



## 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ile Metronidazolün İnküzyon Kompleksi Oluşumunun HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi

İlkay KONÇE<sup>1</sup>, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY<sup>\*2</sup>, Zehra ÜSTÜN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 32000, Isparta, Türkiye

<sup>3</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Atayalvaç Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, 32400, Isparta, Türkiye

\*yazışılan yazar e-posta: ebrucubuk@sdu.edu.tr

(Alınış: 21.08.2021, Kabul: 10.11.2021, Yayımlanma: 25.11.2021)

**Öz:** Metronidazol, bakteri, protozoa ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan nitroimidazol sınıfı bir antibiyotiktir. Aktif farmasötik bileşenin düşük çözünürlüğü, ilaç absorpsiyonu ve biyoyararlanımı üzerindeki olumsuz etkisinden dolayı oral katı dozaj formlarının geliştirilmesi ve büyük ölçekli üretiminin önündeki en büyük engeldir. Bu çalışmada lipofilik yapıya sahip ve suda çözünürlüğü düşük olan metronidazolün çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırmak için 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ile inküzyon kompleksi oluşumu gerçekleştirilmiştir. 2-hidroksipropil-β-siklodekstrinin metronidazolün çözünürlüğü üzerindeki etkisi, faz çözünürlük metoduna göre değerlendirilmiştir. Metronidazolün 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ile kompleksleşmesi yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemi ile belirlenmiştir. Sıvı kromatografik tayin, 25°C'de Kinetex Core-Shell C8 (Phenomenex, 150 x 4,6 mm I.D., 2,6 µm) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak %30 (h/h) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımı kullanılmıştır. Sonuç olarak kompleksin stokiometri 1:1'dir ve kompleksin kararlılık sabiti yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemi ile belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Metronidazol, İnküzyon kompleksi, Faz çözünürlük metodu, HPLC

### Determination of Inclusion Complex Formation of Metronidazole with 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin by HPLC Method

**Abstract:** Metronidazole is a nitroimidazole class antibiotic used to treat infections caused by bacteria, protozoa, and parasites. The low solubility of the active pharmaceutical ingredient is the major obstacle to the development and large-scale production of oral solid dosage forms due to its adverse effect on drug absorption and bioavailability. In this study, inclusion complex formation was carried out with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin to increase the solubility and stability of metronidazole, which has a lipophilic structure and low water solubility. The influence of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin on the metronidazole solubility was evaluated in respect of the phase solubility method. The complexation of metronidazole with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin was proven by high performance liquid chromatography method. Liquid chromatographic determination was carried out on a Kinetex Core-Shell C8 (Phenomenex, 150 x 4.6 mm I.D., 2.6 µm) column at 25°C. The acetonitrile-water binary mixture containing 30% (v/v) acetonitrile was used as a mobile phase. As a result, the stoichiometry of the complex was 1:1 and the stability constant of the complex was determined by the high performance liquid chromatography method.

**Key words:** Metronidazole, Inclusion complex, Phase solubility method, HPLC

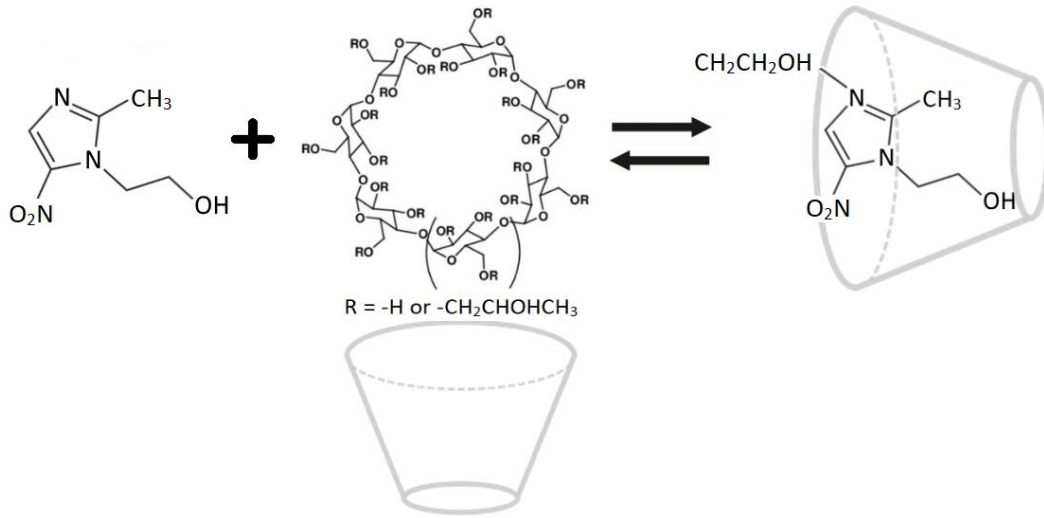
## 1. Giriş

Günümüzde çok sayıda parazite karşı aktivite gösterdiğinden geniş spektrumlu ajan olarak tanımlanan Metronidazol, nitroimidazol sınıfı antibiyotiktir. Bu ilaç etken maddesi özellikle akne ve rozasea (gül hastalığı) tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tip deri hastalıklarının tedavisinde topikal uygulamalar (cilt üzerine sürülen krem ve merhemler), sistemik ilaçlar ve lazer tedavisi gibi yöntemler uygulanmaktadır. Ayrıca metronidazol *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia* ve *Trichomonas vaginalis* gibi parazitlerin ve anaerobik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde etkili bir ilaç etken maddesi olarak bilinmektedir [1,2].

Çözünürlüğü az olan ilaç etken maddeleri ilaç kristal formlarının modifikasyonu, yüzey aktif maddelerin eklenmesi, yardımcı çözücülerin eklenmesi, siklodekstrin ile kompleks oluşturma, vb. gibi birçok yolla değiştirilebilir. Bu olasılıklar arasında en çok siklodekstrin ile kompleks oluşturma yaygın olarak kullanılmaktadır. Siklodekstrinler hidrofobik ilaç moleküllerinin suda çözünürlüğünün artırılması için inklüzyon komplekslerinin oluşturulması, su ortamında kararlılıklarını arttırmak için, istenmeyen özellikleri maskeleyerek veya yan etkileri azaltmak için farmasötik alanda yaygın kullanım alanına sahiptir [3-7]. Oluşturulan inklüzyon kompleksinde molekül (konuk) siklodekstrinin (ev sahibi) boşluğu tarafından tutulmaktadır. Kompleksin oluşumuyla konuk molekülün bazı fiziksel özellikleri değişebilmektedir. Çözünürlüğü az olan maddelerin, kompleks formundayken çözünürlükleri artmaktadır [8].

Metronidazol suda çözünürlüğü az olan bir bileşiktir ve 20°C'de 10 mg/mL [9], 25°C'de 10,5 mg/mL [10] olarak belirlenmiştir. Özellikle, metronidazol pH 1,2'de çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Metronidazolün oral amaçlı farmasötik formülasyonlarda ve su ortamında çözünürlüğünün artırılması için  $\beta$ -siklodekstrinin bir türevidir olan 2-hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin (HP $\beta$ CD) ile inklüzyon kompleksi oluşturulmuştur [11-14]. HP $\beta$ CD'in suda çözünürlüğü az olan konuk moleküllerle inklüzyon kompleksi oluşturmak için yaygın bir kullanım alanı vardır. Bu siklik oligosakkarit ilaç endüstrisinde en çok kullanılan türevlerdendir, toksisiteleri düşüktür, çözünürlükleri yüksektir, oral ve parenteral uygulamalar için uygundur [15].

Siklodekstrinler boşluk boyutlarına uyum gösteren bileşiklerle inklüzyon kompleksi oluşturabilirler. Bu çalışmada HP $\beta$ CD ile hidrofobik özellikteki metronidazolün inklüzyon kompleks oluşumu sağlanmıştır. Metronidazolün yapısındaki imidazol halkası siklodekstrin (CD) boşluğuna girme potansiyeli olan gruptur. Yapıdaki nitro grubu ve hidroksil grubunu taşıyan yan zincir (R) kısmen siklodekstrin boşluğunun dışında kalacaktır (Şekil 1). Metronidazolün siklodekstrin boşluğuna katılımı, boşluğun içinde bulunan su molekülleri ile polaritesi daha düşük metronidazolün yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir. Kompleks kararlılığı ve metronidazolün zayıf çözünürlüğünün artırılması arasında doğrudan bir korelasyon mevcuttur. 1:1 molar oranındaki metronidazol ve HP $\beta$ CD arasındaki denge, Şekil 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** Metronidazol- hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin kompleks oluşum dengesi

Çözünürlük ölçümleri Higuchi ve Connors [16] tarafından geliştirilen yöntemle yapılır. Siklodekstrinin değişen derişimlerini içeren sulu çözeltilere fazla miktarda çözünürlüğü tayin edilecek molekül ilave edilir ve dengeye kadar çalkalanır. Daha sonra çözeltiler süzülür ve ortamda Çözünen molekül miktarı, çeşitli analitik yöntemler (HPLC, UV-visible vb.) ile tayin edilir. Higuchi ve Connors [16] kompleksleri, faz-çözünürlük profillerinde gösterildiği gibi bileşiğin çözünürlüğü üzerindeki etkilerine göre sınıflandırmıştır. A-tipi faz çözünürlük profilleri, ilacın çözünürlüğü, siklodekstrinin derişiminin artışına bağlı olarak elde edilir. Metronidazolün doymuş sulu çözeltilesindeki serbest derişimi,  $S_0$  (intrinsik çözünürlük)'a eşit olur.  $S_0$  bileşiğin sudaki çözünürlüğüdür. Bu çalışmada HP $\beta$ CD ve metronidazolün inklüzyon kompleksi hazırlanarak faz çözünürlük grafiği çizilmiştir. Kompleksin bileşim oranı, çözünürlük denge sabiti yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) yöntemiyle belirlenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

İnküzyon kompleksinin hazırlanması ve HPLC yöntemiyle yapılan tayinler için kullanılan kimyasal maddeler, Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri

Kimyasalın Adı	Molekül Kütlesi	Saflığı	Temin Edilen Firma Adı
2-hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin	1180,05 g/mol	%97	Acros Organics
Metronidazol	171,15 g/mol	$\geq$ %99	Sigma-Aldrich
Asetonitril	41,05 g/mol	$\geq$ %99	Merck
Sodyum hidroksit	40,00 g/mol	Saf	Merck
Orto-fosforik asit	98,00 g/mol	Saf	Merck
Potasyum hidrojen fitalat	204,22 g/mol	Saf	Merck
Urasil	112,09 g/mol	%99	Sigma-Aldrich

### 2.2 Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar, Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan cihazlar

<b>Cihazın Adı</b>	<b>Firma Adı</b>
Hassas Analitik Terazı	Precisa LS 320A SCS
pH metre	Mettler Toledo S 220 seven compact
Saf Su Cihazı	Millipore Direct Q3-UV
Manyetik Karıştırıcı	JSR Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
Mikro Pipet	Nichipet EXII Vol. 1000-5000 µL
Yüksek Performans Sıvı Kromatografı	Shimadzu
Çalkalamalı inkübatör	STIK Shaking Incubator PSE Series T150B

### **2.3 Faz Çözünürlük Çalışması ve Komplekslerin Hazırlanması**

Faz çözünürlük çalışması Higuchi ve Connors [16] tarafından yapılan çalışmalara dayanarak gerçekleştirilmiştir. 10 mL saf su içeren 25 mL'lik kapaklı erlen içerisine sırasıyla 2-hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin ilavesiyle 0,85; 1,47; 4,41; 7,35 ve 8,5 mM derişiminde çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir çözeltiye doygunluk konsantrasyonunu aşan miktarda (150 mg) metronidazol ilave edilmiştir. Kapakları kapatılan erlenler çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir ve saf içerisindeki etken madde derişimi dengeye gelinceye kadar çalkalamalı inkübatör yardımıyla 24 saat boyunca 37°C de 200 rpm'de çalkalanmıştır. Süre sonunda karışımlar, 0,45 µm gözenek çapındaki selüloz asetat membran filtreden süzölmüş ve çözücü içerisindeki metronidazol derişimi HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir.

### **2.4 HPLC Yöntemiyle Metronidazolün Tayini**

Metronidazolün sıvı kromatografik yöntemle tayininde Shimadzu marka HPLC cihazı kullanılmıştır. HPLC cihazı pompa (LC-20AD), UV-Vis dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-10AS) ve gaz giderme ünitesinden (DGU-20A3) oluşmuştur. Çalışma için hazırlanan mobil fazın pH ölçümleri Mettler Toledo InLab 413 pH elektrodu ile kombine Mettler Toledo pH metre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca bütün çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su Millipore Direct Q-3 UV cihazından temin edilmiştir.

Çalışmada ters faz sıvı kromatografı (RPLC) metoduyla metronidazolün tayini gerçekleştirilmiştir. Ayırma Kinetex Core-Shell C8 (Phenomenex, 150 x 4,6 mm I.D., 2,6 µm) kolonda, 0,8 mL/dakika akış hızında, 25°C'de gerçekleşmiştir. Çalışmada bileşik HPLC sistemine 20 µL hacimde enjekte edilmiştir. Metronidazol 277 nm'de UV dedektörle tayin edilmiştir. Bu çalışmada metronidazolün RPLC yöntemiyle tayini için mobil faz olarak hacimce %30 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımı hazırlanmıştır. Mobil fazda pH değerinin ayarlanabilmesi için pH elektrodu kalibre edilmiştir. Bunun için çalışılan asetonitril-su ikili karışımında 0,05 molal derişimde KHP çözeltisi hazırlanmış ve elektrot kalibre edilmiştir. Kalibrasyon işleminden sonra mobil fazın pH ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada metronidazolün kalitatif ve kantitatif tayini için asetonitril oranı %30 (v/v) olan ve pH değeri 5,0'e ayarlanmış asetonitril-su ikili karışımı hazırlanmıştır. Mobil faz ortamın istenilen pH değeri o-fosforik asit-sodyum hidroksit karışımıyla oluşturulmuş tampon çözelti ile sağlanmıştır. Bunun için çözelti ortamına sabit derişimde, 25 mM o-fosforik asit ilave edilmiştir. Mobil fazda istenilen pH değeri su ortamında çözümlenerek hazırlanmış 1M NaOH çözeltisiyle gerçekleştirilmiştir. Tayini yapılan metronidazolün RPLC yöntemiyle tayini için 900 ppm derişimde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bileşimin katısı hassas terazide tartılarak, çalışılan mobil fazda çözülmüştür. Kolonda tutunmayan tür olarak seçilen urasilin de hazırlanması aynı şekilde yapılmıştır.

### 2.5 Metronidazolün RPLC Yöntemiyle Kalitatif ve Kantitatif Tayini

Metronidazolün kantitatif tayini için elde edilen pikin simetrik olması ve kapasite faktörü değerinin 1 ve 1' den büyük olması gerekmektedir. Kantitatif tayine başlamadan önce bu koşulların yerine getirilmesi sağlanmıştır.

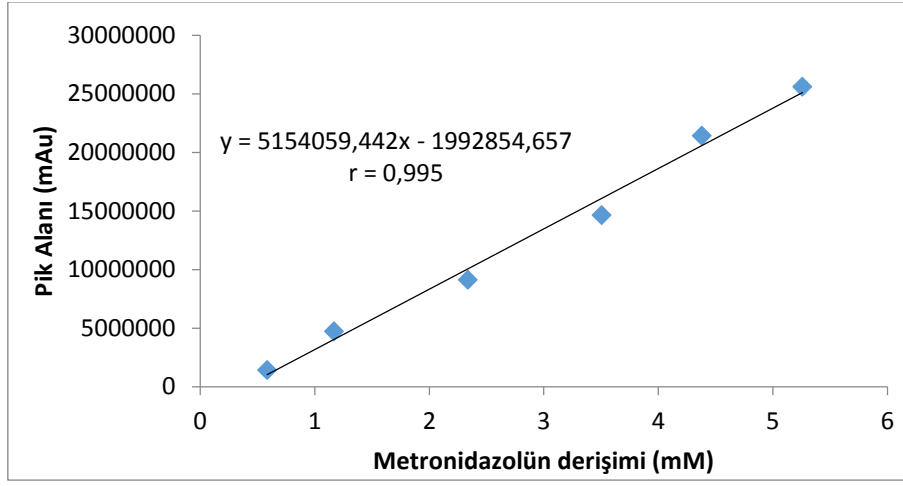
Metronidazolün doğrusal çalışma aralığının belirlenebilmesi amacıyla kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon işlemi dış kalibrasyon metodu ile yapılmıştır. Metronidazolün stok çözeltisi çalışılan mobil fazda seyreltme ile belirli derişimler de hazırlanmıştır. 5,258 mM (900 ppm); 4,382 mM (750 ppm), 3,505 mM (600 ppm), 2,337 mM (400 ppm), 1,168 mM (200 ppm) ve 0,584 mM (100 ppm) derişimde çözeltiler hazırlanmıştır.

### 3. Bulgular

Mobil faz pH'sı ve bileşğin pK<sub>a</sub> değeri HPLC metodunun geliştirilmesinde önemli bir role sahiptir. Kromatografik ayırmalarda bileşğin pK<sub>a</sub>±2 aralığı kullanılarak optimum mobil faz pH'sı seçilebilir [kazakevich lit]. Analizi yapılan metronidazol bazik özellikte bir bileşiktir. Bu bileşğin %15, %20 ve %25 (v/v) asetonitril içeren su-asetonitril ikili karışımlarında pK<sub>a</sub> değeri Poturcu ve Çubuk Demiralay (2020) tarafından tayin edilmiştir. Bileşğin su ortamındaki pK<sub>a</sub> değeri de 3,041 olarak belirlenmiştir. Bu pK<sub>a</sub> değeri göz önüne alınarak pK<sub>a</sub>±2 aralığında optimum mobil faz pH'sı 5 olarak seçilmiştir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen [lit] kromatogram incelendiğinde bileşğin asetonitril-su ikili karışımında pik şeklinin iyi olduğu görülmektedir. Bu yüzden mobil faz organik modifiyeri olarak asetonitril seçilmiştir. Geleneksel kolonlarla bu bileşğin HPLC tayini çalışmaları incelendiğinde bant genişlemesi ve uzun alıkonma zamanı olan sıvı kromatografik tayinler gerçekleştirilmiştir. Bu yüzden kısa alıkonma zamanı ve etkin bir ayırma için son yıllarda tercih edilen "Core Shell" tekniği ile hazırlanmış kolon tercih edilmiştir. Bu çalışmada bileşğin kalitatif ve kantitatif tayininde bu teknik kullanılarak geliştirilmiş Kinetex Core-Shell C8 kolon kullanılmıştır.

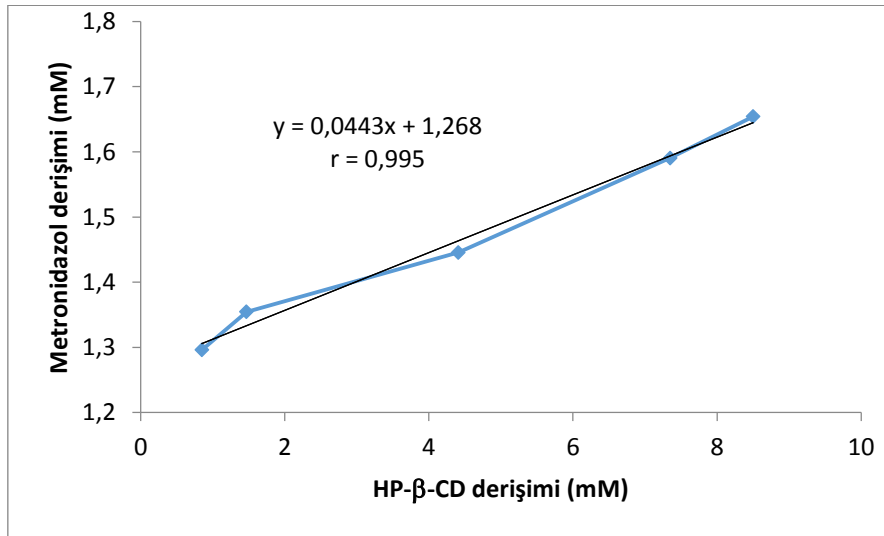
Faz çözünürlüğü metodu su ortamındaki siklodekstrin ile suda çözünürlüğü zayıf ilaçların inklüzyon kompleksini araştırmak için çok yararlıdır. Bu metot sadece siklodekstrinin çözme kabiliyetini vermekle kalmaz, aynı zamanda çözünürlük eğrisi analiz edilerek komplekslerin kararlılık sabiti de belirlenebilir [19].

Komplekslerin hazırlanması işlemine geçilmeden önce faz çözünürlük çalışması için ortama aşırı miktarda ilave edilen metronidazolün (150 mg) derişimi ve pik alanı dikkate alınarak metronidazolün kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Metronidazolün doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi için 5,258 mM (900 ppm); 4,382 mM, 3,505 mM, 2,337 mM, 1,168 mM ve 0,584 mM (100 ppm) derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Bileşğin derişim değerlerine karşı analit pik alanı grafiğe geçirildiğinde doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiği, Şekil 2'de verilmiştir.



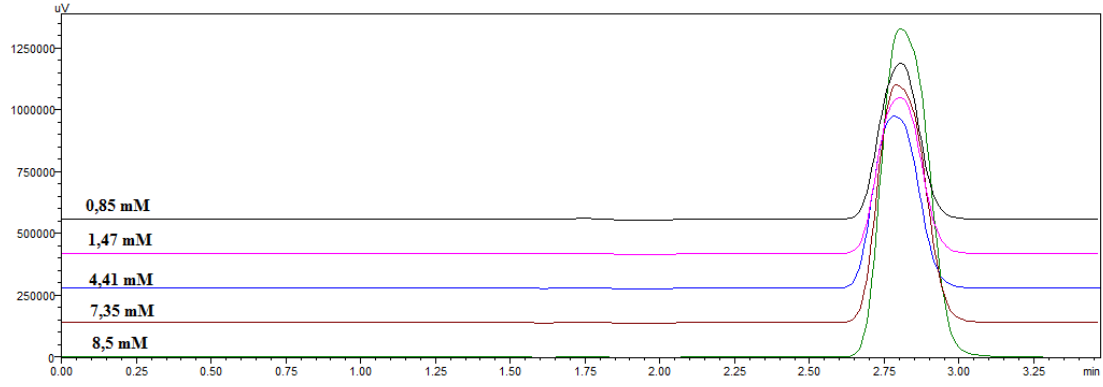
Şekil 2. Metronidazol için doğrusal kalibrasyon grafiği

İnklüzyon komplekslerinin oluşması için değişen derişimlerde HPβCD içeren 10 mL saf su içerisine aşırı miktarda ilave edilen metronidazol (0,15 g) çalkalamalı inkübatörde 37°C’de, 24 saat karıştırılmıştır. Sonuçta oluşan katı kompleksler 0,45 µm gözenek çapındaki selüloz asetat membran filtreden süzölmüş ve serbest halde çözücü içerisindeki metronidazol derişimi HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Numuneler pik alanları 50 kat seyreltilerek analiz edilmiştir. HPβCD’nin değişen derişimlerine karşı çözelti ortamında çözünen metronidazolün değişimi doğrusal olarak artmıştır. Çalışılan siklodekstrin konsantrasyon aralığında, kompleksin çözünebilirlik sınırına ulaşılmazsa, A tipi izotermi söz konusudur. Şekil 3’te verilen faz çözünebilirlik grafiğinin A<sub>L</sub> tipinde olduğu görölmektedir. A<sub>L</sub> tipi grafik, ilaç çözünebilirliğünün siklodekstrin konsantrasyonu ile orantılı olarak artan tip grafiğidir [16].



Şekil 3. Metronidazolün saf su içerisinde HPβCD ile oluşturduğu komplekse ait faz çözünebilirlik grafiği

Çalışılan sıcaklıkta (37°C) elde edilen grafik doğrusaldır ( $r > 0,99$ ). Şekil 3’te göröldüğü gibi HPβCD’nin derişiminin artışı ile metronidazolün çözünebilirliğünün arttığı görölmektedir. Şekil 3’teki grafiğe göre eğim değerinin 1’in altında olması kompleksleşmenin 1:1 oranında olduğunu göstermektedir. Farklı derişimlerde ilave edilmiş HPβCD ile metronidazolün kompleksleşmesinden sonra çözelti ortamında serbest kalan metronidazolün HPLC kromatogramı, Şekil 4’te verilmiştir.



Şekil 4. Kompleşmeden sonra çözelti ortamında serbest kalan metronidazolün HPLC kromatogramı

1:1 içerik kompleksi için kompleks kararlılık sabiti ( $K_c$ ) grafiğın eğim ve kesim ( $S_0$ ) değerlerinden hesaplanabilir:

$$K_c = \frac{\text{Eğim}}{S_0 (1-\text{Eğim})} \quad (1)$$

Bu eşitlikte  $S_0$ , HPβCD yokluğunda metronidazolün çözünürlüğünü verir. Çalışmamızda elde edilen HPβCD'nin metronidazol ile inklüzyon kompleksi için  $K_c$  değeri  $1827,82 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Kararlılık sabitleri  $100 - 5000 \text{ M}^{-1}$  olan kompleksler ( $K_c$ ) pratik uygulamalar için uygun görünmektedir [20,21]. Zayıf etkileşimi olan ( $K_c < 100$ ) çok kararsız kompleksler molekülün siklodekstrinin kavitesinde çok fazla tutunmadığını ve çözünürlüğünde çok fazla bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Çok yüksek durumlarda ( $K_c > 5000$ ), kompleksler çok kararludur ve molekül siklodekstrin boşluğunda çok fazla tutunur. Bunun için ilaç etken maddenin kontrollü salınımı ve siklodekstrin boşluğunu kolayca terk ederek serbest kalması için de  $K_c$  değerinin bu aralıkta olması gerekmektedir. Metronidazol/HPβCD kompleksin yüksek  $K_c$  değeri kompleksin kararlı olduğunu göstermektedir [16]. Metronidazolün β-siklodekstrin ve HPβCD ile yapmış olduğu inklüzyon komplekslerinin kararlılık sabiti değerleri Chadha ve ark tarafından yapılan çalışmada verilmiştir [22]. Kalorimetrik yöntemle gerçekleştirilen tayinde metronidazol pH değeri 3'e ayarlanmış fosfat tamponunda, β-siklodekstrin ve HPβCD %0,25 polivinilpirolidon içeren pH değeri 3'e ayarlanmış çözeltide çözülerek hazırlanmıştır. β-siklodekstrin ve HPβCD sırasıyla 0.705-7.048 mM ve 0.508-6.540 mM derişim aralığında hazırlanmıştır. Metronidazol-siklodekstrin belirli derişimlerde karıştırılmış ve kısa süreli çalkalamalar sonucunda kompleks oluşturulmuştur. Kompleksler 1:1 oranında oluşturulmuştur. pH 3'de metronidazol protonlanmış halde olduğundan bu durumun β-siklodekstrin ve HPβCD ile kompleksleşmesine katkısı bulunduğu sonucuna varılmıştır. Sulu ortamda hazırlanmış (pH 3, fosfat tamponu) kompleksin  $K_c$  değeri  $1030 \pm 25 \text{ M}^{-1}$  olarak verilmiştir. Bu değerın çalışmamızda verilen değer ile çok fazla uyuşmamasının nedeni metotta kullanılan Metronidazol/HPβCD derişiminin ve çözelti ortamının farklı olmasıdır. Bensouiki ve arkadaşları [23] tarafından yapılan çalışmada Metronidazol/HPβCD kompleksinin kararlılık sabiti farklı sıcaklıklarda belirlenmiştir. Higuchi ve Connors'a göre metronidazolün çözünürlüğü üzerindeki β-siklodekstrin ve HPβCD arasındaki çözünürlük etkisini karşılaştırmak için Faz-çözünürlük çalışması yapılmıştır [16]. 70 mM metronidazol β-siklodekstrin ve HPβCD (14-70 mM) in artan derişimlerinde cam viallerde su ortamında karıştırılmıştır. Vialler  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de, 5 gün

boyunca dengeye ulaşıncaya kadar 120 rpm'de karıştırılmıştır. Süspansiyon 0,22 µm filtreden süzöldükten sonra, süzöntüdeki metronidazolün derişimi 320 nm'de UV-visible spektrofotometre ile öölçölmüştür. Metronidazol HPβCD ile A<sub>L</sub> tipi, β-siklodekstrin ile B tipi çözünlölük faz grafiği vermiştir. Grafiklerin eğimlerine göre her iki siklodekstrin ile metronidazol 1:1 oranında kompleks oluşturmuştur. HPβCD yapısında hidroksil grupları içermesi nedeniyle β-siklodekstrine göre metronidazolün çözünlölüğünü daha da geliştrdiği sonucuna varılmıştır. Çalışmada faz çözünlölük diyagramına göre 40°C'de HPβCD ile metronidazolün K<sub>c</sub> değeri 2257 M<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

şekil 3'te göröldüğü gibi faz çözünlölük grafiğinin kesim noktası değeri (1,268 mM), metronidazolün moleköl ağırlığı (171,16 g/mol) ve bileşiğin 50 kat seyreltme faktörü kullanıldığında bileşiğin çözünlölüğü 10,851 mg/mL; molar çözünlölüğü 63,40 mM olarak hesaplanmıştır. Metronidazolün çözünlölüğü ile ilgili olarak Chadha ve ark tarafından yapılan çalışmada [22] metronidazol 1 g tartılmış ve β-siklodekstrin ve HPβCD içeren pH değeri 3'e ayarlanmış fosfat tamponu içeren çözeltiliye ilave edilmiştir. 37 °C'de 24 saat boyunca yapılan çalkalama sonucunda süspansiyon dengeye getirilmiştir. Süspansiyon 0,45 µm membran filtrede süzölmüştür. Metronidazolü içeren süzöntü λ<sub>max</sub> değerinde spektrofotometrik metotla tayin edilmiştir. Çalışmada elde edilen spektrofotometrik veriler kullanılarak metronidazolün çözünlölüğü 15,03 mg/mL, molar çözünlölüğü 87,9±1,2 mM olarak hesaplanmıştır [22]. Malli ve arkadaşları [24] tarafından yapılan çalışmada faz-çözünlölük deneyi ile metronidazolün çözünlölüğü β-siklodekstrin ile kompleksleşmesinden yararlanılarak belirlenmiştir [16]. Aşırı miktarda metronidazol, β-siklodekstrin çözeltili ortamına ilave edilmiş 25 °C'de beş gün çalkalanmıştır. Numune 0,22 µm filtreden süzöldükten sonra içerdđi metronidazolün derişimi HPLC metodu ile belirlenmiştir. HPLC analizi Symmetry C18 kolonda (5µm, 250x4 mm, Waters), 0,5 mL/dakika akış hızında gerçekeştirilmiştir. Kromatografik tayin metanol-su ikili karışımında (75:25, %v/v) yapılmıştır. Metronidazol 230 nm'de dedekte edilmiştir. A<sub>L</sub> tipi diyagramdan elde edilen veriler yorumlandığında molar çözünlölük 54 mM olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda verilen değerden farklı olmasının sebebi bu çalışmada metronidazol/β-siklodekstrin kompleks kararlılık sabiti tayin edilmiştir.

#### 4. Sonuç ve Yorum

5-nitroimidazol grubundaki en önemli antibiyotiklerden biri olan metronidazol 1950 yılında Poulenc araştırma laboratuvarlarında keşfedilmiştir. Günümüzde çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Metronidazol oral uygulamada yaygın kullanılmasına rağmen suda çözünlölüğü sınırlı olduğundan sulu formölasyonlar için kullanım alanı sınırlıdır. Metronidazolün suda çözünlölüğünün geliştirilmesi için β-siklodekstrinin bir türevi olan 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ile kompleksleştirilmesi sağlanmıştir. Yapılan çalışma metronidazolün 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ile 1:1 stokiyometrik oranda bir A<sub>L</sub> tipi faz diyagramıyla sonuçlanan bir inklüzyon kompleksi oluşturabildiğini göstermiştir. Faz çözünlölük çalışmaları sonucunda çözeltilide bulunan serbest haldeki metronidazolün derişimi yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) yöntemiyle belirlenmiştir. Literatürde sınırlı veri olan bileşiğin molar çözünlölük ve kompleks kararlılık sabiti değerleri duyarlılığı, kesinliği ve doğruluğu yüksek HPLC yöntemiyle elde edilen verilerle belirlenmiştir. Bu yöntemle elde edilen veriler literatürde ilktir. Sonuç olarak metronidazolün çözünlölüğü 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ile yapılan



kompleksleştirme ile büyük ölçüde artmıştır. Bu sonuç, geliştirilecek formülasyonların gelecekteki gelişimi için rehberlik sağlayabilir.

### **Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı**

İlkay Konçe: Araştırma, Metodoloji, Kaynak/Materyal/Malzeme Temini

Ebru Çubuk Demiralay: Araştırma, Metodoloji, Doğrulama, Denetim/Gözlem/Tavsiye, İnceleme ve Düzenleme

Zehra Üstün: İnceleme ve Düzenleme

### **Destek ve Teşekkür Beyanı**

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Isparta, Türkiye'den FDK-2020-8125 nolu proje ile finansal olarak desteklenmiştir.

### **Çatışma Beyanı**

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir çatışma beyanımız bulunmadığını bildiririz.

### **Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri**

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir etik kurul onayı ve/veya aydınlatılmış onam bilgileri beyanımız bulunmadığını bildiririz.

### **Kaynakça**

- [1] D. Leitsch, "A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy", *Parasitology*, 146(9), 1167-1178, 2019.
- [2] L. L. Brunton, J. S. Lazo, K. L. Parker (editors): Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics: Tedavinin farmakolojik temeli. Çeviri editörü: Ö. Süzer, İstanbul: Nobel Yayınevi, 2009.
- [3] D. O. Thompson, "Cyclodextrins-enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals", *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, 1997(14), 1-104, 1997.
- [4] T. Loftsson, M. E. Brewster, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins, I: drug solubilization and stabilization", *J Pharm Sci.*, 1996(85), 1017-1025, 1996.
- [5] R. Challa, A. Alka, A. Javed, R. K. Khar, "Cyclodextrins in drug delivery: an updated review", *AAPS Pharm Sci Tech.*, 2005(6), 329-357, 2005.
- [6] A. M. Denadai, K. I. Teixeira, M. M. Santoro, A. M. Pimenta, M. E. Cortes, R. D. Sinisterra, "Supramolecular self-assembly of beta-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine", *Carbohydr. Res.* 342, 2286–2296, 2007.
- [7] T. Irie, K. Uekama, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins 3. Toxicological issues and safety evaluation", *J. Pharm. Sci.* 86, 147–162, 1997.
- [8] E. M. M. Del Valle, "Cyclodextrins and their uses: a review", *Process Biochem.*, 39(9), 1033-1046, 2004.
- [9] The Merck Index. 14th Ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, p, 2006, 1061
- [10] N. M. Mahfouz, M. A. Hassan, "Synthesis, chemical and enzymatic hydrolysis, and bioavailability evaluation in rabbits of metronidazole amino acid ester prodrugs with enhanced water solubility", *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 841–8, 2001.
- [11] A. Celebioglu, T. Uyar, "Metronidazole/Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs as fast-dissolving oral drug delivery system", *Int. J. Pharm.*, 572, 11882, 2009.
- [12] C. T. Abhiman, J. H. Anantrao, "Phase solubility studies of glimepiride with β-cyclodextrin and hydroxy propyl-β-cyclodextrin in different pH", *Indo. Am. j. pharm.*, 7(08), 2017.
- [13] S. J. George, D. T. Vasudevan, "Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP-β-Cyclodextrin-Meclizine HCl Inclusion Complexes", *J Young Pharm.*, 4, 220-7, 2012.
- [14] J. Zeng, Y. Ren, C. Zhou, S. Yu, W. Chen, "Preparation and physicochemical characteristics of the complex of edaravone with hydroxypropyl-β-cyclodextrin", *Carbohydr. Polym* 83, 1101–1105, 2011.

- [15] E. Pinho, M. Grootveld, G. Soares, M. Henriques, "Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds", *Carbohydr. Polym.*, 101, 121-135, 2014.
- [16] T. Higuchi, K. A. Connors, "Phase Solubility Techniques", *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4, 117-150, 1965.
- [17] Y. V. Kazakevich, R. Lobrutto, "HPLC For Pharmaceutical Scientists". John Wiley & Sons, 2007.
- [18] K. Poturcu, E.Ç. Demiralay, "Determination of pKa Values for Some Benzimidazole and Imidazole Group Drugs Using the Reversed-Phase Liquid Chromatography Method", *J. Chem. Eng. Data*, 65, 5617-5626, 2020.
- [19] T. Higuchi, H. Kristiansen, "Binding specificity between small organic solutes in aqueous solution: Classification of some solutes into two groups according to binding tendencies", *J. Pharm. Sci.*, 59, 1601-1608, 1970.
- [20] L. Hu, H. Zhang, W. Song, D. Gu, Q. Hu, "Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin", *Carbohydr. Polym.*, 90, 1719-1724, 2012.
- [21] B. Cheirsilp, J. Rakmai, "Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications", *Biol Eng Med*, 2(1), 1-6, 2016.
- [22] R. Chadha, D. V. S. Jain, A. Aggarwal, S. S. D. Thakur, "Binding constants of inclusion complexes of nitroimidazoles with  $\beta$ -cyclodextrins in the absence and presence of PVP", *Thermochim. Acta*, 459, 111-115, 2007.
- [23] S. Bensouiki, F. Belaib, M. Sindt, S. Rup-Jacques, P. Magri, A. Ikhlef, A. Meniai, "Synthesis of Cyclodextrins-Metronidazole Inclusion Complexes and Incorporation of Metronidazole - 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex in Chitosan Nanoparticles". *J. Mol. Struct.*, 1247, 131298, 2022.
- [24] S. Malli, C. Bories, G. Ponchel, P. M. Loiseau, K. Bouchemal, "Phase solubility studies and anti-Trichomonas vaginalis activity evaluations of metronidazole and methylated  $\beta$ -cyclodextrin complexes: Comparison of CRYSMEB and RAMEB", *Exp. Parasitol.* 189, 72-75, 2018.