal analizlerden elde edilen verileri doğrulamaktadır (Şekil 3-6).

3.5. Antikonvülsan aktivitenin karşı laştı rı lması

Daha önce belirtilen tüm çalı şmalardan, yoğurma ve dondurarak kurutma yöntemleriyle geliştirilen komplekslerin umut verici sonuçlar verdiği çok açı ktı . Bu nedenle, bunlar daha fazla farmakodinamik çalı şma için seçildi (Tablo 2). MES aktivitesi çalı şması , kompleksleşme nedeniyle, saf ilaca kı yasla karbamazepinin potansinde yaklaşık k üç kat artı ş olduğunu gösterdi. Tüm kompleksler, elektroşok için %75 inhibisyon göstermiştir.

Bu çalı şmada elde edilen veriler önceki bulgular ve permeasyon çalı şması ile uyumludur. Antiepileptik potansiyeli kontrol etmek için farelere FA ve HA da verildi ve sı fı r inhibisyon bulundu. Bu nedenle, optimize edilmiş komplekslerimiz, artan çözünürlük, pasif difüzyon gradyanı ve daha az iyonik karaktere atfedilebilecek kan beyin bariyerini (BBB) geçmede daha iyi performans sergiliyordu.

Hümkik materyalde agregat oluşumu da iyi bilinmektedir [40], bu da ilacı n lokal konsantrasyonunun artması na neden olabilir.

3.6. Sı çan bağı rsağı kesesi boyunca permeasyon çalı şması

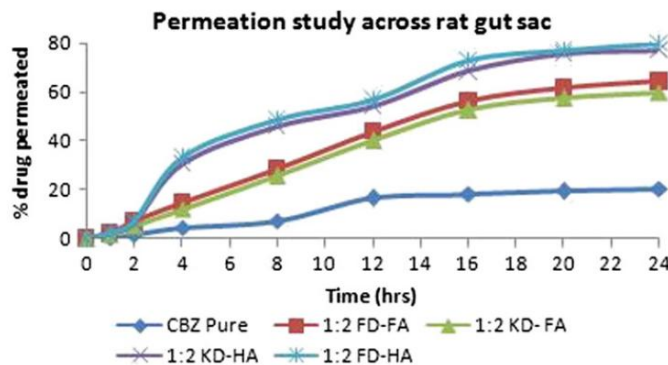
Optimize edilmiş komplekslerin bağı rsk kesesi boyunca geçirgenliği, 24 saatte sudaki karbama zepin süspansiyonuna kı yasla önemli ölçüde arttı (2.9-3.8 kat) (Şekil 13). Kompleksin geçirgenlik profili iki patern gösterir, yani ilk 10 saatte geçirgenlikte keskin bir artı ş oldu, ancak bundan sonra bir plato gözlemlendi.

Komplekslerin bağı rsk zarı boyunca nüfuz etmesi göz önüne alı ndı ğı nda, iki karşı t kuvvet (konsantrasyon gradyanı ve hümkik maddelerin toplanması) birbirine karşı hareket eder. Baskı n olan sonucu etkiler. Başlangı çta, geçirgenlik

Tablo 2
İsviçre albino farelerinde optimize edilmiş komplekslerin karşı laştı rmalı MES aktivitesi.

Madde	Doz	% İnhibisyon
Kontrol	-	0
CBZ	30 mg/kg vücut ağı rlı ğı	100
ANGAK	102 mg/kg vücut ağı rlı ğı	0
HA	550 mg/kg vücut ağı rlı ğı	0
1:2 KD (HA-CBZ)	Denk. 10 mg/kg vücut ağı rlı ğı na kadar. CBZ	75
1:2 KD (FA-CBZ)	Denk. 10 mg/kg vücut ağı rlı ğı na kadar. CBZ	75
1:2 FD (HA-CBZ)	Denk. 10 mg/kg vücut ağı rlı ğı na kadar. CBZ	75
1:2 FD (FA-CBZ)	Denk. 10 mg/kg vücut ağı rlı ğı na kadar. CBZ'nin	75

Kontrolde sadece 0.2 ml gliserin verildi. HA ve FA, aynı hacimde gliserin içinde dağı tı ldı .



Şekil 13. Karbamazepin ve optimize edilmiş komplekslerin permeasyon çalı şması .

kesse boyunca artan bir konsantrasyon gradyanı olduğundan, ancak bir süre sonra (10 saat) gradyan düştükçe platoya ulaşı r. HA daha büyük boyuta sahip olması na rağmen yapı sı gereği her iki kompleksleştirme yönteminde de daha iyi geçirgenlik göstermektedir. Sulu ortamda HA daha az yüklüdür [41] ve daha hidrofobiktir [31], bu da bağı rsk mukozası boyunca nüfuz etmesine yardımcı olur.

3.7. yaşlanma çalı şması

HA-CBZ kompleksi (1:1 ve 1:2) ve FA-CBZ kompleksinin (1:1 ve 1:2) dondurularak kurutulmuş kompleksleri yaşlandı rı ldı ktan sonra yalnızca tek noktalar gösterdi. Ancak noktaları n konumu değişkendi, bunun nedeni kompleks oluşturuca ajanları n (HA ve FA) farklı polaritelerinden [25] kaynaklanı yor olabilir. Fülvik asit kompleksleri (1:1 ve 1:2) için ortalama Rf değerleri 0,6 civarı ndayken , saf CBZ, 0,5'lik Rf değeri gösterdi . Hümkik asit kompleksleri (1:1 ve 1:2) için ortalama Rf değerleri 0,45 civarı ndaydı . Bu çalı şma, çalı şma sı rası nda geliştirilen komplekslerin stabilitesini gösterir.

3.8. Beyin dokuları nı n biyokimyasal tahminleri

3.8.1. Tiyobarbitürük asit reaktif madde tahmini

TBARS seviyeleri, PTX ile tedavi edilen grupta önemli ölçüde yükselmiştir (1.1370.064'e karşı 4.4970.14) (p0.01). CBZ ile tedavi edilen grupta TBARS seviyeleri de önemli ölçüde yükselmiştir. Karbamazepin kompleksleri ile tedavi edilen tüm gruplarda (grup 4-7) TBARS seviyeleri normale önemli ölçüde düşmüştür. (F (8, 45)¼245.21).

Tüm kompleks grupları arasında TBARS seviyeleri, CBZ-HA (1:2 KD) ile tedavi edilen grupla etkili bir şekilde normalleştirildi (Tablo 3).

Pikrotoksin (PTX) tedavisi, salin kontrol grubuyla karşı laştı rı ldı ğı nda TBARS seviyesini önemli ölçüde artı rı r. Bu bulgu, epilepside oksidatif stres gelişimine işaret eden önceki bulgularla uyumludur. Oksidatif stresin bir sonucu olarak artan lipid peroksidasyonu, glutatyon sentazı n inaktivasyonuna yol açan ve böylece eksitator nörotransmitter glutamik asidin anormal oluşumuna izin veren konvülsiyon üretir. CBZ ile tedavi edilen grup, PTX grubuna kı yasla TBARS seviyesini önemli ölçüde azalttı . TBARS seviyelerindeki bu düşüş, CBZ'nin kompleks oluşturuca maddelerle (HA ve FA) kompleksleştirilmesi üzerine daha da arttı . TBARS seviyesindeki artı rı lımı ş azalma, CBZ'nin gelişmiş biyoyararlanı mı na bağlanabilir. Bu, hümkik maddelerle kompleks oluşturma üzerine gelişmiş biyoyararlanı mı bildiren önceki bulgularla tutarlı dı r [12].

3.8.2. Doku glutatyonu GSH

PTX tedavisi, salin kontrol grubu ve CBZ ile tedavi edilen grup (97.2971.99'a karşı 29.2471.12) (p0.01) ile karşı laştı rı ldı ğı nda glutatyon düzeyinde anlamlı düşüşle sonuçlandı . GSH seviyeleri, CBZ tedavisi ile önemli ölçüde normalleştirildi

Tablo 3

Geliştirilen komplekslerin ve CBZ'nin pikrotoksin kaynaklı oksidatif stres çalı şmaları .

Grup tedavisi	TBARS (Imol MDA/mg protein)	GSH (Imol/mg protein)
1. Normal salin (NS, 10 ml/kg, ip)	1.1370.064**	4.4970.14yy
2. sc)	PTX (3,5 mg/kg,	97.2971.99**
3. CBZ (30 mg/kg, po)	2.170.06**	29.2471.12yy
4. CBZ-HA (1:2)-KD (30 mg/kg, po)	1.1770.05**	90.9671.59
5. CBZ-FA (1:2)-KD (30 mg/kg, po)	1.3670.03**	108.9671.86**yy
6. CBZ-HA (1:2)-FD (30 mg/kg, po)	1.5270.05yy	99.7971.74**
7. CBZ-FA (1:2)- FD (30 mg/kg, po)	1.6270.04yy	97.8072.26**
8. Kendi başı na	1.1270.05	94.9671.34**
9. HA (640 mg/kg vücut ağı rlı ğı)	1.1570.07	101.6371.40
10. FA (335 mg/kg vücut ağı rlı ğı)		99.7971.30

HA ve FA da kontrol olarak verildi.

Veriler MeanSEM, ANOVA ve ardı ndan çoklu karşı laştı rma için Dunnett t-testi olarak ifade edildi, ypp0,01 - Normal Salin (NS), **p0,01 - CBZ.

kompleksler (4-7. gruplar) (Tablo 3). Tüm CBZ kompleks grubu arasında, CBZ-HA'nın (1:2 KD) GSH'nin normalizasyonu üzerinde daha iyi bir etkiye sahip olduğu bulundu.

PTX tedavisi, PTX ile tedavi edilen grubun TBAR seviyelerindeki önemli artıştan ve ardından glutatyon tarafından söndürülen serbest radikallerin oluşumundan açıkça anlaşılacak önemli lipid peroksidasyonuna yol açar. Böylece, PTX ile tedavi edilen grupta GSH seviyeleri, normal kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldı. CBZ tedavisi, glutatyon seviyesini önemli ölçüde normale yaklaştırdı. CBZ'nin HA ve FA ile kompleksleşmesi, glutatyon seviyesini daha da arttırdı. CBZ kompleksi ile tedavi edilen tüm gruplar arasında, CBZ-HA grupları nı (yoğurma veya dondurularak kurutulmuş) glutatyon seviyesini tersine çevirmede çok etkili olduğu bulundu.

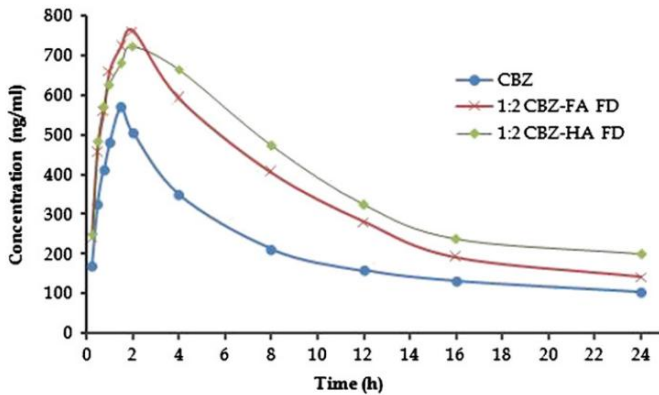
Bu, kompleksleşme nedeniyle CBZ'nin artan biyoyararlanımını bir sonucu olabilir. Ayrıca, HA ve FA'nın serbest radikalleri süpürme aktivitesine dair raporlar [16] vardır ve bu nedenle CBZ kompleksinin gelişmiş antioksidan aktivitesi, HA ve FA'nın sinerjistik aktivitesi ile de açıklanabilir.

3.9. Farmakokinetik çalışması

API'nin ve optimize edilmiş komplekslerin (FA (1:2) ve HA (1:2) dondurularak kurutulmuş kompleksler) farmakokinetik profilleri, Şekil 14'te gösterilmektedir. Birbirine göre. Komplekslerin C_{max}'a ulaşması 30 dakika daha sürdü ve ayrıca API'nin absorpsiyon hızını neğimi komplekslerden daha keskindi. Absorpsiyon hızı üzerine kafa yormakla açıklanabilir. 570 ng/ml civarında plazma konsantrasyonu elde edilene kadar, eğim hemen hemen aynıydı veya kompleksler biraz daha iyi performans gösteriyordu. Bazı ilaç moleküllerinin yakalanmaması olduğu kütle spektrometresinden de açıkça görüldüğü gibi, bu, moleküllerin pasif dağılımına veya içsel geçirgenliğine atfedilebilir. Bu noktadan sonra soğurma aşaması ortaya çıktı, ancak şaşırtıcı bir şekilde.

Burada hümmik maddenin çözündürücü etkisi hakimdir ve ayrıca kompleksten hapsedilmiş karbamazepinin salınması C_{max}'ı yükseltici etki gösterir. FA kompleksi, pH'tan bağımsız çözünürlük nedeniyle C_{max}'ta biraz daha yüksek sonuçlara elde etti. Yüksek asidik (mide) pH'ta hümmik asit, fulvik asitten daha az çözünürlük gösterirken, alkalik (bağırsak) pH'ta her ikisi de hemen hemen aynı çözünürlüğü gösterir.

Saf karbamazepinin eliminasyon paterni barizdi ve literatüre uygundu. Komplekslerin ortadan kaldırılması, bazı sürekli salınım özellikleri gösteriyordu. Hemen hemen aynı çözünürlük nedeniyle eliminasyon modelinde önemli bir fark gözlenmedi. Ancak daha küçük moleküler boyut, dağılımı daha hızlı eliminasyonda rol oynayacaktı. Net bir görüşe sahip olmak için standart sapma çubukları grafikten çıkarılmıştır.



Şekil 14. Oral uygulamadan sonra CBZ ve komplekslerinin (n=6) ortalama plazma konsantrasyonunun grafik gösterimi.

Tablo 4

Saf ve kompleks karbamazepinin farmakokinetik profilleri.

	CBZ	1:2 CBZ-FA FD	1:2 CBZ-HA FD
C _{max} (ng/ml)	572,58	762,73	1,5
T _{max} (h)	2,0	11,24	11,85
Yarı ömür (s)			
AUC _{0t} (h/ml cinsinden)	5047,9	8107,2	
AUC _{0∞} (ng h/ml) 8032,4	10,756,46	Eliminasyon oranı	sabiti (h ⁻¹)
0,034	0,053		14,444,40
			0,037

Farmakokinetik profilin anlaşılması. Farmakokinetiğin diğer parametreleri Tablo 4'te verilmiştir.

4. Sonuç

Mevcut çalışma, hem HA hem de FA'nın, biyoyararlanım artışı için farmasötik ekspanyanlar olarak keşfedilmesi için yeterli potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. CBZ'nin FA ve HA ile kompleksleştirilmesi, kendi başına alınan CBZ miktarını ve dolayısıyla karşılaşılan yan etkileri azalttığı varsayılan beyin geçirgenlik kabiliyetini artırma üzerindeki yararlı etkisini gösterir. CBZ-HA (1:2) kompleksi, farklı in vitro ve in vivo çalışmalarda en iyi performans gösteren kompleks olarak ortaya çıktı. Ayrıca, FA ve HA iyi bir antioksidan aktivite sergiledikleri için, nöbetlerde üretilen oksidatif stresle ilgileneceklerdir. Bununla birlikte, bu kompleks oluşturmaya katkıda bulunan maddelerin daha kesin bir açıklama yapmak için farklı deney hayvanlarını içeren daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Yazarlar, X-ray kırınım tesisine erişim sağladığı için Yeni Delhi Fizik Bölümü'nden (Jamia Millia Islamia) Prof. A. Wahab'a minnettar. Ayrıca, çalışmaları için Novartis Pharmaceuticals Ltd., Hindistan'a ve Ghaziabad, Hindistan Dabur Araştırma Vakfı'na minnettarlar.

Referanslar

- [1] Kong YC, Butt PPH, Ng KH, Cheng KF, Camble RC, Malla SB. Napoli pancea üzerinde kimyasal çalışmalar: Shilajit. Int J Crude Drug Res 1987;25:179-87.
- [2] Ghosal S. Shilajit'in yönleri ve gerçekleri. İçinde: Vohara SB, Dandya PC, editörler. Yerli ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi. Yeni Delhi: Tıp Tarihi ve Tıbbi Araştırma Enstitüsü; 1989.
- [3] Ghosal S. İmmümodülatör bir Ayurvedik rasayan olan Shilajit'in Kimyası. Pure Appl Chem 1990;62:1285-8.
- [4] Anderson HA, Bick W, Hepburn A, Stewart M. Hümmik maddeler II. İçinde: Hayes MHB, MacCarthy P, Malcolm RL, Swift RS, editörler. Yapı ve kullanım, 1989. Chichester, Birleşik Krallık: Wiley-Interscience; 1989. s. 223-53.
- [5] Wershaw RL, Thorn KA, Pmckney DJ, Rice JA, Hemond HF. Turbadaki hümmik maddelerin ikincil yapıları bir membran modelinin uygulanması. Turba ve su: turbada su tutma ve kurutma özellikleri. Elsevier Uygulamalı Bilim; 1986.
- [6] Kobayashi Y, Ito S, Itai S, Yamamoto K. Karbamazepin polimorflarının ve dehidratının fizikokimyasal özellikleri ve biyoyararlanımını. Int J Pharm 2000;193(2): 137-46.
- [7] Wu CY, Benet LZ. BCS uygulaması yoluyla ilaç dağılımını tahmin etme: taşıma/absorpsiyon/eliminasyon etkileşimi ve bir biyofarmasötik ilaç imhasını tanımlama sisteminin geliştirilmesi. Pharm Res 2005;22(1):11-23.
- [8] Koester LS, Xavier CR, Mayorga P, Valquiria L. B-siklodekstrin kompleksinin hidroksipropil metilselüloz matris tabletlerinden karbamazepin salınımını üzerindeki etkisi. Eur J Pharm Biopharm 2003;55(1):85-91.
- [9] El-Zein H, Riad L, El-Bary A. Karbamazepin çözünmesinin artırılması: in vitro ve in vivo değerlendirme. Int J Pharm 1998;168(2):209-20.
- [10] Li H, Jin Y, Nie Y. Çamur azaltma ve hümmik asit geri kazanımı için alkalik ortam uygulaması. Biore Tech 2009;100(24):6278-83.
- [11] Vlachou M, Papai Ioannou G. Furosemidin hidroksipropil-beta-siklodekstrin ile inklüzyon kompleksinin hazırlanması ve karakterizasyonu. J Biomat Appl 2003;17(3):197-206.

- [12] Agarwal SP, Anwer MK, Aqil M. Shilajit'ten ekstrakte edilen fulvik asit ile furosemidin kompleksleştirilmesi: yeni bir yaklaşı m. *Drug Dev Ind Pharm* 2008;34(5): 506–11.
- [13] Anwer MK, Agarwal SP, Ali A, Sultana Y. Aspirinin shilajitten ekstrakte edilmiş hümik asitle moleküler kompleksleri ve karakterizasyonları . *J Dahil Phenom Macrocycl Chem.* 2009;67(1–2):209–15.
- [14] Cazali N, Tran A, Treluyer JM, Rey E, d'Athis P, Vincent J, et al. Stiripentolün insanda karbamazepin ve sakonavir metabolizması üzerindeki inhibitör etkisi. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56(5):526–36.
- [15] Boobis AR, Burley D, Davies DM, Davies DS, Harrison PJ, Orme MLE, et al. Terapötik ilaçlar. 2. baskı New York: Churchill Livingstone; 1991.
- [16] Santos A, Botero WG, Bellin LC, de Oliveira LC, Rocha JC, Mendonca AGR, et al. Hümik maddeler ve metalik iyonlar arası ndaki etkileşim: hümik maddelerin seçicilik çalı şması ve olası terapötik uygulamaları . *J Braz Chem Soc* 2007;18(4):824–30.
- [17] Loftsson T, Brewster ME. İlaç çözünürlüğü ve stabilizasyonu. *J Eczacı lı k Bilimi* 1996;85:1017–25.
- [18] Yogeewari P, Sriram D, Saraswat V, Ragavendran J, Kumar M, Murugesan M, et al. N4-ftalimido fenil (tio) semikarbazitlerin sentezi ve antikonvülsan ve nörotoksisite değerlendirmesi. *Eur J Pharm Sci* 2003;20:341–6.
- [19] Achliya GS, Wadodkar SG, Darle AK. Bramhi Ghrita'nı n CNS aktivitesinin değerlendirilmesi. *Ind J Pharm* 2005;37:33–6.
- [20] Ahmed MO, El-Gibaly I, Ahmed SM. Siklodekstrinlerin klotrimazolün fiziko kimyasal özellikleri ve antimikotik aktivitesi üzerindeki etkisi. *Int J Pharm* 1998;171:111–21.
- [21] Gandhimathi M, Ravi TK. İnsanda okskarbazepinin hı zlı HPTLC analizi plazma. *J Planı Krom Mod TLC* 2008;21(6):437–9.
- [22] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Tiyobarbitürük asit reaksiyonu ile hayvan dokuları nda lipid peroksitler için tahlil. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [23] Ellman G. Doku sülfidril grupları . *Arch Biochem Biophys* 1959;32:70–7.
- [24] Zhu Y, Chiang H, Wulster-Radcliffe, Hilt MR, Wong P, Kissinger CB, et al. Otomatik bir kan örnekleme sistemi kullanı larak sı an plazması nda karbamazepin ve ana metabolitinin belirlenmesi için sı vı kromatografi/tandem kütle spektrometrisi. *J Pharm Biomed Anal* 2005;38:119–25.
- [25] Paolid FD, Kukkonen J. Organik kirleticilerin hümik ve fulvik asitlere bağlanması : pH'nı etkisi ve hümik materyalin yapı sı . *Chemosphere* 1997;34(8):1693–704.
- [26] Steinberg CEW, Xu Y, Lee SK, Freitag D, Kettmp A. Bazı organik ksenobiyotiklerin *Daphnia magna*'ya biyoyararlanı mı üzerinde çözünmüş hümik materyalin (DHM) etkisi. *Chem Spec Bioav* 1993;5:1–9.
- [27] Fnmnd R, Ludemann HD. Hümik malzemenin çözelti ve CPMAS C-13 NMR spektrumları nı n kantitatif analizi. *Sci Total Environ* 1989;81/82:157–68.
- [28] Yadav VR, Suresh S, Devi K, Yadav S. Zerdeçal siklodekstrin kompleksinin, sı an kolit modelinde çözünürlüğü ve antianjiyogenik ve antiinflamatuvar aktivitesi üzerindeki etkisi. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009;10:752–62.
- [29] Sarasija S, Shivakumar HN, Kumar K. B siklodekstrin kompleksinin tabletlerden karbamazepinin çözünürlüğü ve çözünme hı zı üzerindeki etkisi. *Ind J Pharm Sci* 2006;68:301–7.
- [30] Pietro M, Paola C. Kentsel katı atı k aerobik kompostlaşı rma işlemi sı rası nda organik madde gelişiminin değerlendirilmesi için termal analiz. *Thermo Ata* 2004;413:209–14.
- [31] Moura MN, Martı n MJ, Burguillo FJ. Hümik asit, fulvik asit ve fenolün *Bacillus subtilis* ve aktif çamur üzerine adsorpsiyonunun karşı laşı rmalı bir çalı şması . *J Haz Mater* 2007;149(1):42–8.
- [32] Schnitzer M. Fulvik maddelerin sı nı flandı rı lması ve karakterizasyonu için kimyasal, spektroskopik ve termal yöntemler. İçinde: Hümik maddelere ilişkin uluslararası toplantı tutanakları . *Nieuwersluis*; 1972.
- [33] Adani F, Tambone F, Davoli E, Scaglia B. Mı sı r bitkisinden ve organik atı klardan ekstrakte edilen hümik asit benzeri maddelerin sürfaktan özellikleri ve tetra kloroetilen (PCE) çözme kabiliyeti: karşı laşı rmalı bir çalı şma. *Chemosphere* 2010;78(8):1017–22.
- [34] Hassel JP, Milicic E. Poliklorlu bifenil türdeşinin çözünmüş hümik maddelerle bağlanması için denge ve hı z sabitlerinin belirlenmesi. *Environ Sci Technol* 1985;19:638–43.
- [35] McCarthy JF, Jjenez BD. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve çözünmüş humik malzeme arası ndaki etkileşimler: bağlanma ve ayrı şma. *Environ Sci Tech* 1985;19:1072–6.
- [36] Wang XK, Chen CL, Du JZ, Tan XL, Xu D, Yu SM. 234Am (III)'ün hümik asit kaplı g-Al₂O₃'ten kinetik ayrı şması na pH ve yaşlanma süresinin etkisi: şelatlayı cı bir reçine değişim çalı şması . *Environ Sci Tech* 2005;39:7084–8.
- [37] Wang XK, Zhou X, Du JZ, Hu WP, Chen CL, Chen YX. Eu(III)'ün hümik asit-Al₂O₃ kolloid yüzeylerinden kinetik desorpsiyonunu incelemek için kenetleme reçinesinin kullanı lması . *Sörf Bilimi* 2006;600:478–83.
- [38] Mandal R, Salam MSA, Murimboh J, Hassan. NM, Chakrabarti CL, Geri MH. Model özellilerde iyi karakterize edilmiş bir fulvik asit tarafı ndan bağlanmak için Ca (II) ve Mg (II)'nin Ni (II) ile rekabeti. *Environ Sci Tech* 2000;34:2201–8.
- [39] Skoug JW, Halstead GW, Theis DL, Freeman JE, Fagan DT. Katı oral dozaj formları için çözünme testlerinin geliştirilmesi ve doğrulanması için strateji. *Pharm Tech* 1996;20:58–68.
- [40] Sanchez-Mari n P, Lorenzo JL, Blust R, Beiras R. Fulvik asitler, deniz omurgası zları için çözünmüş kurşun biyoyararlanı mı nı artı rı r. *Environ Sci Technol* 2007;41(16): 5679–84.
- [41] Milne CJ, Kinniburgh DG, Tipping E. Hümik maddeler tarafı ndan proton bağlanması için Generic NICA– Donnan modeli parametreleri. *Environ Sci Tech* 2001;35:2049–59.