TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL KÖKENLİ ETKEN MADDE TAŞIYICI SİSTEM OLARAK FİTOZOMLARIN HAZIRLANMASI, TASARIMLA KALİTE ÇALIŞMALARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Volkan ERDEM

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ

ANKARA
2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL KÖKENLİ ETKEN MADDE TAŞIYICI SİSTEM OLARAK FİTOZOMLARIN HAZIRLANMASI, TASARIMLA KALİTE ÇALIŞMALARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Volkan ERDEM

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ

Bu araştırma TÜBİTAK 1005 kapsamında desteklenen SBAG-215S664 numaralı projenin bir kısmını oluşturmaktadır.

ANKARA
2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Bitkisel Kökenli Etken Madde Taşıyıcı Sistem Olarak Fitozomların Hazırlanması, Tasarımla Kalite Çalışmaları ve Değerlendirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Volkan ERDEM
Tarih: 28.01.2022
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında Volkan ERDEM tarafından hazırlanan 'Bitkisel Kökenli Etken Madde Taşıyıcı Sistem Olarak Fitozomların Hazırlanması, Tasarımla Kalite Çalışmaları ve Değerlendirilmesi' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.01.2022

Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Cansel ÖZKAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Fitozom	4
1.1.1.Fitozomların Yapısı ve Oluşumu	5
1.1.2. Fitozomların Avantajları	8
1.1.3. Fitozomların Üretim Yöntemleri	9
1.1.4. Fitozomların Karakterizasyonu	15
1.1.4.1. Fiziksel Karakterizasyon	15
1.1.4.2. Fitozomların Spektroskopik Karakterizasyonu	16
1.2. Berberin ile İlgili Genel Bilgiler	17
1.2.1. Molekül Formülü	17
1.2.2. Kapalı Formülü	18
1.2.3. Kimyasal İsmi	18
1.2.4. Fizikokimyasal Özellikleri	18
1.2.5. Farmakolojik ve Farmakodinamik Özellikler	18
1.3. Tasarımla Kalite Yaklaşımı – Quality by Design (QbD)	20
1.3.1. QbD'nin Adımları	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1. Gereçler	26

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler 26
2.1.2. Deneylerde Kullanılan Araçlar 27
2.1.3. Deneylerde Kullanılan Ortam ve İçeriği 28
2.2. Yöntem 29
2.2.1. Berberin Üzerine Yapılan Çalışmalar 29
2.2.1.1. Berberinin FTIR Spektrumunun Belirlenmesi 29
2.2.1.2. Berberinin DSC Spektrumunun Belirlenmesi 29
2.2.1.3. Berberinin UV Spektrumunun Belirlenmesi 29
2.2.1.4. Berberinin SEM Görüntüsünün Belirlenmesi 30
2.2.1.5. Berberinin Çeşitli Analitik Yöntemler ile Miktar Tayinlerinin Yapılması ve Kalibrasyonu 30
2.2.1.5.1. Berberinin Ultraviole (UV) Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini ve Kalibrasyonu 30
2.2.1.5.2. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu 30
2.2.1.6. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu 31
2.2.1.6.1. Doğrusallık ve Aralığı 31
2.2.1.6.2. Doğruluk ve Geri Elde 32
2.2.1.6.3. Kesinlik 32
2.2.1.6.4. Teşhis ve Tayin Sınırları 33
2.2.1.6.5. Özgünlük 34
2.2.1.7. Berberinin Çözünürlüğünün Belirlenmesi 34
2.3. Formülasyon Çalışmaları 35
2.3.1. Berberin-Fitozomlarının Hazırlanmasına Yönelik Önformülasyon Çalışmaları 35
2.3.1.1. İnce Film Oluşturma Yöntemi (Bangham) ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesi 36
2.3.1.2. Etanol Enjeksiyonu Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesi 37
2.3.1.3. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesi 37

2.3.1.4. Etken Madde Yükleme Etkinliği Tayini 38
2.3.1.5. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini 39
2.3.1.6. Zeta Potansiyel Tayini 39
2.3.2. Formülasyon Çalışmaları 39
2.4. QbD Yaklaşımla İdeal Formülasyonun Belirlenmesi 40
2.4.1. İdeal Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar 42
2.4.1.1. FTIR Spektrumunun Belirlenmesi 43
2.4.1.2. DSC Spektrumunun Belirlenmesi 43
2.4.1.3. SEM Görüntüsünün Belirlenmesi 43
2.4.1.4. Partisyon Katsayısı Tayini 43
2.4.1.5. İdeal Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliği 45
2.4.1.6. Salım Çalışması 45
2.4.1.7. Stabilite Çalışmaları 46

3. BULGULAR 48
3.1. Berberin Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular 48
3.1.1. Berberinin FTIR Spektrumuna Ait Bulgular 48
3.1.2. Berberinin DSC Spektrumuna Ait Bulgular 50
3.1.3. Berberinin UV Spektrumuna Ait Bulgular 50
3.1.4. Berberinin SEM Görüntüsünün Ait Bulgular 52
3.1.4. Berberinin Çeşitli Analitik Yöntemler ile Miktar Tayinlerinin Yapılması ve Kalibrasyonu 54
3.1.4.1. Berberinin Ultraviole (UV) Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini ve Kalibrasyonu Ait Bulgular 54
3.1.4.2. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu ait Bulgular 56
3.1.5. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Valibasyonu ait Bulgular 57
3.1.5.1. Doğrusallık ve Aralığı 57
3.1.5.2. Doğruluk ve Geri Elde 61
3.1.5.3. Kesinlik 62
3.1.5.4. Teşhis ve Tayin Sınırları 64

3.1.5.5. Özgünlük 65
3.1.6. Berberinin Çözünürlüğünün Belirlenmesi Ait Bulgular 67
3.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 68
3.2.1. Berberin-Fitozomlarının Hazırlanmasına Yönelik Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 68
3.2.1.1. İnce Film Oluşturma Yöntemi (Bangham) ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesine Ait Bulgular 68
3.2.1.2. Etanol Enjeksiyonu Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesine Ait Bulgular 68
3.2.1.3. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesine Ait Bulgular 70
3.2.1.4. Etken Madde Yükleme Etkinliğine Ait Bulgular 70
3.2.1.4.5. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular 70
3.2.1.6. Zeta Potansiyeline Ait Bulgular 71
3.2.2. Formülasyon Çalışmalarına ait Bulgular 71
3.3. QbD Yaklaşımla İdeal Formülasyonun Belirlenmesine Ait Bulgular 74
3.3.1. İdeal Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular 75
3.3.1.1. FTIR Spektrumuna Ait Bulgular 75
3.3.1.2. DSC Spektrumuna Ait Bulgular 80
3.3.1.3. SEM Görüntüsüne Ait Bulgular 82
3.3.1.4. Partisyon Katsayısı Tayinine Ait Bulgular 84
3.3.1.5. İdeal Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliğine Ait Bulgular 84
3.3.1.6. Salım Çalışmasına Ait Bulgular 85
3.3.1.7. Stabilite Çalışmasına ait Bulgular 87

4. TARTIŞMA 93
4.1. Berberin Üzerinde Yapılan Çalışmalara ait Bulguların Değerlendirilmesi 93
4.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 95
4.2.1. Berberin-Fitozomlarının Hazırlanmasına Yönelik Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 95
4.2.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 97

4.3. QbD Yaklaşımla İdeal Formülasyonun Belirlenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 97

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 103
ÖZET 105
SUMMARY 106
KAYNAKLAR 107
ÖZGEÇMİŞ 114

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, doğal kaynaklı bir bileşik olan antienflamatuvar etkisi ön planda olan ancak zayıf biyoyararlanımı olan berberin maddesinden hareketle 3 farklı yöntem kullanılarak fitozomların hazırlanması, hazırlanan fitozomların analizlerinin yapılarak incelenmesi ve bulguların bilim dünyasına sunulması amacıyla planlanmıştır.

Tez çalışmamın konu seçiminden tamamlanmasına kadar her aşamasında her türlü konuda yardımını benden esirgemeyen, hep yol gösterici olan, ilgisini ve desteğini hep hissettiren, bilgi ve tecrübelerini her zaman cömertlikle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ'a ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm saygıdeğer hocalarıma ve araştırma görevlilerine,

Deneyimini, bilgisini ve vizyonunu benimle paylaşan, tasarımla kalite çalışmalarım boyunca bana sınırsız destek sağlayan Prof. Dr. Buket AKSU'ya,

Her türlü desteği sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eczacılık Fakültesi'nin Dekanı ve meslek büyüğüm Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN'a, Gülhane Eczacılık Fakültesi'nin Dekan Yardımcısı hocam Prof. Dr. Ayhan SAVAŞER'e ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Cansel KÖSE ÖZKAN' ile Doç. Dr. Özgür EŞİM'e ve diğer öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

Özellikle Hakkâri'de görevde bulunduğu süreler de dâhil olmak üzere yardımlarını esirgemeyen Dr. Ecz. Aslıhan Hilal ALGAN'a ve Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Arş. Gör. Ecz. Ayça GÜNGÖR AK'a,

Yüksek lisans tez çalışmamı SBAG-215S664 numaralı araştırma projesi kapsamında destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığına,

MSB İlaç Fabrikası Müdürlüğünde görevli Savaş POLAT ve Sadet KANAT'a,

Güler yüzü ile her zaman pozitif enerjsini esirgemeyen Doç.Dr. Sevinç KURBANOĞLU'na,

Tez çalışmalarımda ve hayatımda her zaman destek olan, motivasyonumu arttıran sevgili eşim Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM'e teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%BSS % Bağıl Standart Sapma
%EE % Enkapsülasyon Etkinliği
%YE % Yükleme Etkinliği
°C Santigrad derece (Celcius)
CMA Kritik Materyal Özellikleri (Critical Material Attributes)
CPPs Kritik Proses Parametreleri (Critical Process Parameters)
CQAs Kritik Kalite Özellikleri (Critical Quality Attributes)
CTD Ortak Teknik Doküman (Common Technical Document)
Da Dalton
DoE Deney Tasarımı (Design of Experiments)
DSC Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (Differential Scanning Calorimetry)
DTA Diferansiyel Termal Analiz
EMA Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency)
EP Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia)
FD Faktöriyel Tasarım
FDA Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu (Food Drug Administration)
For. Formülasyon
FTIR Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)
GI Gastrointestinal
HPLC Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
ICH Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (The International Council on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
LOQ Tayin Sınırı (Limit of Quantification)
LOD Teşhis Sınırı (Limit of Detection)

MA Molekül Ağırlığı

mV Milivolt

PAT Proses Analitik Teknoloji

PI Polidisperse İndeksi

pKa Disosiasyon derecesi

ppm Milyonda bir birim (parts per million)

QbD Tasarımla kalite (Quality by Design)

QbT Test ile Kalite (Quality by Test)

QTPP Hedef Ürün Kalite Profili (Quality Target Product Profile)

r^2 Determinasyon Katsayısı

RPM Dakikada Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)

SEM Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

SH Standart Hata

SS Standart Sapma

TEM Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)

UV Ultraviyole

USP Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopoeia)

WHO Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

YSA Yapay Sinir Ağları

λ_{max} Maksimum absorbansın gözlendiği dalga boyu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Fitozom kompleksleşme reaksiyonu 5
Şekil 1.2. Fosfatidilkolinin kimyasal yapısı ve farklı yağ asitleri 7
Şekil 1.3. Berberinin molekül yapısı 17
Şekil 3.1. Berberinin elde edilen FTIR spektrumu 49
Şekil 3.2. Berberinin DSC termogramı 50
Şekil 3.3. Berberinin distile su içindeki UV spektrumu 51
Şekil 3.4. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu içindeki UV spektrumu 51
Şekil 3.5. Berberinin üç farklı ölçekteki SEM görüntüleri 53
Şekil 3.6. Berberinin distile sudaki kalibrasyon grafiği 54
Şekil 3.7. Berberinin pH 6,8 fosfat tampondaki kalibrasyon grafiği 55
Şekil 3.8. Berberinin distile su ortamındaki kalibrsyon doğrusu 56
Şekil 3.9. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki kalibrsyon doğrusu 57
Şekil 3.10. Berberinin distile su ortamındaki miktar tayini yönteminin doğrusallık grafiği 59
Şekil 3.11. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminin doğrusallık grafiği 60
Şekil 3.12. Formülasyonda kullanılan fosfolipite ait HPLC'de gözlenen kromatogram 65
Şekil 3.13. Berberin ve fosfolipitin üst üste getirilmiş kromatogramı 66
Şekil 3.14. (a) Fosfolipitin etanoldeki çözeltisi, (b) berberin-fitozomu ve (c) berberinin sudaki çözeltisi 68
Şekil 3.15. Oluşan veziküler yapının optik mikroskopta görünümü 69
Şekil 3.16. Berberinin FTIR spektrumu 76
Şekil 3.17. L-A-fosfatidilkolinin (egg yolk) FTIR spektrumu 77
Şekil 3.18. Fiziksel karışımın FTIR spektrumu 78
Şekil 3.19. Berberin-fitozomunun FTIR spektrumu 79
Şekil 3.20. DSC termogramı ve karşılaştırılması 81
Şekil 3.21. T25 kodlu formülasyona ait üç farklı ölçekteki SEM görüntüleri 83

Şekil 3.22. Berberin ve berberin-fitozomuna ait salım profilleri 86
Şekil 3.23. Piyasa preparatına ait salım profili 87
Şekil 3.24. 25°C ± 2°C / %60±5 BN stabilite koşulunda bekletilen T25 kodlu formülasyona ait SEM görüntüleri 88
Şekil 3.25. 5°C ± 3°C stabilite koşulunda bekletilen T25 kodlu formülasyona ait SEM görüntüleri 88
Şekil 3.26. DSC termogramları 89
Şekil 3.27. T25 kodlu formülasyonun başlangıçtaki ve stabilite çalışmaları sonundaki etken madde salım profillerinin karşılaştırması 91
Şekil 3.28. T25 kodlu formülasyona % 20 oranında silika ilave edildikten sonra elde edilen SEM görüntüleri 92

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Ticari olarak pazarlanan fitozomlardan örnekler 13
Çizelge 1.1. Devam Ticari olarak pazarlanan fitozomlardan örnekler 14
Çizelge 2.1. Berberinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan parametreler. 31
Çizelge 2.2. Etanol enjeksiyonu ve ters faz buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan deneme formülasyonları 38
Çizelge 2.3. Stabilite çalışmaları protokolü 46
Çizelge 3.1. Berberinin distile sudaki ve pH 6,8 fosfat tamponu içindeki kalibrasyon grafiklerine ait veriler 55
Çizelge 3.2. Berberinin kalibrasyon doğrusuna ait veriler 57
Çizelge 3.3. Berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin veriler 61
Çizelge 3.4. Berberinin distile su ortamında miktar tayini yönteminden elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları 61
Çizelge 3.4. Devam. Berberinin distile su ortamında miktar tayini yönteminden elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları 62
Çizelge 3.5. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminden elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları 62
Çizelge 3.6. Berberinin su ortamındaki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik sonuçları 63
Çizelge 3.7. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik sonuçları 63
Çizelge 3.8. Berberinin su ortamındaki miktar tayini yönteminin ara kesinlik sonuçları 64
Çizelge 3.9. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminin ara kesinlik sonuçları 64
Çizelge 3.10. Berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponundaki ortamındaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları 64

Çizelge 3.11. Berberin ve fosfolipitin kromotogramlarından elde edilen veriler 67
Çizelge 3.12. Kullanılan miktar tayini yöntemlerine göre hesaplanan çözünürlük sonuçları 67
Çizelge 3.13. Etanol enjeksiyonu yöntemi ile hazırlanan deneme formülasyonlarının sonuçları 69
Çizelge 3.14. Ters faz buharlaşma yöntemi ile hazırlanan deneme formülasyonlarının sonuçları 70
Çizelge 3.15. Etanol enjeksiyonu yöntemi kullanılarak elde edilen formülasyonlara ait sonuçlar 72
Çizelge 3.16. Ters faz buharlaşma yöntemi kullanılarak elde edilen formülasyonlara ait sonuçlar 73
Çizelge 3.17. Etanol enjeksiyon yöntemi için modelleme programından elde edilen ve kendisine en en fazla uyum gösteren formülasyon sonucu 74
Çizelge 3.18. Ters faz buharlaşma yöntemi için modelleme programından elde edilen ve kendisine en fazla uyum gösteren formülasyon sonucu 75
Çizelge 3.19. Berberin, fiziksel karışım (1:7) ve berberin-fitozomun sudaki, oktanoldeki çözünürlüğü ve partisyon katsayısı (Py/s) 84
Çizelge 3.20. T25 kodlu formülasyonun üretim tekrarlanabilirliğine ait sonuçları 85
Çizelge 3.21. 25°C ± 2°C / %60±5 BN ve 5°C ± 3°C'deki stabilite koşullarına tabi tutulan ve başlangıçtaki T25 kodlu formülasyona ait etken madde miktarı/yükleme etkinliğine ait sonuçlar 90
Çizelge 3.22. Stabilite çalışmaları sonunda elde edilen salım profillerinin fark faktörü ve benzerlik faktörü değerleri 91
Çizelge 4.1. E18 ve T25 kodlu formülasyonlara ait sonuçlar 98

1. GİRİŞ

Bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanımı antik zamanlara dayanmaktadır ve günümüzde de tıbbi bitkilerden ve aktif bileşenlerinden çeşitli hastalıkların tedavisinde faydalanılmaktadır. Özellikle son yıllarda doğal kaynaklardan elde edilen ürünlerle tedaviye ilgi giderek artmaktadır. Bu artan kullanımında; modern tedavi ile tüm hastalıkların etkili bir şekilde tedavi edilememesi, dikkatlerin son yıllarda sentetik ilaçların güvenilirlik ve emniyetleri üzerinde yoğunlaşması, sentetik ilaçların olası yan etkileri, bitkilerle tedavinin yan etkilerinin sentetik ilaçlara oranla daha az olduğu görüşü ve doğal ürünlerle tedavinin sentetik ilaçla kıyaslandığında daha az yan etki ile daha iyi sonuçlar verdiğinin yapılan çalışmalarla gösterilmesinin etkili olduğu düşünülmektedir. Geçtiğimiz yüzyılda bitki ekstreleri üzerinde, kimyasal bileşimleri ve geleneksel kullanımlarının konfirme edilmesi amacıyla çok sayıda kimyasal ve farmakolojik çalışma gerçekleştirilmiştir. 19. yüzyılda modern bilimin gelişmesi ile bitkilerin içerisinde bulunan ve tıbbi etkilere sahip kimyasal maddeler tanımlanmaya ve izole edilmeye başlanmıştır. Günümüzde de tıbbi bitkiler ve aktif bileşenleri çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Ekşi ve ark., 2020; Lu ve ark., 2019; Oloumi ve ark., 2011; Poursalehi ve ark., 2018; Raeiszadeh ve ark., 2018). Bununla beraber, bitkilerden elde edilen bazı aktif bileşenlerin zayıf oral biyoyararlınımları nedeniyle klinik uygulamasına yönelik tartışmalar devam etmektedir.

Bitkisel kökenli birçok etken maddenin suda iyi çözünürlük göstermesine rağmen yağda çözünürlükleri az ve molekül ağırlıkları fazla olduğundan pasif difüzyon için uygun değillerdir. Bu nedenle düşük biyoyararlanıma neden olurlar (Shivanand ve Kinjal, 2010).

Absorbsiyon ve biyoyararlanım sorunlarını gidermek maksadıyla araştırmacılar tarafından yeni ilaç taşıyıcı sistemler [polimerik nanopartiküller, lipozomlar, nanoemülsiyonlar, mikroküreler, transferzomlar, etozomlar, moleküler yapıda değişiklik yapılması (Pro-Drug) vb.] bitkisel ekstrelere / doğal kaynaklı etken maddelere uygulanmıştır (Lambert ve ark., 2006; Lu ve ark., 2016; Mulholland ve ark., 2001; Munin ve Edwards-Lévy, 2011; Ting ve ark., 2014). Bu çalışmalar neticesinde; doğal kaynaklı ekstrelerin/maddelerin çözünürlük, biyoyararlanım, farmakolojik aktivite, stabiliteleri üzerine iyileşme; fiziksel ve kimyasal degradasyondan koruma ve toksikolojik özellikleri üzerinde pozitif yönde kayda değer gelişmeler sağlanmıştır (Karataş ve Turhan, 2015).

Fito-fosfolipit kompleksleri, bitkisel kökenli kaynakların ilaç olarak üretimine engel olan bu sorunun giderilmesi için tasarlanmıştır (Ajazuddin ve Saraf, 2010; Shivanand ve Kinjal, 2010). Bu ilaç taşıyıcı sistem sayesinde bitkisel ilaçların mide-bağırsak lümeninde çözünürlüğü artırıldığı gibi membran geçirgenliği de iyileştirilmiştir (Loguercio ve ark., 2012). FDA onaylı bu sistem, ilaç hedefleme ve salım profilinin uzatılması amacıyla kullanılabilmektedir (Khan ve ark., 2013). Fitozom ya da herbozom olarak da adlandırılan bu kompleks bileşikler, fitoaktif bileşik (standarize bitkisel ekstreler dâhil) uygun bir çözücü/çözücü sistemi içinde fosfolipit ile stokiyometrik miktarlarda reaksiyona girmesi neticesinde elde edilir. Hem oral, hem de topikal kullanım için aynı miktarda etken madde ya da ekstre için yapılan testlerde fitozom formunun, fitozom formunda olmayana nazaran daha iyi biyolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Fitozom formülasyonu sayesinde özellikle pahalı olan etken maddeler için önemli olan, barsak bakterileri veya yıkıcı enzimlerin etkisinden korunma da sağlanmaktadır. Oral kullanımı mümkün olmayan bitkisel bileşiklerin uygun dozaj formlarının yapılabilmesinin önü açmıştır (Chen ve ark., 2010)

Berberin içeren bitkiler, dünyanın geleneksel bitkisel tedavi sistemlerinde önemli bir role sahiptir (Upton, 2020). Berberin taşıyan bitkiler, dünya genelinde geleneksel olarak tıbbi amaçlarla kullanılan *Phellodendron, Berberis,* anti-

enflamatuvar aktivitesi ile ön plana çıkan, izokinolon yapısında bir alkaloittir (Karataş ve Turhan, 2015; Zhang ve ark., 2014).

Tanaka ve ark., (1993) berberinin artrit gibi iltihaplı hastalıkların gelişiminde rol oynayan elastaz enziminin elastolitik aktivitesini inhibe ederek etki gösterdiğini bulmuşlardır (Tanaka ve ark., 1993). Berberin fitoaktif bileşiğinin antiromatizmal etkisinin yanı sıra nefroprotektif özelliği de bulunmaktadır ve bahsedilen yan etkileri de tolere edebileceği araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Domitrović ve ark., 2013; Othman ve ark., 2014).

Berberin yağda çözünürlüğü zayıf, molekül ağırlığı yüksek bir maddedir. Yapılan çalışmalarda da biyoyararlanımının oldukça düşük olduğu görülmektedir (Zhang ve ark., 2013). Bu nedenle fitozom hazırlamak için uygun bir aday olacağı düşünülmüştür.

Bu tez kapsamında ideal formülasyona ulaşmak için tasarım ile kalite (QbD) yaklaşımı ile veriler değerlendirilerek tasarım alanı içinde çalışma imkanına ulaşılacaktır. Bu tez kapsamında berberinin fitozomları etanol enjeksiyon ve ters faz buharlaştırma yöntemleriyle hazırlanmıştır. Bu formülasyonların yükleme etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü tayin edilmiştir. Bunların içinden QbD tasarımı ile ideal formülasyon belirlenmiştir. Bu formülasyonun SEM analizleri ile yapıları incelenmiştir. DSC analizi, çözünürlüğü, partisyon kat sayısı tayin edilmiştir. Etken madde salımı değerlendirilmiştir. İdeal formülasyonun berberinle karşılaştırmalı olarak *in vitro* stabilite sonuçları incelenmiştir.

1.1. Fitozom

Son yıllarda bitkisel kökenli etken maddelerin biyoyararlanımı ve dolayısıyla bitkisel kökenli ilaçların terapötik etkinliğini geliştirmek için birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Doğal olarak oluşan fosfolipit molekülleri ile kompleks oluşturma, zayıf emilen bitki özlerinin/etken maddelerinin biyoyararlanımını geliştirmek için potansiyel bir taşıyıcı sistem olarak ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni memeli hücre zarının lipid içeriğine benzeyen yapılarıdır (Virtanen ve ark., 1998).

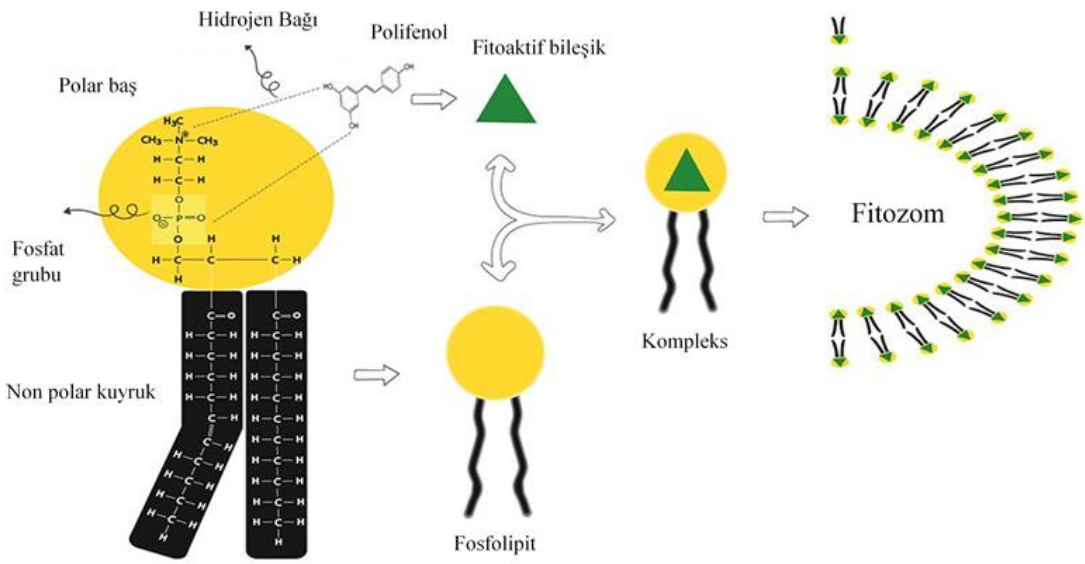
Fito-fosfolipit kompleksleştirme tekniği ilk olarak 1989 yılında İtalya'da polifenolik ekstrelerin fosfatidilkolin içeren fosfolipitlerle kimyasal olarak reaksiyona sokulmasıyla geliştirilmiştir. Yeni oluşturulan kompleksin, ham polifenolik ekstre ile karşılaştırıldığında biyoyararlanımını önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Saraf ve ark., 2013).

Fito-fosfolipit kompleksleri fitozom olarak adlandırılır. Fitozom kelimesi iki terimin birleşmesi ile oluşturulmuştur. Birinci terim olan "Fito" bitkiyi ve "zom" terimi ise hücre yapısına benzerliği ifade eder. Ayrıca fitozomlar herbazom olarak da adlandırılmaktadırlar (Bagade ve ark., 2017; Das ve Kalita, 2014; Tripathy ve ark., 2013).

Fitozomlar, bitkisel kökenli kaynakların ilaç olarak üretimine engel olan absorbsiyon ve biyoyararlanım sorunlarını giderilmesi için tasarlanmıştır (Ajazuddin ve Saraf, 2010; Shivanand ve Kinjal, 2010). Fitozomlar bitkisel kökenli ilaçların mide-bağırsak lümeninde çözünürlüğünü arttırdığı gibi membran geçirgenliğini de iyileştirmiştir (Loguercio ve ark., 2012) FDA onaylı bu sistemler, ilaç hedefleme ve salım profilinin uzatılması amacıyla kullanılabilmektedir (Saraf ve ark., 2013). İlk ticari fitozom *Silybum mariaum* bitkisinin ekstresi kullanılarak üretilmiştir (Kidd ve Head, 2005).

1.1.1.Fitozomların Yapısı ve Oluşumu

Fitozomlar, fitoaktif bileşik (standarize bitkisel ekstreler dahil) uygun bir çözücü/çözücü sistemi içinde fosfolipit ile stokiyometrik miktarlarda reaksiyona girmesi neticesinde meydana gelen çoklu molekül yapısında komplekslerdir. Polifenoller gibi aktif bir hidrojen atomuna (-COOH, -OH, -NH_2, -NH, vb.) sahip olan flavonoid ve triterpen benzeri moleküllerin fosfolipitlerin fosfat grupları arasında Van der Waals etkileşimi ve hidrojen bağlarının oluşması nedeniyle etkileşim meydana gelir (Barani ve ark., 2021; Pathan ve Bhandari, 2011; Pu ve ark., 2016; Semalty ve ark., 2010; Yanyu ve ark., 2006). Reaksiyon Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



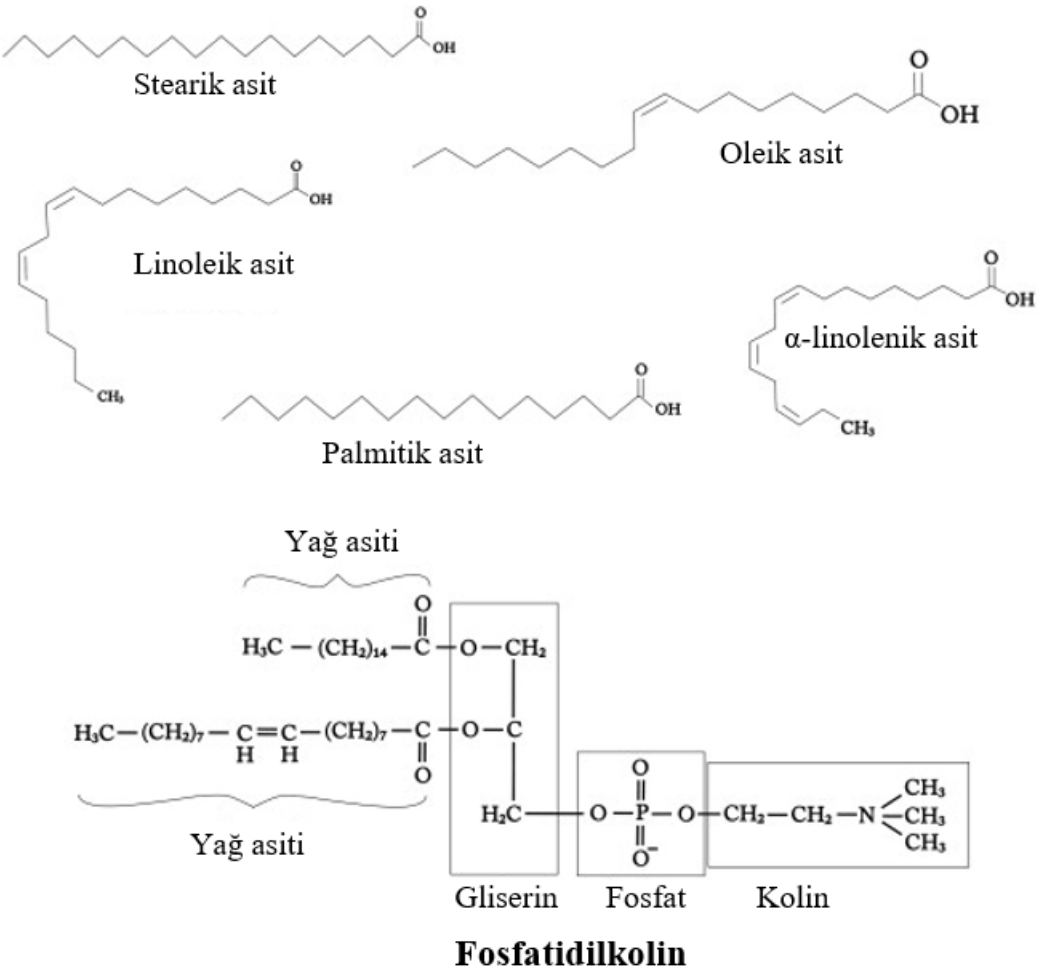
Şekil 1.1. Fitozom kompleksleşme reaksiyonu (Barani ve ark., 2021).

Fosfatidilkolin molekülünün hidrofilik kısmının suda çözünen fitoaktif moleküllere bağlandığı ve lipofilik olan fosfatidil kısmının ise hidrofilik kısımı zarf gibi çevreleyerek içine aldığı tespit edilmiştir (Gong ve ark., 2011; Singh ve ark., 2012; Vishal Saurabh ve Kesari, 2011).

Fitozomlar; fitoaktif bileşik, fosfolipit ve çözücüden oluşmaktadır (Lu ve ark., 2019).

Fosfolipitler, sulu ve yağlı ortamlarda önemli ölçüde çözünürlüğe sahip amfifilik moleküllerdir. Yapılarında polar ve polar olmayan kısımlar bulunur (Changediya ve ark., 2011). Fosfolipitler, memeli hücre zarının ana bileşenlerinden biridir. Ökaryotik hücre zarında ağırlıklı olarak fosfatidilkolin, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve kardiyolipin içeren gliserol bazlı lipidler bulunur. Fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin çoğu biyolojik zarın lipid yapısında en çok bulunan fosfolipitlerdir ve esas olarak hücre zarının temelini oluştururlar. Memeli hücre zarındaki farklı lipidlerin katkı yüzdesini gösterir. Fosfatidilkolin, silindirik bir şekle sahiptir ve çift tabaka oluşumunda rol oynar. Yapısında bir doymuş ve bir doymamış zincir bulunur. Fosfatidiletanolamin koni şeklindedir ve çift tabaka oluşturmaz (Van Meer ve De Kroon, 2011).

Doğal fosfolipitler de, birinci konumda doymuş bir yağ asidi (stearik asit veya palmitik asit gibi) ve ikinci konumda doymamış bir yağ asidi (oleik asit, linoleik asit veya araşidonik asit gibi) içerir (Changediya ve ark., 2011). Günümüzde soya fasulyesinden elde edilen fosfolipitler (%70 linoleik asit, linolenik asit ve oleik asit gibi yüksek çoklu doymamış yağ asitleri içeriğine sahip yaklaşık %76 fosfatidilkolin içeriğine sahip) içeren en yaygın olarak kullanılan fosfolipittir (Scholfield, 1981). Şekil 1.2'de fosfatidilkolinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Fosfatidilkolinin kimyasal yapısı ve farklı yağ asitleri (Saraf ve ark., 2013).

Soya-fosfolipitlerinin oral uygulandığı bir çalışmada, %90'dan daha büyük bir oranda emilim gösterdiği ve oral uygulamadan yaklaşık 6 saat sonra doruk plazma konsantrasyonuna ulaştığı belirlenmiştir. Ulaşılan maksimum plazma konsantrasyonu, uygulanan dozun %20'si olarak bulunmuştur (Zierenberg ve Grundy, 1982). Fosfolipitlerin, özellikle fosfatidilkolin içerenlerin, hücre zarında bulunan fosfolipitlerin yerini almak üzere hücre zarına dâhil edildiği ve dolayısıyla zarın akışkanlığını değiştirdiği tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2011).

Fosfolipitler ayrıca tıbbi açıdan önemli özelliklere sahiplerdir. Soya fosfolipitlerinin karaciğer koruyucu olduğu ve alkol, toksinler vb. tarafından karaciğere verilen hasarı önlediği gösterilmiştir (Gundermann ve ark., 2011). Ayrıca,

fosfolipitler kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğü ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeyini artırdığı bildirilmiştir (Cohn ve ark., 2008).

Fitozomların hazırlanması maksadıyla reaksiyon ortamı olarak çeşitli çalışmalarda farklı çözücülerden kullanılmıştır. Çözücü seçimi genelde fitoaktif bileşiğin ve fosfolipitin çözünürlüğüne bağlı olarak yapılmaktadır. Aprotik (aromatik hidrokardonlar, metilen klorür, siklik eterler, etil asetat vb.) ve protik (metanol, etanol vb.) çözücüler ile karışık (diklorometan - metanol, su - dietil eter, etanol - diklorometan vb.) çözücü sistemleri kullanılmaktadır (Das ve Kalita, 2014; Maiti ve ark., 2007; Mazumder ve ark., 2016; Saraf ve ark., 2013; Shakeri ve Sahebkar, 2016; Sikarwar ve ark., 2008).

1.1.2. Fitozomların Avantajları

Fitozomlar aşağıdaki avantajları sağlarlar (Gandhi ve ark., 2012; Kidd ve Head, 2005; Kumar ve ark., 2016; Naik ve Panda, 2008; Raina ve ark., 2014; Soumya ve Sahu, 2017)

- Suda çözünür fitoaktif bileşiğin emilimi ve biyoyararlanımı artar. Fitoaktif bileşiğin biyoyararlanımı arttığı için, istenen etkiyi üretmek için gereken fitoaktif bileşik miktarı azalır.
- Suda çözünür fitoaktif bileşiklerin, sindirim enzimleri ve bağırsak bakterileri tarafından yok edilmelerini önleyen fosfolipit ile sarılır.
- Fitozomlar hidrofilik ortamdan enterosit hücre zarına kolayca geçebildiğinden, fitoaktif bileşiklerin sistemik hedeflenmesi maksadıyla kullanılabilir.
- Kimyasal bağların oluşumu nedeniyle fitozomlar lipozomlardan daha iyi bir stabiliteye sahiptir.
- Fitozomun en önemli bileşenlerinden biri olan fosfatidilkolin, taşıyıcı görevi görmenin yanı sıra hepatoprotektif etkiye de sahiptir.
- Fitozomlar deriden oldukça kolay geçebilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle Fitoaktif bileşikler ile kozmetik ve diğer topikal kullanıma uygun fitozom formülasyonları yapılabilir.

- Fosfatidilkolin, hücre zarının bir parçası olduğu için taşıyıcı görevi görmenin yanı sıra hücre duvarını besler.
- Hedeflenen dokuya uygun ilaç dağıtımına yardımcı olur.
- Fitozomun bileşimi güvenlidir ve bileşenleri farmasötik kullanım için onaylanmıştır.
- Üretim süreci nispeten basittir.
- Ürünler için yüksek pazar talebi mevcuttur.

1.1.3. Fitozomların Üretim Yöntemleri

Fitozomlar genel olarak çözücü içerisinde kompleksleştirme tekniği ve süperkritik sıvıların kullanılmasıyla kompleksleştirme olmak üzere iki farklı ana yöntemle elde edilmektedir.

Genellikle reaksiyon ortamı olarak alkol veya organik çözücülerin kullanıldığı çözücü buharlaştırma/anti-solvan tekniği ile fitozomlar hazırlanmaktadır. Daha sık kullanılan çözücü buharlaştırma tekniğinde, fitoaktif bileşik ve fosfolipit aynı cam balon içine alınır. Tetrahidrofuran gibi organik veya etanol gibi uygun bir çözücü sistemi içinde uygun sıcaklıkta uygun süre reaksiyonun tamamlanması beklenerek enkapsülasyon etkinliği mümkün olan en iyi seviyeye getirilir. Anti-solvan ile çöktürme tekniğinde ise fitozomlar, içerisinde çözünmedikleri bir çözücüye (anti-solvan) ilave edilerek çöktürülürler ve reaksiyon ortamından ayrılırlar. Anti-solvan olarak genellikle n-hekzan veya n-oktanol kullanılmaktadır. Süperkritik sıvıların kullanıldığı yöntemler ise; başlıca SAS (supercritical antisolvent method), RESS (rapid expansion of supercritical solutions), GAS (gas anti-solvent technique) ve SEDS (solution enhanced dispersion by supercritical fluids) teknikleridir.

Sikarwar ve ark. (2008) marsupsin fitozomlarını anti-solvan ile çöktürme yöntemini kullanarak hazırlamışlardır. Fosfolipit kaynağı olan soya lesitinini dietileterde, marsupsini ise çift distile suda sonikasyon yardımıyla çözüp, marsupsin çözeltisini damla damla ve sonike ederek fosfolipit çözeltisine ilave etmişlerdir. Elde

edilen formülasyon dondurulduktan sonra analiz edilmiş ve % 44 yükleme etkinliğine ve % 20 kümülatif ilaç salımına ulaşılmıştır (Sikarwar ve ark., 2008).

Li ve ark. (2008) süperkritik sıvı tekniği ile pürarin-fitozomlarını hazırlamışlardır. Fitozomlar çözücü buharlaştırma, liyofilizasyon ve mikronize kristaller olmak üzere üç farklı geleneksel yöntemle de hazırlayarak bir karşılaştırma yapmıştır. Süperkritik sıvı tekniği olarak GAS ve SEDS yöntemlerini kullanmıştır. GAS tekniğinde pürarin ve fosfolipit süperkritik anti-solvan ilave edilmiş ve final basınca kadar bu işlem ayrı ayrı devam ettirilmiştir. Sonra reaksiyon kabı ajite edilmeden sabit sıcaklıkta 38 °C de ve 10 mPa basınçta bekletilmiştir. SEDS tekniğinde ise sıvı çözücü ve süperkritik antisolvan devamlı olarak çöktürme ünitesine ilave edilmiştir. Karbondioksit gazı 0,1 mm çaplı püskürtücüden fosfolipit ve pürarin karışımını içeren çözeltiye püskürtülmüştür. 35°C de ve 10 mPa basınçta %1 ilaç/fosfolipit kütlesel oranında ve 100 mg/mL pürarin konsantrasyonunda deney koşulları standardize edilmiş ve %93 verime ulaşılmıştır. SEDS tekniği ile elde edilen ürünün morfolojisi, istenen şekilde agrage partiküller halinde, 1 μm boyutundadır. Öte yandan geleneksel yöntemlerle elde edilen pütürlü ve yumrulu granüller erimiş ve kaynaşmış plakalar halindedir. SEDS tekniği ile elde edilen partiküllerin yüzey alanı 2,04 kat fazladır. Çözünme hızlarının ise konvansiyonel yönteme oranla 1,91 kat daha fazla olduğu görülmüştür. GAS tekniğinde morfolojik karakteristiğin kontrolünün kesinliği daha üstün olarak gözlemlenirken, SEDS tekniği ile elde edilen partküllerin kristalinitesi tamamen kaybolmuştur (Li ve ark., 2008).

Murugan ve ark. (2009) geleneksel yöntemlere benzeyen bir yöntemle andrografolid fitozomlarını hazırlamış ve patent almışlardır. Kullandıkları anti-solvan ile çöktürme tekniğinde, çözücü ortamı olarak diklorometan, anti-solvan olarak ise n-hekzan kullanılmıştır. Çözücü uzaklaştırdıktan sonra oluşan fitozomlar vakum altında kurutulmuştur (Murugan ve ark., 2009).

Yapılan daha yeni bir çalışmada, Jain ve ark. (2012) rutin ve fosfolipiti ayrı kaplarda metanolde çözerek, anhidr ko-solvan liyofilizasyon metodu ile fitozomlar

elde etmişlerdir. Çözeltiler bir araya getirilerek çözücü tamamen buharlaşana kadar mekanik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Fotomikrografi ile kristal formdaki rutinin tersine amorf yapıda rutin-fitozomlarının elde ettikleri gözlemlenmiştir. En iyi enkapsülasyon değerleri 1:3 rutin:fosfolipit oranı ile elde edilmiştir (Jain ve ark., 2012).

İlaç:fosfolipit molar oranı ile ilgili farklı bitkisel kaynaklarda en yüksek yükleme etkinliğine 0,5:1 ila 3:1 arasında ulaşılabildiği düşünülmektedir. Yue ve ark. (2010) oksimatrin-fitozomları farklı oranlarda etken madde ve fosfolipit (1:1, 1,4:1, 2:1, 2,6:1 ve 3:1) kullanarak tasarladıkları bir çalışmayla hazırlamışlardır. 3:1 oranında tasarlanan formülasyonun 60°C de 3 saat kompleksleşme süresi ile maksimum verim sağladığı görülmüştür (Yue ve ark., 2010).

Qin ve ark. (2010) bergenin-fosfolipit komplekslerini 0,9:1 molar oranda 80 g/L konsantrasyonda ve 60 °C de en yüksek verimle hazırlamışlardır (Qin ve ark., 2010). Pathan ve Bhandari (2011) 1:0,5 ila 1:3 arasındaki embelin:fosfatidilkolin molar oranı ile çalışarak optimal yükleme etkinliğini 1:3 oranındaki formülasyon % 8,4 ile sergilediğini tespit etmişlerdir. Doğal olarak yağda çözünürlüğü iyi olan embelinin suda çözünürlüğünün artırılması ile yükleme etkinliğinin arttığı sonucuna vararak, bu çalışmanın özgün yönünü ortaya koymuşlardır. Çünkü daha önceki çalışmalarda sadece suda çözünürlüğü yüksek, yağda çözünürlüğü düşük etken maddelerle çalışılmıştır (Pathan ve Bhandari, 2011).

Reaksiyon ortamı için farklı araştırmacılar çeşitli çözücülerden yararlanmışlardır. İlk etapta metilen klorür, etil asetat ve dioksan gibi aprotik çözücüler kullanılmış, daha sonra ise etanol, metanol gibi protik çözücüler büyük ölçüde onların yerini almıştır. Yue ve Yuan (2009) reaksiyon ortamı olarak tetrahidrofuran kullanmışlardır (Yue ve Yuan, 2009). Maiti ve ark. (2010) ve bir çok araştırmacı ise diklorometanı tercih etmişlerdir. Son dönemde araştırmacıların büyük bir bölümü mutlak etanol kullanmaktadır (Maiti ve ark., 2010).

Araştırmacılar formülasyonda kullanacakları fosfolipit için çeşitli kaynaklardan faydalanmaktadır. Bu seçimde en önemli kriter, içerdikleri fosfatidil- grubu oranıdır. Soya lesitini, fosfatidilserin ve 1,2-distearil-sn-glisero-3-fosfokolin kullanılan kaynaklardan bazılarıdır. Soya fasulyesi fosfolipitleri, memeli plazma zarına benzeyen yüksek fosfatidilkolin oranı sebebiyle en çok tercih edilen kaynaktır.

Fitozom oluşturma tekniği ile ilgili bugün gelinen noktada bir çok standart ekstre ve bitkisel etken madde yukarıda özetlenmeye çalışılan yöntemlerle formülasyon haline getirilmiştir (Semalty ve ark., 2010). Yüksek etkili olmasına rağmen düşük biyoyararlanım gösteren bir çok bitkisel ilaç molekülü, bu formülasyon teknolojisi sayesinde biyoaktivitesi ve klinik değerinin artması için bir potansiyel oluşturmaktadır.

Bir İtalyan firması olan “Indena” çeşitli bitkisel ekstre ve etken maddeler ile çalışmaktadır ve “fitozom” temelli yaklaşık yirmi civarında preparatına patent almış bulunmaktadır (Alam ve ark., 2013; Bombardelli ve Patri, 1992). Ticari olarak pazarlanan fitozomlara örnekler Çizelge1.1.’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Ticari olarak pazarlanan fitozomlardan örnekler (Karataş ve Turhan, 2015).

Ticari Adı	**Bitkisel Kaynağı**	**Analiz**	**Biyolojik Aktivite**
18β-Glycyrrhetinic Acid Phytosome®	*Glycyrrhiza glabra* L.- Kök	≥27.0% ≤31.0% 18β-glisiretinik asit	Yatıştırıcı
Greenselect® Phytosome®	*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze - Genç yaprak	≥19.0% ≤25.0% polifenoller	Antioksidan
Hawthorn Phytosome®	*Crataegus* spp. - Çiçekli dal uçları	≥3.0% of viteksin-2''-O-ramnozit	Kardiyovasküler etkili
Leucoselect® Phytosome®	*Vitis vinifera* L. - Tohum	≥25% ≤30% proantosiyanidin	UV koruyucu Antioksidan
Proanthocyanidin A2 Phytosome®	*Aesculus hippocastanum* L. – Kabuk	≥31.0% ≤37.0% proantosiyanidin	Cildi sıkılaştırıcı, UV koruyucu
Resveratrol Phytosome®	*Polygonum cuspidatum* Sieb. e Zucc. - Rizom	≥30% resveratrol	Antioksidan, Yaşlanmayı geciktirici
Sericoside Phytosome®	*Terminalia sericea* Burch. ex. DC. – Kök Kabuğu	≥25.0% serikozit	UV koruyucu, Antioksidan, Yatıştırıcı
Silymarin Phytosome®	*Silybum marianum* (L.) Gaertn. - Meyve	≥15.0% ≤20.0% flavolignanlar	UV koruyucu, Antioksidan Karaciğer koruyucu
Siliphos® Silybin Phytosome®	*Silybum marianum* (L.) Gaertn. - Meyve	≥29.7% ≤36.3% silibin	Karaciğer koruyucu
Meriva® Turmeric Phytosome®	*Curcuma longa* L. - Rizom	≥18.0% ≤22.0% kurkuminoidler	Antienflamatuvar
Centella Asiatica Triterpene Phytosome®	*Centella asiatica* (L.) Urban - Yaprak	≥30.0% ≤35.0% seçili triterpenler	Kollajeni tamir edici, Kırışıklık giderici

Çizelge 1.1. Devam Ticari olarak pazarlanan fitozomlardan örnekler (Karataş ve Turhan, 2015).

Ticari Adı	Bitkisel Kaynağı	Miktar	Biyolojik Aktivite
Escin *β*-Sitosterol Phytosome®	*Aesculus hippocastanum* L. - Tohum	≥32.0% ≤40.0% essin	Kapiler oluşumu sağlayıcı
Ginkgoselect® Phytosome®	*Ginkgo biloba* L. - Yaprak	≥7.0% flavon glikozitleri, ≥ 0.8% bilobalid	Antioksidan, Vazokinetik
Virtiva®	*Ginkgo biloba* L. - Yaprak	≥5.0% flavon glikozitleri fosfatidilserin	Biliş arttırıcı
Dimeric Flavonoids Phytosome®	*Ginkgo biloba* L. - Yaprak	≥10.0% total biflavonlar	Lipolitik, Vazokinetik, Fosfodiesteraz inhibitörü
Terpenes Phytosome®	*Ginkgo biloba* L. - Yaprak	≥30.0% ginkgoterpenleri	Antialerjik, yatıştırıcı
Ginselect® Phytosome®	*Panax ginseng* C.A. Meyer - Kök	≤40.0% ginsenge özgü içerik	Adaptojen, tonik, Cildi sıkılaştırıcı
Visnadex® Visnadin Phytosome®	*Ammi visnaga* (L.) Lam. – çiçek durumu	≥10.0% ≤13.0% visnadin	Vazokinetik
Frankincense Phytosome®	*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. - Reçine	≥25% bosvelik asitler	Yatıştırıcı
Casperome™ Boswellia Phytosome®	*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. - Reçine	≥25% bosvelik asitler	Antienflamatuvar, Yatıştırıcı

1.1.4. Fitozomların Karakterizasyonu

Fitozomlar morfolojik şekil, partikül büyüklüğü ve dağılımı, formülasyon içine yüklenen etken maddenin yüzdesi, formülasyondan salınan etken madde yüzdesi, kristalite ve erime noktası gibi fiziksel nitelikler ile karakterize edilebilirler. Kimyasal kompozisyon karakteristikleri fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleriyle belirlenebilir. Bunlara ek olarak formülasyonlardan etken madde miktarlarının tayin edilebilmesi amacıyla çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler de kullanılmaktadır; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile ölçüm de son zamanlarda fitozom karakterizasyonunda ön plana çıkmaktadır (Karataş ve Turhan, 2015; Qin ve ark., 2010).

1.1.4.1. Fiziksel Karakterizasyon

a. Görüntüleme: Fitozomların morfolojisi taramalı elekron mikroskopu (SEM), geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskopu (AFM) kullanılarak görüntülenebilir (Agarwal ve ark., 2012). Morfolojik görüntüleme çalışmaları çoğunlukla partikül boyutunun, yakalama davranışının (aktif molekülün fosfolipite tutunması), yüzey özelliklerinin gözlenmesi ve partikül yüzeyinde olası safsızlıkların varlığını tanımlamak için kullanılmaktadır.

b. Etken madde yükleme kapasitesi: Genellikle ultra sanrifüjleme yöntemi kullanılarak ölçülmektedir. İndirekt veya direkt yöntem kullanılabilir. Spektroskopik veya kromatografik yöntemlerle formülasyon içine yüklenen aktif madde miktarı belirlenebilir.

c. Termal analiz: Fitozom gibi veziküler lipit sistemlerin geçiş sıcaklıkları ölçümü diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılmaktadır.

d. Partikül boyutu ve dağılımı-Zeta potansiyel: Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle veya foton korelasyon spektroskopisi ile ölçülmektedir.

e. Vezikül stabilitesi: Fitozomların stabilitesi zaman içinde vezikülün partikül boyutu ve morfolojik yapısındaki değişim ölçülerek değerlendirilir. Yapısal değişikler SEM, TEM ile belirlenebilirken; partikül boyutunda meydana gelen değişimler dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle ölçülebilir (Bhagyashree, 2015).

1.1.4.2. Fitozomların Spektroskopik Karakterizasyonu

Kompleks oluşumunun doğrulanması ve fitoaktif bileşen ile fosfolipit arasındaki bağların oluşup oluşmadığının ve değerlendirilmesi amacıyla bazı spektroskopik analizler yapılmaktadır.

a. FTIR: Fitozom komplekslerinin tespiti için en kesin yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntemde ayrı ayrı bileşenlerin, kompleksin ve fitozomu meydana getiren maddelerin ayrı ayrı ve tüm bileşenlerin fiziksel karışımın spektrumları karşılaştırılmaktadır (Amit ve ark., 2013; Vu ve ark., 2018). Fitozom formülasyonunda fitoaktif bileşiğin serbest grubu fosfolipitin polar grubu olan kolin kısmı ile etkileşmektedir. Bu nedenle —OH piki yerine geniş bir pik görülmesi fıtozom kompleksinin doğru oluştuğunu göstermektedir. Fitozomların stabilitesi de bu yöntemle analiz edilebilmektedir.

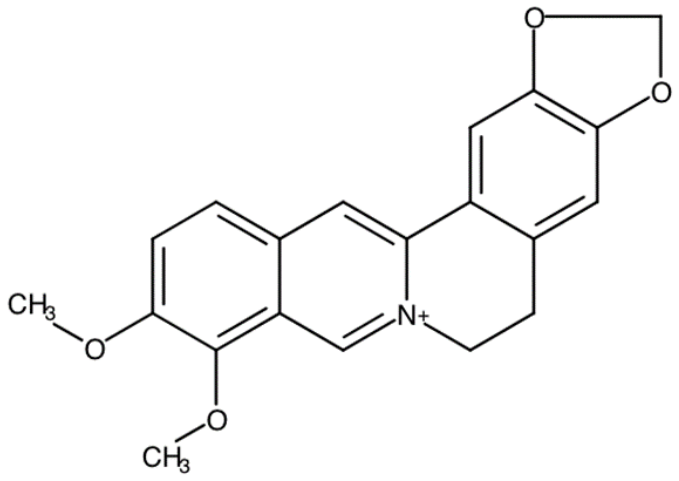
b. NMR: Aktif bitkisel bileşik ve fosfolipit arasında kompleks oluşup oluşmadığının tayin edilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. Kompleks oluşumu nedeniyle sinyallerdeki değişimler ve kaymalar yorumlanarak fitozomun değerlendirmesi yapılmaktadır.

1.2. Berberin ile İlgili Genel Bilgiler

Berberin, yapısal olarak protoberberin sınıfından olan, izokinolon (kuaterner benzil izokinolin) yapısında kuaterner alkaloit yapısında olan bir maddedir. Berberin taşıyan bitkiler, dünya genelinde Ayurveda, homeopati, Unani ve Geleneksel Çin Tıbbı gibi neredeyse tüm geleneksel tıp sistemlerinde yer almaktadır ve bu bitkilerin kullanımları 3000 yıla dayanmaktadır. *Berberis vulgaris, B. aquifolium, B. aristata, B. thunbergii, Hydrastis canadensis, Coptis chinensis, Phellodendron chinense, Phellodendron amurense* gibi bitkiler tıbbi olarak kullanılan kısımları olan kök, rizom ve kabuklarında berberin taşır (Bharti ve ark., 2018; Birdsall, 1997; Lau ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2014). Bu bitkilerin etkilerinden sorumlu olarak berberinin dışında taşıdıkları diğer etken madde gruplarının da etkisi olduğu ileri sürülse de gösterdikleri etkilere istinaden yapılan çalışmalar daha çok bitkiler ve/veya berberin üzerine gerçekleştirilmiştir (Imenshahidi ve Hosseinzadeh, 2019).

Deneylerde berberin hidroklorür tuzu kullanıldığından diğer özellikleri berberin hidroklorür üzerinden verilmiştir.

1.2.1. Molekül Formülü



Şekil 1.3. Berberinin molekül yapısı.

1.2.2. Kapalı Formülü

Berberin: $C_{20}H_{19}NO_4^+$

Berberin klorür dihidrat: $C_{20}H_{18}NO_4.Cl.2H_2O$

1.2.3. Kimyasal İsmi

5,6-Dihidro-9,10-dimethoksibenzo[*g*]-1,3-benzodioksolo[5,6-*α*]kinolizin (O'Neil, 2001).

1.2.4. Fizikokimyasal Özellikleri

Tez çalışmasında berberin klorür dihidrat tuzu kullanılmıştır. Sarı kristaller şeklindedir. Soğuk suda az çözünür, kaynar suda iyi çözünür. Soğuk alkol, kloroform ve eterde pratikte çözünmez (O'Neil, 2001).

Berberin Erime noktası: 145°C

Berberin UV max: 265 nm

1.2.5. Farmakolojik ve Farmakodinamik Özellikler

Ana bileşen olarak berberin taşıyan bitkiler, başlıca Geleneksel Çin Tıbbı ve Ayurveda olmak üzere hemen hemen tüm geleneksel tıp sistemlerinde antienflamatuvar, antidiyabetik, konstipasyona karşı, hazımsızlığa karşı, yara iyi edici olarak 3.000 yıla dayanan kullanıma sahiptir (Birdsall, 1997; Neag ve ark., 2018). Bu kullanımlar doğrultusunda berberin üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmış bu çalışmalarla antioksidan, kardiyoprotektif, hipolipidemik, hepatoprotektif, nefroprotektif, immünomodülatör, antiproliferatif, antineoplastik, antimikrobiyal, antipiretik etkileri ortaya konulmuştur (Birdsall, 1997; Chen ve ark., 2011; Neag ve ark., 2018).

Berberinin etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, uygulandıktan sonra proteinlerin aktivasyonunu baskıladığı ve/veya tümörigenez ve enflamasyonda yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlediği, ancak etki mekanizmasının bunlarla sınırlı olmadığı görülmektedir. Transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kappa B (NF-kB), miyeloid hücreli lösemi 1 (Mcl-1), B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2), B hücreli lenfoma-ekstra büyük (Bcl-xl), siklooksijenaz ile sınırlıdır (COX)-2, tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin (IL)-6, IL-12, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), E-selektin, monosit kemoatraktan protein -1 (MCP-1), CXC motifli kemokin 2 (CXCL2), siklin D1, aktivatör protein (AP-1), hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF-1), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3), peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör (PPAR), arilamin N-asetiltransferaz (NAT) ve DNA topoizomeraz I ve II. Gen ekspresyonunun modülasyonu, hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükleyebilir ve kanser hücresi proliferasyonunu inhibe edebilir. Ek olarak, berberin lipid ve glukoz metabolizmasını modüle eder (PubChem Database, 2016).

Berberin, zayıf intestinal absorbsiyona ve oral biyoyararlınıma sahiptir. Ratlarda oral biyoyararlanımının %1'den az olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Berberinin biyoyararlınımı klinik çalışmalar ile de araştırılmış ve zayıf olduğu bulunmuştur. İnce bağırsak ve midedeki asidik ortamda self-agregatlarının oluşması, intestinal ilk geçiş eliminasyonu, P-glikoprotein pompaları ile etkileşmesi ve karaciğerde yüksek ekstraksiyon ve dağılım, berberinin oral uygulamadaki bariyerleridir. Zayıf biyoyararlanımı berberinin klinik kullanılışını sınırlamaktadır ve bu doğrultuda son yıllarda berberinin biyoyararlanımını iyileştirmeye yönelik farklı stratejiler/yöntemler denenmeye başlanmıştır. Yapılan bir klinik çalışmada berberin silimarin ile birlikte verilerek, tek başına kullanımına göre HbA1C değerinde daha anlamlı düşüş sağladığı belirlenmiş, bu durum biyoyararlınıma değil ancak olası bir additif etkileşime bağlanmıştır (Imenshahidi ve Hosseinzadeh, 2019). Berberinin bağıl biyorarlınımının ve D-α-tokoferil polietilen glikol suksinat 1000 (TPGS) maddesinin intestinal absorbsiyonu üzerine etkisinin ratlar üzerinde araştırıldığı bir

çalışmaya göre berberinin çok düşük bağıl biyoyararlınıma sahip olduğu ve TPGS'nin berberinin intestinal absorpsiyonunu anlamlı ölçüde arttırabileceği belirlenmiştir ve bu etkinin P-gp inhibisyonuna bağlı olabileceği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2011).

1.3. Tasarımla Kalite Yaklaşımı – Quality by Design (QbD)

Formülasyon geliştirme aşamasından bitmiş ürüne kadar, hammadde ve proses koşulları arasında çok değişkenli etkileşimleri içeren ilaç üretimi süreci oldukça komplekstir. İşlem kabiliyeti ve bitmiş ürünün kalitesi için çok önemli olan bu etkileşimleri anlayabilmek ve kontrol etme gerekliliği, ilaç geliştirme maliyetlerini ve ürün ruhsatlandırmasında yaşanan problemleri arttırmıştır. Mevcut duruma entegrasyonu sağlamak amacıyla Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2002 yılında İlaç Endüstrisinde "Güncel İyi Üretim Uygulamaları" (cGMP) yeniliklerini duyurmuştur. Bu yenilikler kapsamında, "Tasarımla Kalite" (QbD) kavramı, kritik süreç ve ürün niteliklerinin bilimsel olarak daha iyi anlaşılmasını içine alan, geliştirme evresinde bilimsel anlayış limitlerine dayalı olarak kontroller ve testler tasarlayan ve ürünün yaşam döngüsü boyunca edinilen bilgiyi sürekli iyileştirme ortamında çalışmak için kullanan bir yaklaşım olarak tanımlanmıştır (European Medicines Agency (EMA), 2017; Garcia ve ark., 2008).

Farmasötik kalite; Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından etiketi üzerinde belirtildiği şekilde, tüketiciye terapötik yarar sağlayan, kontaminasyon içermeyen ürün olarak tanımlanır. Belirgin eksiklikleri olan bir formülasyon, etkili bir terapötik ürün olarak kabul edilmeyebilir ve ruhsat alamaz. Formülasyon geliştirilmesinde en önemli kriter kalite gereksinimlerinin karşılanmasıdır. Farmasötik endüstride standart kalite kontrol (QC) önlemleri, bitmiş ürünün kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik parametrelerinin üretim sonrası seriden seriye göstereceği varyasyonları da hesaba katacak şekilde final ürünün dağıtımından miyadına olan süreçteki spesifikasyonlarının kalite kontrol testlerini içerir. Final ürün üzerinde yapılan kalite kontrol testleri, ürünün genel kalitesinin ortaya konmasında

çok önemli olsa da ürünün tüm kalite kriterlerinin belirlenmesi bakımından yeterli görülmemektedir. Yüksek kaliteli ürüne ulaşmak, bileşenlerin seçiminden başlayarak, tarama ve formülasyon geliştirme çalışmaları, ölçek büyütme ve proses optimizasyonu dahil olmak üzere tüm üretim proseslerinin oluşturulmasında belli bir kalite inşa edilmesi ile sağlanabilir. Formülasyon geliştirme aşamasından bitmiş ürüne uzanan bu süreç, oldukça kompleks ve yüksek maliyetlidir ve bu çoklu kontrol sistemi ürünlerin ruhsat alma süreçlerini de zorlaştırmaktadır. FDA, 2002 yılında, farmasötik endüstride, bitmiş ürünün kalite kontrol testlerinin gerçekleştirilmesi yerine kalitesini tasarlamaya zorlayan, "tasarımla kalite (Quality by Design - QbD)" adlı yeni bir farmasötik düzenleme konseptini duyurmuştur (Yüce ve Çapan, 2010; Namjoshi ve ark., 2020). Tasarımla kalite (QbD) kavramı, International Conference on Harmonisation (ICH) Q8 kılavuzunda "Sağlam bilim ve kalite risk yönetimine dayalı olarak, önceden tanımlanmış hedeflerle başlayan, ürünü, sürecin anlaşılması ve süreç kontrolünü vurgulayan sistematik bir gelişim yaklaşımı" olarak tanımlanmıştır (European Medicines Agency (EMA), 2017)

Ürün tasarımının bu modern yönü, kalite hedef ürün profili (QTPP) olarak adlandırılan bir kalite gereksinimleri listesi tanımlamakla başlar. ICH Q8, QTPP'yi "İlaç ürününün güvenliğini ve etkinliğini dikkate alarak, istenen kaliteyi sağlamak için ideal olarak elde edilecek bir ilaç ürününün kalite özelliklerinin ileriye dönük bir özeti" olarak tanımlar. Bu kalite gereksinimlerine kalite öznitelikleri denir ve QTPP'nin farklı bileşenlerini, yani fizikokimyasal özellikleri doğru bir şekilde karakterize etmek için, bunlardan hangisinin potansiyel olarak bir formülasyonun kritik kalite öz nitelikleri (CQA'lar) olabileceğini anlamak zorunludur.

Bu tez çalışmasında ideal formülasyona ulaşmak için tasarımla kalite (QbD) yaklaşımı ile veriler değerlendirilerek tasarım alanı içinde çalışılması amaçlanmıştır. QbD önceden tanımlanmış amaçlarla başlayıp ürün ve sürecin sağlam bilim ve kalite risk yönetimine dayalı olarak anlaşılmasının yerindeliğini vurgulayan sistematik bir ilaç geliştirme yaklaşımı olarak tanımlanmıştır. Böylece belirli bir ilaç veya hedef üzerinde en olası bilimsel anlayışa sahip olarak, güvenlik ve etkinlik konusunda

klinik denemelerde başarısız olacak adayları erken safhadayken eleyebilme becerisine sahip olunacaktır.

Deney tasarımı (DoE), kritik proses parametrelerinin belirlenmesi ve tasarım alanının oluşturulması evrelerinden oluşur. Etken madde, parametre/formülasyon değişkenleri, işlem değişkenleri ile bitmiş ürün kalite özelliklerinin ilişkilendirilmesinde çoklu değişkenli veri analizleri kullanılır. Tasarlanmış bir deney; test verilerinin toplanması için kullanılan bir araç veya araçlar kümesidir. Deney tasarımının genel özellikleri planlanmış testler, veri analiz yaklaşımı, eş zamanlı faktör değişimi ve bilimsel yaklaşımdır. DoE, varsayımları test etmek için gerçekleştirilecek deneylerin seçiminde tüm aşamalarla ilgilidir. Bu deneysel öznelerin seçimi, yapılacak faaliyetler ve ölçümlerin yanı sıra ölçüm aletlerinin seçimini de içerir. Bunların tamamı bu alandaki bilginin durumuna ve ölçümleri yapmak için kullanılacak olan teknolojiye bağlıdır.

QbD çalışmalarında veri değerlendirmesi için; istatistiksel metotlar, faktöriyel tasarım gibi model oluşturma yöntemlerinin yanı sıra yapay zeka teknolojileri de deney tasarımı yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bulanık mantık, ANN ve GEP gibi yapay zeka teknolojilerini kullanan yazılımlar da mevcuttur. Bunlara örnek olarak FormRules V3.32 ve INForm V.5.1 GEP (gene expresion program) programları verilebilir. FormRules, Intelligensys Ltd. tarafından oluşturulan ve temel teknoloji olarak nörobulanık mantıktan yararlanan bir veri madenciliği yazılım paketidir. Verilere hangisinin daha iyi uyduğunu görmek için bir dizi modeli denemekte ve sonrasında modeli iyileştirmektedir. Program nöro bulanık mantık kullanarak önemli değişkenleri seçip en uygun modeli geliştirmek için çeşitli modeller denemektedir; basit ile başlayan ve daha sonra yine basit modeller geliştirirken hangi verinin en uygun olduğunu görmek için daha karmaşık modeller çalışır. İstatistiksel kriterler uyum ile basitliği dengeleyen bir model seçmek için kullanılır (Aksu, 2013).

QbD yaklaşımı başlıca kritik olan ürün nitelikleri ve süreç parametreleri ile kritik olmayanlar arasında bir ayırımı gerektirmektedir. Parametrelerin kritik olarak

belirlemek için risk değerlendirmeleri yapmak ve tanımlanan riskleri yönetmek amacıyla, ICH Q9 kılavuzu yayınlanmıştır. Bu kılavuz, ilaç kalitesinin farklı yönlerine uygulanabilecek kalite risk yönetimi prensiplerini sunar. Kalite risk yönetimi ilacın ömrü boyunca kalitesi ile ilgili risklerin değerlendirilmesi, kontrolü, iletimi ve gözden geçirilmesi işlemidir. ICH Q9 kılavuzuna göre "Kalite risk yönetimi" bilimsel bilgiye dayanmalıdır ve hastanın korunması ile ilgilidir. Ayrıca kalite risk yönetim işleminin hedefi, formalitesi ve dokümantasyonu risk sınıfı ile orantılı olmalıdır. Kalitede risk yönetimi her zaman uygulanmış, bununla birlikte Q9 ile kalitede risk yönetimine sistematik yaklaşım getirilmiştir. Kalite yönetimi, risk değerlendirmesi, kontrolü ve izlenmesi gibi çeşitli adımlar içeren bir metodoloji olup; uygulanırken akış diyagramları, sebep – sonuç diyagramları, Hata Modu Etkileri Analizi (FMEA) gibi pek çok araçtan faydalanılabilmektedir ((EMA), 2021; Mesut ve ark., 2015). Risklerin yönetimi ile QbD yaklaşımında kaliteyi en çok etkileyen parametreler üzerinde yoğunlaşarak kalite güvencesini sağlamak formülasyon geliştirme sürecinin maliyet, zaman ve iş gücü açısından iyileştirilmesini desteklemektedir.

1.3.1. QbD'nin Adımları

QbD yaklaşımının adımları arasında Kalite Hedef Ürün Profilini belirlemek; bu profile istinaden belirlenen kalite özellikleri ve bu özellikleri etkileyen proses ve formülasyon parametrelerinin risk analizleri ile belirlenmek; daha sonra uygun deneysel tasarımla kritik parametrelerin ürünün kritik kalite özellikleri ile ilişkisi ve çoklu etkileşimlerini matematiksel modelleme ve yapay zeka metotları ile ortaya koymak ve bunun sonucunda kalite özelliklerinin her daim limit içinde olmasını sağlayan tasarım alanı oluşturmak ve optimizasyon yaparak formülasyon ve proses değişkenlerinin en uygun değerlerini bulmak yer alır (Aksu, 2013).

Hedef ürün kalite profilinin (Target Product Quality Profile - TPQP) ilaç geliştirme için stratejik temeli oluşturan bir araçtır "en ince ayrıntılara kadar planlama yapmayı sağlar." TPQP bir formülasyon ve üretim prosesini tasarlamak ve

optimize etmek için kullanılabilen, klinik güvenlik ve yararlılık bakımından nicelik olarak yerine geçen bir unsurdur. Safsızlıklar, stabilite, salım profilleri ve diğer ürüne has performans gereklilikleri açısından sayısal hedefler içermelidir.

Kritik Kalite Özelliği (Critical Quality Attributes - CQAs), "Ürünün kalitesini güvence altına almak için doğrudan veya dolaylı olarak kontrol edilmesi gerekli fiziksel, kimyasal, biyolojik veya mikrobiyolojik özellik veya karakteristiklerdir". CQA, ürünün doğrudan performansını veya performansını belirleyen parametreleri tanımlar. ICH Q8 kontrol edilmesi gereken bu özellik ve karakteristiklerle ilgili limit değerleri vermektedir. CQA'lar genellikle Etken madde, yardımcı maddeler, ara ürünler ve bitmiş ürün ile ilişkilidir. Bitmiş ürünün CQA'ları, istenen kalite, güvenlik ve etkinliği veren özellikleri içermektedir.

Kritik Proses Parametreleri (Critial Process Parameters - CPPs), bir işlem aralığında değişkenlik gösterdiklerinde CQA'lara doğrudan ve belirgin etkisi olan proses girdileridir. Pek çok formülasyona giren maddeler ve gerçekleştirilen prosesle ilgili parametrelerin bazıları ürünün kalitesini belirgin şekilde etkileyebilir.

Hammadde parametre/formülasyon değişkenleri (Critical Material Attributes - CMAs), işlem değişkenleri (CPPs) ile son dozaj formlarının kalite özelliklerinin irtibatlandırılmasında çoklu değişkenli veri analizleri kullanılır. Ürün veya işlemde bir deneysel çalışmanın detaylı tasarımı; araştırma alanına, çalışmanın objektifliğine, mevcut çalışma materyaline ve veri toplamaya ilişkin mevcut yöntemlere bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir. Çalışmanın bir kez tasarlanması ve verilerin toplanmasından sonra, sonuçları analiz etmek için matematiksel bir model kullanılabilir (Aksu ve ark., 2013; Aksu ve Yegen, 2014; Roy, 2012).

Deney tasarımı (DoE), kritik işlem parametrelerinin belirlenmesi ve tasarım alanının oluşturulması evrelerini kapsar. Her deneyi gerçekleştirecek süreci veya sistemi optimize etmek ve deneylerden elde edilen sonuçlardan çıkarımlarda bulunulmaktadır. DoE kullanımının amacı, bir merkez etrafında simetrik bir deneyler dağılımı düzenlemektir. Deney tasarımı olarak da bilinen istatistiksel deneyler

tasarımı, en az sayıda analiz ile en fazla miktarda bilgi elde edebilmek için deneylerin nasıl gerçekleştirilip planlanacağına dair bir metodolojiyi kapsar. Tasarlanmış bir deney test verilerinin toplanması için kullanılan bir araç veya araçlar kümesidir. Deney tasarımının genel özellikleri planlanmış testler, veri analiz yaklaşımı, eş zamanlı faktör değişimi ve bilimsel yaklaşımdır (Lepore ve Spavins, 2008).

Geleneksel olarak özellikle romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılan karamuk bitkisinden izole edilen, antipiretik, antienflamatuvar ve analjezik etkileri kanıtlanmış "Berberin" fitoaktif bileşiğinin doğal kaynaklı fosfolipitler ile fitozomlarının hazırlanması, deneyler sonucunda elde edilecek fitozomların istenen özelliğe sahip olanını kalite ile tasarımla seçilecek ve değerlendirilecektir.

Hedefler

1. Etken maddenin termal davranışı (DSC ile) ve yapısının (FTIR ile) incelenerek verilen spesifikasyonda olup olmadığının incelenmesi,
2. HPLC analiz yönteminin otuşturulması, bu amaçla analitik yöntemin validasyonunun yapılması.
3. Formülasyon çalışmalarının yapılması, berberin:fosfolipit oranı değiştirilerek, farklı solvan tipleri kullanılarak ve reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi gibi işlem parametreleri değiştirilerek fitozomal taşıyıcı sistemlerin hazırlanması,
4. Formülasyon çalışmaları sonrasında elde edilen formülasyonların karakterizasyonunun incelenmesi için SEM analizi, çözünürlük, partisyon katsayısı, partikül boyutu ve zeta potansiyeli ile çözünme hızı deneylerini yaparak QbD ile verileri değerlendirerek sonuç formülasyona ulaşmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aseton	Carlo Erba
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma-Aldrich
Berberin HCI	Sigma
Diklorometan (DCM)	Sigma-Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma-Aldrich
Enjektör ucu filtre (0,45 µm, 0,22 µm)	Sartorius
L-A-fosfatidilkolin (eggyolk)	Sigma
L-A-fosfatidilkolin (soybean)	Fluka
Metanol (HPLC grade)	Sigma-Aldrich
N-Oktanol	Merck
Serolojik pipet	Sarstedt
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Araçlar

Cam malzemeler	İldam
C18 HPLC kolonu (100x4,6mmx3,5µm)	Agilent, Zorbax Eclipse Plus
Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)	Shimadzu
Diyaliz membran (MWCO:3,500Da)	Spectrum Laboratories
Filtrasyon düzeneği	Merck Millipore
Fourier Transform Infrared Spektrometre (FTIR)	Perkin Elmer UATR Two
Hassas terazi	Sartorius
Klinik dijital termometre	Prima long LCD Digital
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
Mikropipetler	Socorex
MODDE Pro	Sartorious
Paket programlar	GraphPad InStat3
pH-metre	Inolab
Plastik enjektör	Ayset
Su arıtma sistemi	Millipor Mili-Q Gradient A10
Çözünme hızı cihazı	Sotax
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	FEI Quanta 400F
Termostatlı yatay çalkalayıcı su banyosu	Memmert
Ultrasaf su ünitesi	Millipore

Ultrasantrifüj cihazı	Beckman Optima XL-100K
Ultrasantrifüj tüpü	Beckman
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30
UV Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800
Vakum pompası	Merck Millipore
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Agilent -1260 infinity
Zeta potansiyel ve patikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Zetasizer Nano ZS, Malvern Ins.

2.1.3. Deneylerde Kullanılan Ortam ve İçeriği

Yapılan deneylerde kullanılan ortam ve içeriği aşağıda gösterilmiştir.

pH 6,8 Fosfat Tamponu

Potasyum dihidrojen fosfat		6,8 g
Sodyum Hidroksit		0,64 g
Distile su	y.m	1.000 mL

pH metrede ile ölçüm yapılarak 0,1 N NaOH veya 0,1 N HCI ile pH ayarlaması yapılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Berberin Üzerine Yapılan Çalışmalar

2.2.1.1. Berberinin FTIR Spektrumunun Belirlenmesi

FTIR Spektrometresi olarak Perkin Elmer UATR Two kullanılmıştır. Yapısında bulunan elmas kristali sayesinde Potasyum Bromür kullanımına ihtiyaç kalmadan örneklerini FTIR spektrumlarına imkan vermektedir. Etken madde toz olarak cihazın elmas kristali olan özel bölmesine yerleştirilip basıldıktan sonra 400-4.000 cm^{-1}dalga aralığında FTIR spektrumları alınmıştır.

2.2.1.2. Berberinin DSC Spektrumunun Belirlenmesi

DSC kullanılarak berberinin analizi yapılmıştır. 2,5 mg etken madde (berberin) tartılarak alüminyum panlar içine konulmuştur ve preslenerek kapatıldıktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Çalışmada 1 atm basınçtaki azot gazı (50 mL/dak) altında 20-300°C sıcaklık aralığında, 10°C/dakika ısıtma hızında sıcaklık artırılarak termogramlar elde edilmiştir.

2.2.1.3. Berberinin UV Spektrumunun Belirlenmesi

Distile su ve pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde etken maddenin stok çözeltisi 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Stok çözeltiden hareketle uygun seyreltmeler yapılmış, etken maddenin spektrumu 200-400 nm aralığında ölçülerek maksimum absorbans gösterdiği dalga boyuları (λ_{max}) saptanmıştır.

2.2.1.4. Berberinin SEM Görüntüsünün Belirlenmesi

Berberinin yüzey morfolojisi ve karakteristiklerini incelemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Örnek alüminyum taşıyıcı üzerine çift taraflı adhesive band ile yapıştırılmıştır ve Au-Pd ile 3 nm boyutunda kaplanmıştır. Örneklerin dijital görüntülerini elde etmek için 10 kV lık hızlandırıcı voltaj kullanılmıştır.

2.2.1.5. Berberinin Çeşitli Analitik Yöntemler ile Miktar Tayinlerinin Yapılması ve Kalibrasyonu

2.2.1.5.1. Berberinin Ultraviole (UV) Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini ve Kalibrasyonu

Berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde stok çözeltisi 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Stok çözeltiden hareketle uygun seyreltmeler yapılmıştır. UV spektrofotometresinde Bölüm 2.2.1.3'de belirlenen maksimum absorbans gösterdiği dalga boylarında (λmax) bilinen konstrasyonlara karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir ve kalibrasyon doğrusu ile doğru denklemi elde edilmiştir. Deney üç kez tekrarlanmıştır ve elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

2.2.1.5.2. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizinde başlangıç için berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde 100 ppm konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltilerden hareket ile 1, 5, 10, 20, 25, 50 ppm değerlerindeki seyreltik çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden hareketle mobil faz oranları,

enjeksiyon hacmi, akış hızı, kolon sıcaklığı parametreleri üzerinden yöntemin optimizasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Analizler, pik şeklinin keskin ve sistem uygunluk parametrelerini sağlandığı ideal koşullar belirlendikten sonra gerçekleştirilmiştir. İdeal yöntem parametreleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Berberinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan parametreler.

Mobil faz	Asetonitril: 30 mM amonyum asetat tamponu (67:33)
Akış hızı	1mL/dakika
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 (100mm x 4,6mm x 3,5µm)
Dedektör	DAD 346 nm
Sıcaklık	30°C

2.2.1.6. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu

Analitik bir yöntemin validasyonu tasarlanan analitik yöntemin performans karakteristiğinin belirlendiği bir işlemdir. Kullanılan analitik yöntemin validasyonunda ICH Q2 (R1) kılavuzunda yer alan doğrusallık ve aralığı, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilir ve ara kesinlik), teşhis sınırları (LOD), tayin sınırları (LOQ) ve özgünlük parametreleri incelenmiştir.

2.2.1.6.1. Doğrusallık ve Aralığı

Berberin klorürün distile su ortamında on farklı derişimde (2-200 µg/mL), pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde ise on farklı derişimde (1-100 µg/mL) altı seri çözeltisi hazırlanmıştır ve "GraphPad InStat İstatistik Programı 3.1" aracılığıyla bilinen konsantrasyonlar x ekseninde, elde edilen alanlar y ekseninde grafiğe geçilerek standart doğruları çizilmiştir Standart doğrunun güven sınırı içerisinde yer alıp almadığı tespit edilmiştir.

2.2.1.6.2. Doğruluk ve Geri Elde

Doğruluk parametresi, berberinin stok çözeltisinden hareketle hazırlanan düşük (3 µg/mL), orta (20 µg/mL) ve yüksek (75 µg/mL) konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen alan değerleri yardımıyla pratik derişimler ve % geri elde değerleri, söz konusu değerlerin ortalaması, standart sapması (SS) ve % bağıl standart sapması (%BSS) belirlenmiştir.

2.2.1.6.3. Kesinlik

Aynı homojen numunenin belirlenen şartlar altında çok sayıdaki analizlerinden elde edilen ölçüm sonuçlarının yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlik normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, ara kesinliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin tespitidir. Kesinliği tespit etmek için etken maddenin miktar tayininde kullanılan yöntemin tekrarlanabilirliği kullanılmıştır.

- **Tekrarlanabilirlik**

Kısa süre aralıklarında, aynı koşullar ve analiz koşullarında yöntemin kesinliğini göstermektedir Berberinin miktar tayininde kullanılmak üzere yapılan kalibrasyonlarda tekrarlanabilirlik tayini amacıyla 3 µg/mL, 20 µg/mL ve 75 µg/mL derişilerdeki üç ayrı çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir çözelti arka arkaya 6 kez HPLC'de analiz edilmiştir. Elde edilen alan değerleri yardımıyla pratik derişimleri hesaplanmış ve derişim değerlerinin ortalama, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapması (%BSS) değerleri bulunmuştur.

- **Ara kesinlik**

Berberin stok çözeltisinden hareketle dört farklı derişimde numuneler hazırlanmıştır. Bu numuneler birbirini takip eden 3 farklı günde HPLC analizleri

yapılmıştır. Elde edilen alan değerleri kalibrasyon doğrusunda yerine konularak pratik konsantrasyon değerleri hesaplanmış, ortalama ve standart sapma (SS) değerleri elde edilmiş ve buradan % bağıl standart sapması (%BSS) değerleri bulunmuştur.

2.2.1.6.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Teşhis sınır (LOD) analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirdiği ancak nicel olarak ölçülemediği en küçük konsantrasyondur.

$$LOD = \frac{3{,}3\ x\ \sigma}{S}$$

σ: Doğrusallık ve aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık ölçümlerin standart sapması

S: Standart doğrunun eğimi

Tayin sınırı (LOQ) ise analizi yapılan numunenin uygun keskinlik ve doğrulukta tayin edilebilen, doğrusallık sınırlarında nicel olarak saptanabilen en düşük konsantrasyondur.

$$LOQ = \frac{10\ x\ \sigma}{S}$$

σ: Doğrusallık ve aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık ölçümlerin standart sapması

S: Standart doğrunun eğimi

2.2.1.6.5. Özgünlük

Özgünlük analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir. Berberin-fitozomun formülasyonlardaki olası diğer maddelerle HPLC analizinde girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir.

2.2.1.7. Berberinin Çözünürlüğünün Belirlenmesi

Oral olarak uygulanan dozaj formları ilacın absorpsiyon başlayabilmesi için önce GI sistem sıvılarında çözünmelidir. Yani yeterli derecede absorbe edilmelerine izin verecek kadar suda çözünürlük değerine sahip olmalıdır. Bir ilacın çözünürlüğü % 1'den düşükse pH 1-8 aralığında sıklıkla absorpsiyon ve biyoyararlanım problemlerine rastlanabilir. Berberin büyük oranda ince barsakta absorbe olmaktadır. Dolayısıyla çözünürlük çalışmaları, pH 6,8 fosfat tamponunda ve distile suda gerçekleştirilmiştir. Ortam sıcaklığı olarak oda sıcaklığında (25°C) ve vücut sıcaklığında (37°C) çalışılmıştır.

25 mL tampon çözeltisine aşırı miktar numune (800 mg) ilave edilerek karıştırılmaya bırakılmıştır. Farklı zaman aralıklarında numuneler alınarak sudaki çözünürlük için spektroskopide 340 nm de pH 6,8 fosfat tamponu için ise 345 nm de absorbansları ölçülmüştür Kalibrasyon denklemleri kullanılarak konsantrasyonları hesaplanmıştır. Üst üste değişmeyen konsantrasyon çözünürlük değeri olarak alınmıştır.

2.3. Formülasyon Çalışmaları

2.3.1. Berberin-Fitozomlarının Hazırlanmasına Yönelik Önformülasyon Çalışmaları

Berberin-fitozomlarının hazırlanması için ince film oluşturma (Bangham), ters faz buharlaştırma ve etanol enjeksiyonu yöntemi olmak üzere üç farklı yöntem denenmiştir. Bu üç yöntemde kritik olarak değerlendirilen üç farklı parametre (berberin:fosfolipit oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi) çeşitlendirilerek farklı formülasyonların oluşturulması düşünülmüştür.

Formülasyonlarda fosfolipit kaynağı olarak öncelikle soya kaynaklı fosfolipit kullanılmıştır. Fakat bu fosfolipit etanolde tam olarak çözünmemiştir. Bunun üzerine heterojen görünümünden şüphe edilerek 0,125 mm gözenek çaplı elekten geçirilmiş fakat yine tam bir çözünme sağlanamamıştır. Etanol dışında metanol, diklorometan gibi daha apolar çözücülerde de tam olarak çözünme sağlanamaması üzerine fosfolipit kaynağı değiştirilmiş, yumurta sarısı kaynaklı fosfolipitler kullanılmış ve sorun çözülmüştür.

Deneme formülasyonlarında ilk olarak veziküler yapıların oluşup oluşmadığı mikroskopta incelenmiş ve farklı yöntemlerle denenen formüllerin hepsinde veziküler yapıda berberin-fosfolipit komplekslerinin oluştuğu gözlenmiştir. Daha sonraki bir formülasyon şeması oluşturulup elde edilen formülasyonların partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği gibi kritik parametrelerine göre optimizasyon sağlanması düşünülmüştür.

Yöntemi optimize ederken formülasyonun üretimi esnasında üzerinde çalışılması gereken kritik parametreler şu şekilde belirlenmiştir;

*Berberin fosfolipit oranı

*Reaksiyon sıcaklığı

*Reaksiyon süresi

Tez çalışmasında bu üç parametre detaylı olarak değerlendirilmiş, ince film (Bangham), ters faz buharlaştırma ve etanol enjeksiyonu olmak üzere üç farklı yöntem kullanılmasına ve formülasyonların hazırlanmasında kritik olarak değerlendirilen üç farklı parametrenin üç farklı koşulda incelenmesine karar verilmiştir.

Berberin:fosfolipit oranı (a/a) :	1:3	1:5	1:7
Reaksiyon sıcaklığı (°C) :	40	50	60
Reaksiyon süresi (saat) :	1	2	3

Hazırlanan formülasyonlar öncelikle mikroskopta incelenerek kompleks oluşup oluşmadığı değerlendirilmiştir.

2.3.1.1. İnce Film Oluşturma Yöntemi (Bangham) ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesi

100 mg fosfolipit 100 mL'lik şilifli balona tartılmış ve manyetik karıştırıcı yardımı ile 10 mL mutlak etanolde çözülmüştür. Daha sonra rotavaporda belli sıcaklıkta (40, 50, 60 °C) ve 50 rpm dönü hızında ince film oluşumu sağlanmıştır. Elde edilen ince film oda sıcaklığında 12 saat kurutulduktan sonra berberin çözeltisi (20 mg/10 mL) ile problu sonikatör yardımıyla 5 dakika 60 w gücünde 0,7 saniye:1 saniye aralıkla sonike edilmiştir.

Ancak bu yöntemle fitozomların tam olarak elde edilememesi, partikül büyüklükleri ve enkapsülasyon etkinliği test edildiğinde sapmaların fazla olması ve yöntemin zor ve veriminin de düşük olması nedeniyle bu yöntem elimine edilmiştir.

2.3.1.2. Etanol Enjeksiyonu Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesi

20 mg berberin beherde 10 mL suda, yine başka bir beherde 100 mg fosfolipit 10 mL mutlak etanolde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülmüştür. Daha sonra fosfolipit çözeltisi bir enjektöre alınmış ve belli sıcaklıkta (40, 50 ve 60 °C) karışmakta olan berberin çözeltisine 2 mL/dak. hızda enjekte edilmiştir. Enjeksiyon süresine ilaveten elde edilen süspansiyon belli süre daha 250 rpm dönü hızında karıştırılarak reaksiyonun tamamlanması beklenmiştir. Daha sonra rotavaporda etanol uzaklaştırılmış ve süspande halde berberin-fitozomları elde edilmiştir.

Formülasyon hazırlarken özellikle reaksiyon sıcaklığının fitozom oluşumunda çok önemli bir parametre olduğu gözlenmiştir. Reaksiyon sıcaklığı değiştirilen 1:5 oranında berberin:fosfolipit içeren formülasyonlar (Çizelge 2.2) üzerinde polidispersite indeksi, enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü analizleri yapılmıştır.

Hazırlanan formülasyonlara ait zeta potansiyel, ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi sonuçları da süspansiyon formunda iken değerlendirilmiştir. Daha sonra berberin-fitozom örneklerinin dondurma işlemi -18°C'de derin dondurucuda yapılmış ve Christ Gamma 2-16 LSC cihazında 48 saat liyofilize edilmiştir. Elde edilen örnekleri taşıyan kapların ağızları sıkıca kapatılarak saklanmıştır.

2.3.1.3. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesi

Bu yöntemde 100 mg fosfolipit 10 mL etanolde çözülür ve üzerine 20 mg berberin içeren 2 mg/mL konsantrasyonda berberinin sudaki çözeltisi ilave edilir. Daha sonra belli sıcaklık (40, 50 ve 60°C) ve sürede 400 rpm dönü hızında

karıştırılarak s/y tipi emülsiyon oluşturulur. Daha sonra etanol uzaklaştırılarak ve fitozomal veziküllerin bulunduğu sulu dispersiyon elde edilir.

Bu yöntemde de Çizelge 2.2'de verilen formülasyonlar hazırlanarak zeta potansiyel, polidispersite indeksi, enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü analizleri yapılarak değerlendirilmiştir.

Hazırlanan formülasyonlara ait zeta potansiyel, ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi sonuçları da süspansiyon formunda iken değerlendirilmiştir. Daha sonra berberin-fitozom örneklerinin dondurma işlemi -18°C'de derin dondurucuda yapılmış ve Christ Gamma 2-16 LSC cihazında 48 saat liyofilize edilmiştir. Elde edilen örnekleri taşıyan kapların ağızları sıkıca kapatılarak saklanmıştır.

Çizelge 2.2. Etanol enjeksiyonu ve ters faz buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan deneme formülasyonları.

Formülasyon Kodu	Berberin:fosfolipit Oranı (a/a)	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Reaksiyon Süresi (saat)
F1	1:5	40	1
F2	1:5	50	1
F3	1:5	60	1

2.3.1.4. Etken Madde Yükleme Etkinliği Tayini

Enkapsülasyon etkinliği (EE) hesaplamada indirek yöntem kullanılmıştır. Önce fitozomlar uzaklaştırılmış, ardından serbest haldeki berberin miktarı tayin edilerek hesaplama yapılmıştır.

Berberin-fosfolipit süspansiyonu 20.000 rpm dönü hızında, 8°C' de, 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatan alınmıştır. Daha sonra süpernatan iki kere daha aynı işleme tabi tutularak süpernatandaki serbest berberin HPLC analiz yöntemi ile tayin

edilmiştir. Analiz edilen miktar başlangıçta formülasyona ilave edilen berberin miktarından (20 mg) çıkarılarak toplam berberin miktarına bölünmüş ve sonuç yüzde ifadeye dönüştürülmüştür.

$$\% \text{ Y.E.} = (m_{toplam} - m_{serbest}) / m_{toplam} x100$$

2.3.1.5. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini

Formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı hakkında bilgi vermesi için PALS (Phase Analysis Light Scattering) tekniği ile ölçüm yapan Zetasizer Nanoseries cihazından yararlanılmıştır. 25°C sıcaklıkta ve üç paralel ölçüm yapılarak çalışılmıştır.

2.3.1.6. Zeta Potansiyel Tayini

Komplekslerin dispersiyon halindeki stabilitelerini yorumlamak amacıyla Zetasizer Nanoseries cihazını kullanılarak zeta potansiyelleri liyofilizasyon işleminden önce tayin edilmiştir. Partiküllerin yüzey yüklerini ölçebilmek için partiküller her ölçümde aynı oranda seyreltilmişlerdir.

2.3.2. Formülasyon Çalışmaları

Formülasyon çalışmalarında ters faz buharlaştırma ve etanol enjeksiyonu olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır ve formülasyonların hazırlanmasında kritik olarak değerlendirilen üç farklı parametre incelenmiştir. İnce film oluşturma yöntemi ile verimli sonuçlar alınamadığı için bu yöntem kullanılmamıştır.

Berberin:fosfolipit oranı (a/a) :	1:3	1:5	1:7
Reaksiyon sıcaklığı (°C) :	40	50	60
Reaksiyon süresi (saat) :	1	2	3

Formülasyonlar Bölüm 2.2.4.2 ve 2.2.4.3'de verildiği şekilde etanol enjeksiyonu ve ters faz buharlaştırma yöntemlerine göre hazırlandıktan sonra berberin-fitozom süspansiyonu su ile yıkanıp ve 20.000 rpm dönü hızında, 8°C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Söz konusu yıkama işlemi iki defa tekrar edilerek berberin-fitozom süspansiyonunda serbest halde berberin olup olmadığı HPLC analiz yöntemi ile tayin edilmiştir (İndirekt yöntemle enkapsülasyon etkinliği tayini).

Etanol enjeksiyonu ve ters faz buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlara ait zeta potansiyel, ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi sonuçları da süspansiyon formunda iken değerlendirilmiştir. Daha sonra berberin-fitozom örneklerinin dondurma işlemi -18°C'de derin dondurucuda yapılmış ve Christ Gamma 2-16 LSC cihazında 48 saat liyofilize edilmiştir. Elde edilen örnekleri taşıyan kapların ağızları sıkıca kapatılarak saklanmıştır.

2.4. QbD Yaklaşımla İdeal Formülasyonun Belirlenmesi

Bir formülasyon veya işlemin optimizasyonu, olası en iyi bileşim veya çalışma koşullarının bulunmasıdır (Wilde, 1962). Bir farmasötik formülasyon, birkaç formülasyon faktörü ve işlem değişkeninin bir araya getirilmesi ile oluşturulur. Etkinlik, yararlı olma, kararlılığa ilişkin bir takım parametrelerin yanı sıra, aynı zamanda ilacın emniyeti de optimize edilmelidir. Formülasyon tasarımında; kantitatif yaklaşımdaki güçlüklerden biri, gerekçe (neden) faktörleri ile yukarıda sayılan ilaca olan tepkiler arasındaki ilişkilerin yakınlaştırmadır. Diğer bir güçlük ise, özelliklerden birinin daima diğer özelliklere göre arzu edilebilir olmamasıdır. Bu durum, çok amaçlı optimizasyon problemi olarak tanımlanır. Çalışma tekniklerinin tasarlanması, işlemin optimize edilmesi için etkili bir imkan sunmaktadır. Fakat çalışmalarımızı yalnızca işlem faktörleri ile sınırlandıramayacağımız için tasarım

aracılığıyla formülasyonun ve faktöriyel tasarım/respons yüzey yöntemleri aracılığıyla da işlemin optimize edilmesi gerekmektedir (Hirji, 1999; Podczeck, 2008). Tepki yüzeyi yöntemi (RSM), kabul edilebilir ilaç formülasyonlarının seçilmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. RSM, a) istatistiksel faktöriyel deneysel tasarımlar, b) rastgele faktörler ve tepki değişkenleri arasında modelleme, c) en iyi formülasyonu araştırmak üzere çok-amaçlı optimizasyonu içermektedir (Takayama ve ark., 1999, 2003).

MODDE (MODeling ve DEsign) istatistiksel deneysel tasarımların oluşturulması ve değerlendirilmesi için kullanılan bir programdır. Screening (Tarama), deney tasarımının ilk aşamasıdır; burada hedef, yalnızca önemli faktörleri tanımlamaktır. Önemli faktör, değiştiğinde yanıtta önemli değişiklikler (etkiler) yaratan bir faktördür. Tarama aşamasında basit modeller (doğrusal veya etkileşimli doğrusal) ve mümkün olan en az sayıda deneysel çalışmada en büyük etkilere sahip faktörlerin tanımlanmasına izin veren deneysel tasarımlar kullanılır. MODDE, tarama aşaması için faktör sayısına bağlı olarak seçilebilen Full factorial, Fractional factorial, General subset designs, L-designs, Plackett Burman, Rechtschaffner, Onion, D-Optimal designs, Reduced combinatorial designs gibi modelleri desteklemektedir. Taramadan sonra, etkenlerin nasıl tepki verdiğini daha ayrıntılı olarak anlamak, tahmin yapmak, optimizasyon veya bir çalışma alanı bulmak üzere genellikle kuadratik polinom (model) ile deney tasarımı incelenir. Program dahilinde, Three-level full factorial, central composite (CCC, CCO ve CCF), Box Behnken, Rechtschaffner, Doehlert, Onion, ve D-Optimal tasarımları RSM incelemeleri için kullanılır (MODDE® Design of Experiments Solution Design of Experiments DOE 2017).

Başarılı modeller, mekanizmaların anlaşılmasına olanak sağlar ve toplanan verileri yoğunlaştırmak suretiyle çalışma sonuçlarının raporlanmasını basitleştirerek gelecek sonuçlara ilişkin yararlı öngörüler yapılmasını sağlar. Modeller için kullanılan programlar ANOVA (ANalysis Of VAriance) istatistiklerini içerir. İncelenmesi gereken korelasyon değeri arttıkça model, eğitim verilerinde o kadar fazla değişkeni yakalamış demektir. Optimizasyon, ulaşmak istenen özellikleri

belirlemekte, modelin hangi bileşen ve işlem koşullarının bunlara yaklaştığını göstermektedir (Wilde, 1962).

2.4.1. İdeal Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar

QbD yaklaşımla elde edilen T25 kodlu formülasyon ideal formülasyon olarak seçilmiştir. Bu formülasyon üzerinde çözünme hızı deneyi gerçekleştirilmiştir. Stabilite çalışmaları için 5°C ± 3°C için buzdolabı ve 25°C ± 2°C / %60±5 Bağıl Nem (BN) ortamı kullanılmıştır. Tez çalışmasının başında sadece 25°C ± 2°C / %60±5 BN ortamında çalışma yapılması planlanmıştır. Ancak 25°C ± 2°C / %60±5 BN ortamında ilk birkaç hafta içersinde eriyik haline geçmesi nedeniyle 5°C ± 3°C'deki buzdolabı koşullarının da değerlendirilmesine karar verilmiştir.Hazırlanan tüm berberin-fitozomlarının oldukça yapışkan özellikte olduğu ve sıcaklık ve nem koşullarından kolayca etkilenerek eriyik haline geçme eğiliminde olduğu görülmüştür.

Bu durumunu engellemek için en son aşamada berberin-fitozomu, silika ile karıştırılarak daha akıcı ve ortam şartlarına daha dayanıklı hale getirilmesi düşünülmüştür. Silika organik bir maddedir. Tozların akıcılığının kolaylaşmasını sağlayan ve emniyetli (LD50 oral rat, 5 g/kg)(Güvenlik Bilgi Formu - Silika jel 60 (35-70 µm) Flash-Kromatografi için 2021) olarak gösterilen bir maddedir. Silika iyi akış özelliği ve göreceli olarak büyük spesifik yüzey alana sahiptir bu nedenle de serbestçe akan katı dispersiyonlar oluşturabilir (Planinšek ve ark., 2011). Bu nedenle % 20 oranında silika formülasyona ilave edilerek homojen olarak karıştırılmıştır ve Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) görüntüleri elde edilmiştir.

2.4.1.1. FTIR Spektrumunun Belirlenmesi

Bölüm 2.2.1.1'de anlatılan yöntem kullanılarak berberin dışında fosfolipitin, fiziksel karışımın (1:7) ve berberin-fitozonunun 400-4.000 cm^{-1}dalga aralığında FTIR spektrumları alınmıştır.

2.4.1.2. DSC Spektrumunun Belirlenmesi

Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı şekilde berberin dışında fosfolipitin, Berberin:fosfolipit (1:7) fiziksel karışımının ve hazırlanan berberin-fitozomunun termal analizleri yapılarak termogramları çekilmiştir.

2.4.1.3. SEM Görüntüsünün Belirlenmesi

Hazırlanan berberin-fitozomunun, berberinin yüzey morfolojisi ve karakteristiklerini incelemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Örnekler alüminyum taşıyıcı üzerine çift taraflı adhesive band ile yapıştırılmıştır ve Au-Pd ile 3 nm boyutunda kaplanmıştır. Örneklerin dijital görüntülerini elde etmek için 10 kV lık hızlandırıcı voltaj kullanılmıştır. Stabilite çalışmalarına maruz bırakılan örneklerin de SEM analizleri yapılmıştır.

2.4.1.4. Partisyon Katsayısı Tayini

Partisyon katsayısı etken maddenin sulu ortamdan GI kanal membranlarına geçişi için önemlidir. Membranların lipoidal yapısından dolayı ilaç transfer hızı direkt olarak ilacın lipofilik yapısına bağlıdır. Bu nedenle formülasyondan önce ilacın lipofilik / hidrofilik özelliklerinin ne olduğunun bilinmesi gerekir. Bu da partisyon katsayısının tayiniyle mümkündür. Bu araştırmada klasik partisyon katsayısı tayini yöntemi kullanılmıştır. 10 mg berberin 100 mL suda çözülmüştür.

Daha sonra bu stok çözeltiden 10'ar mL alınarak (n=3) üzerine 10'ar mL n-oktanol ilave edilmiş ve 50 rpm de 24 saat 37°C de dairesel çalkalayıcıda çalkalamaya tabi tutulmuştur. Numunelerin sudaki absorbansı çalkalama işleminden önce ve sonra spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda okunarak aşağıdaki formül yardımıyla partisyon katsayısı tayin edilmiştir.

Partisyon katsayısı ($P_{y/s}$)= (C_{ilk}-C_{son})/C_{son}

Ancak optimize edilen formül tayin edildikten sonra partisyon katsayısı tayini tekrar edilmiştir. Fiziksel karışım ve hazırlanan fitozomun partisyon katsayısının tayininde Yue ve ark. (2010) tarafından verilen yönteme göre yapılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir (Yue ve ark., 2010). Bu yöntemde de etken maddenin, fiziksel karışımın ve seçilen fitozomlar n-oktanol/su partisyon katsayısı tayin edilmiştir. Bu yöntemde, 100 mg etken madde, fiziksel karışım [fitozom oluşumunda kullanılan oranlarda (berberin:fosfolipit; 1:7) hazırlanmıştır] ve berberin–fitozomu 10 mL oktanol içersine konularak 25 ^{o}C 'de 24 saat karıştırmaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda çözünmeyen kısım 10 dakika 3.000 rpm de santrifüj edimiştir. Her bir çözeltiye 10'ar ml su ilave edilerek 24 saat boyunca tekrar karıştırılmaya bırakılmıştır. Çözeltiler 10 dak 3.000 rpm hızda santrifüj edilerek su ve n-oktanol fazı ayrılmıştır. Her deney üç kere tekrarlanmıştır. Su fazı ve n-oktanol fazları filtre edilerek (0,45 μm) ve mobil fazla seyreltilerek HPLC'de analizi yapılmıştır.

Aşağıda verilen denklem yardımıyla sudaki partisyon katsayısı ($P_{y/s}$) hesaplanmıştır. Cy oktanol içinde bulunan konsantrasyon, Cs ise su fazında bulunan konsantrasyondur.

$$Py/s = \frac{Cy}{Cs}$$

2.4.1.5. İdeal Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliği

Çalışmalara QbD yaklaşlaşımla ideal formülasyon olarak belirlenen T25 kodlu formülasyonun tekrar üretilmesi ile devam edilmiştir. Sekiz kere üretim yapılarak zeta potansiyel, ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve yükleme etkinliği değerlendirilmiştir.

2.4.1.6. Salım Çalışması

Formülasyondan etken madde salım çalışması öncelikle etken madde yükleme etkinliği en yüksek bulunan T25 kodlu formülasyonla yapılmıştır. 25 mg etken madde içerecek kadar fitozom tartılarak 2 mL çözünme ortamı ile 1 dakika ultrasonik banyoda disperse edilerek diyaliz membrana (Sigma-Aldrich, 12.000 Da MWCO) yerleştirilmiştir. Membranlar kapaklı cam kaplarda bulunan 250 mL pH 6,8 fosfat tamponu konulmuş, sıcaklığı 37±0,5ºC olan çözünme hızı cihazında, 100 rpm karıştırma hızında *in vitro* etken madde salımı gerçekleştirilmiştir. Ortamlardan belli zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 ve 360 dakika) 1mL numune çekilmiş, eşit hacimde ve aynı sıcaklıkta taze salım ortamı kaplara ilave edilmiştir. Alınan numuneler HPLC'de tayin edilerek berberin miktarları belirlenmiştir. Deneyler üçer paralel yapılmıştır. Standart hataları bulunarak grafikte gösterilmiştir.

Karşılaştırma yapmak ve fikir edinmek için berberinin gıda takviyesi olarak yer alan piyasa preparatta yer alan etken madde miktarını tayin etmek için 10 tablet toz edilmiştir. İçinden 1 tabletlik kütle tartılarak alınmıştır. 250 mL pH 6,8 tamponunda çözülmüştür. UV spektroskopik yöntem ile etken madde miktarı tayin edilmiştir. Burada bulunan miktardan hareketle çözünme hızı tayini için fitozomdan alınacak miktara karar verilmiştir.

Bu preparat ile de çözünme hızı tayini yapılmıştır. Fakat burada berberin preparatının Çin Farmakopesinde (2010 edition) yer alan çözünme hızı yöntemi kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2014). Burada palet yöntemi verilmiştir. Ortam hacmi 900 mL pH 6,8 fosfat tamponundan oluşmaktadır. Karıştırma hızı 100 rpm dir. 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 ve 180'inci dakikalarda 5 mL numune çekilmiştir. Eşit hacimde ve aynı sıcaklıkta taze salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan numuneler HPLC'de tayin edilerek berberin miktarları belirlenmiştir. Deneyler üçer paralel yapılmıştır. Standart hataları bulunarak grafikte gösterilmiştir.

2.4.1.7. Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmalarında ideal formülasyon olarak QbD tasarımla seçilen T25 kodlu formülasyon öncelikle 25°C ± 2°C / %60±5 bN ortamı için iklim dolabında bekletilmiştir ancak formülasyon bu koşulda ilk haftalarda bir erime olması nedeniyle, 5°C ± 3°C için buzdolabı koşulunda da stabilitesinin değerlendirilmesine karar verilmiştir. Her iki stabilite koşulunda 3 ay bekletilmiştir. Üçüncü ay sonunda Çizelge 2.3'de verildiği şekilde stabilite değerlendirilmesi yapılmıştır.

Çizelge 2.3. Stabilite çalışmaları protokolü.

SÜRELER / TESTLER	Birinci Ay	İkinci Ay	Üçüncü Ay
Partikül yüzey analizleri (SEM)			**X**
Fitozomun incelenmesi (DSC)			**X**
Etken madde miktar tayini			**X**
Etken madde salım çalışmaları			**X**

Ayrıca ideal formülasyonun (T25) stabilite çalışmalarında *in vitro* etken madde salım tayini için elde edilen çözünme hızı profilleri (test), sonuç formülasyonun çözünme hızı profiliyle (referans) karşılaştırılmıştır. Bu amaçla fark faktörü (f_1) ve benzerlik faktörü (f_2) kullanılmıştır. Çözünme profillerinin benzer olarak kabul

edilmesi için f_1 değerlerinin 0–15 arasında ve f_2 değerlerinin 50–100 arasında olması gerekmektedir (Costa ve Sousa Lobo, 2001).

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^{n} |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^{n} R_t} \right\} X100$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left(1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (R_t - T_t)^2 \right)^{-0.5} X100 \right\}$$

f_1 : fark faktörü

f_2 : benzerlik faktörü

R_t : referans formülün t anında çözünme %'si

T_t : test formülün t anında çözünme %'si

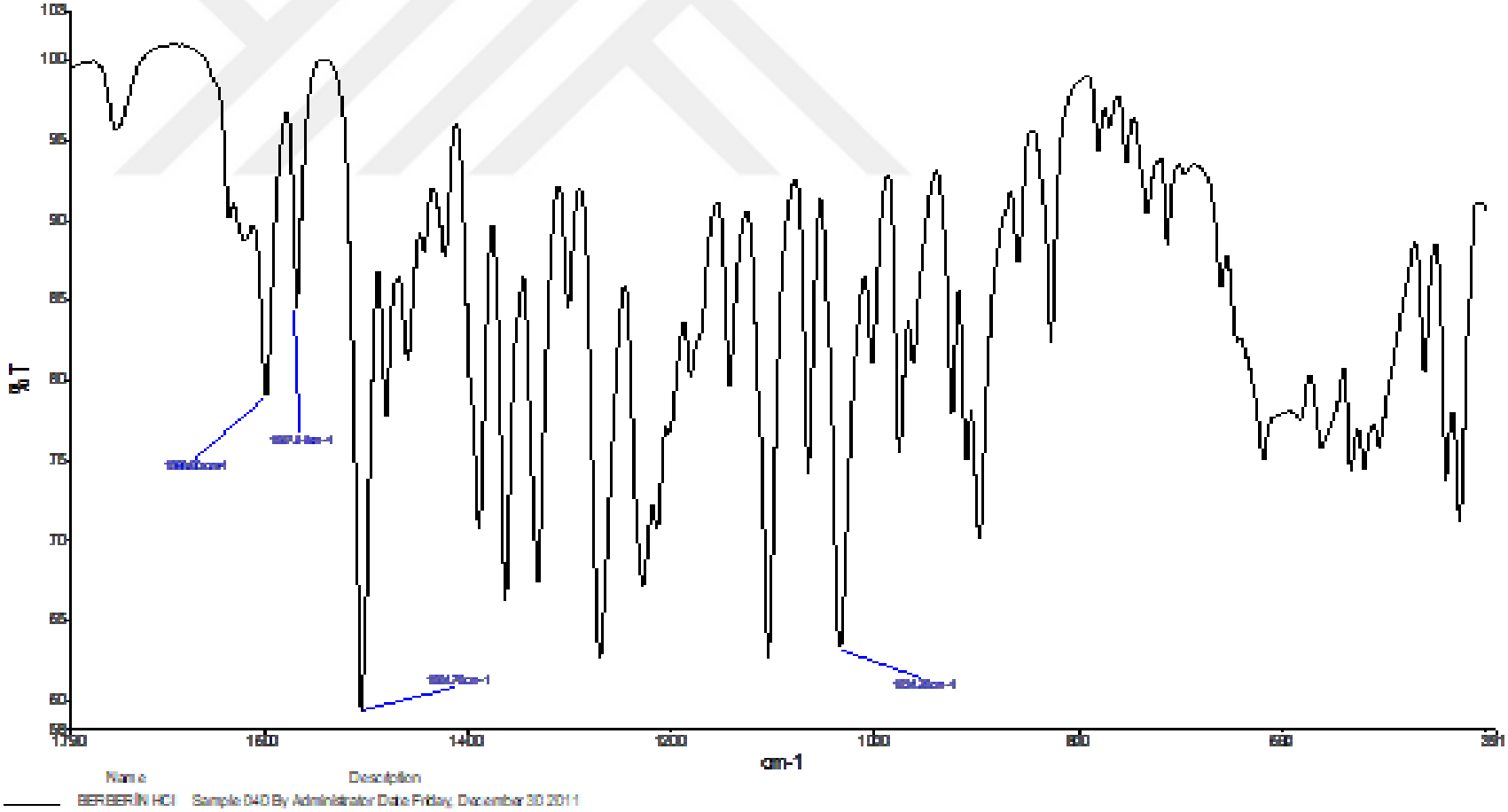
n : çözünme sırasında numune alma zamanlarının sayısı

3. BULGULAR

3.1. Berberin Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. Berberinin FTIR Spektrumuna Ait Bulgular

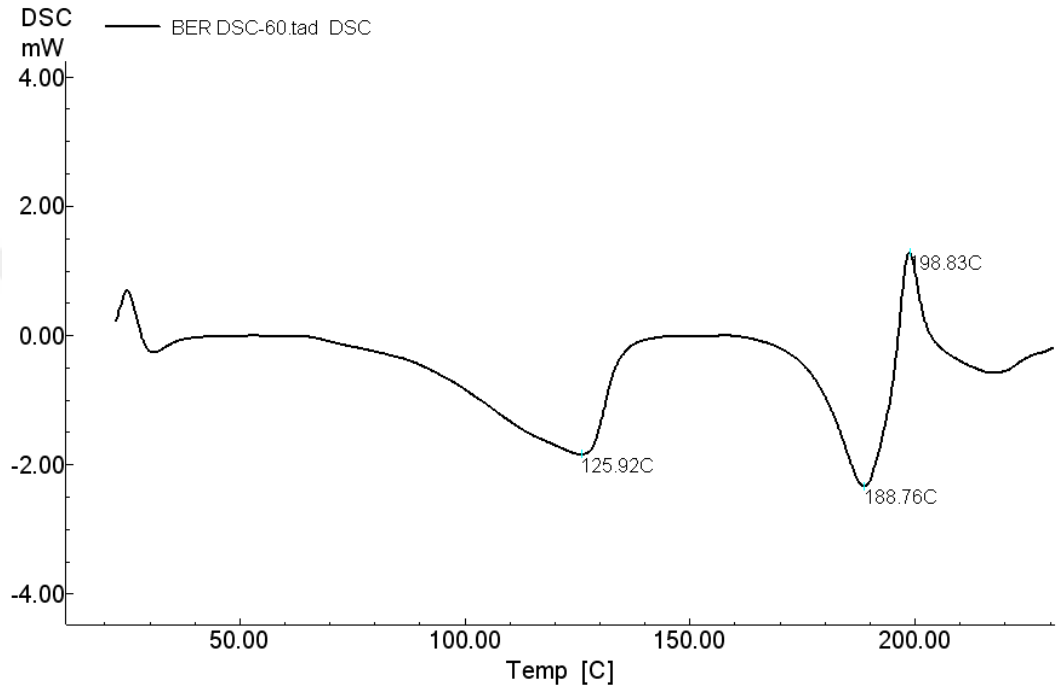
Berberinin çalışmamızdan elde edilen FTIR spektrumu Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Berberinin elde edilen FTIR spektrumu.

3.1.2. Berberinin DSC Spektrumuna Ait Bulgular

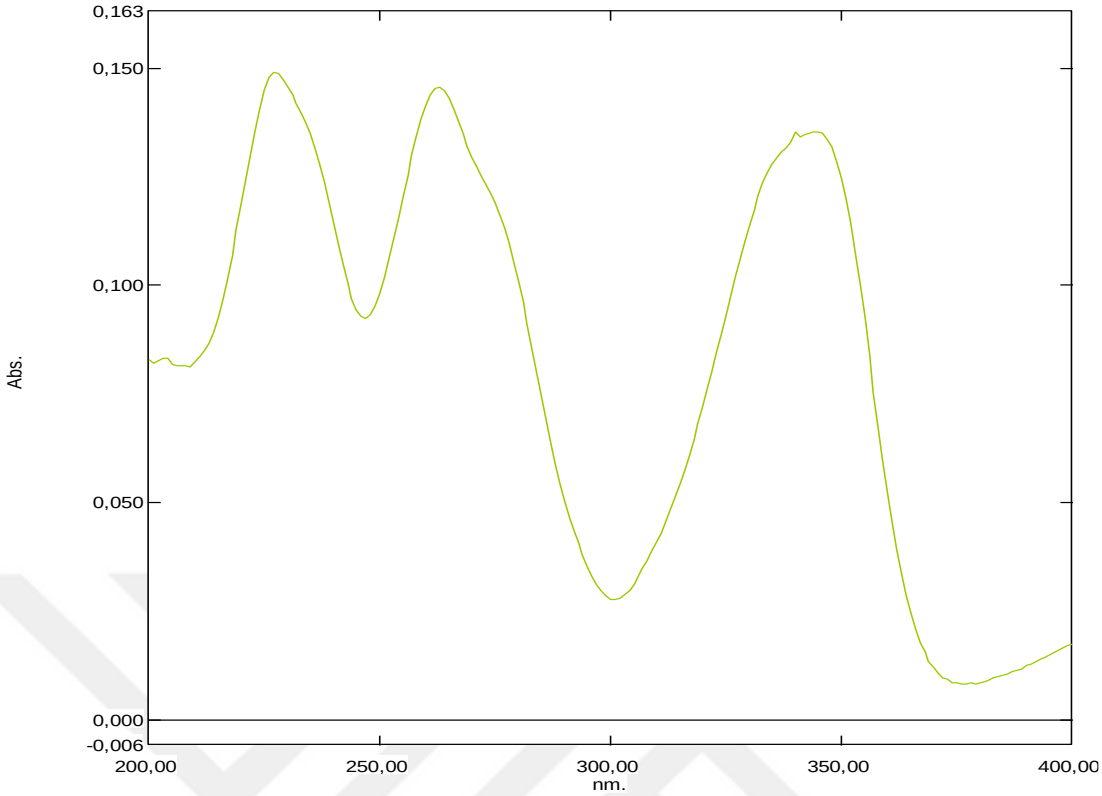
Berberinin DSC ile analizinden elde edilen termogram Şekil 3.2'de verilmiştir.



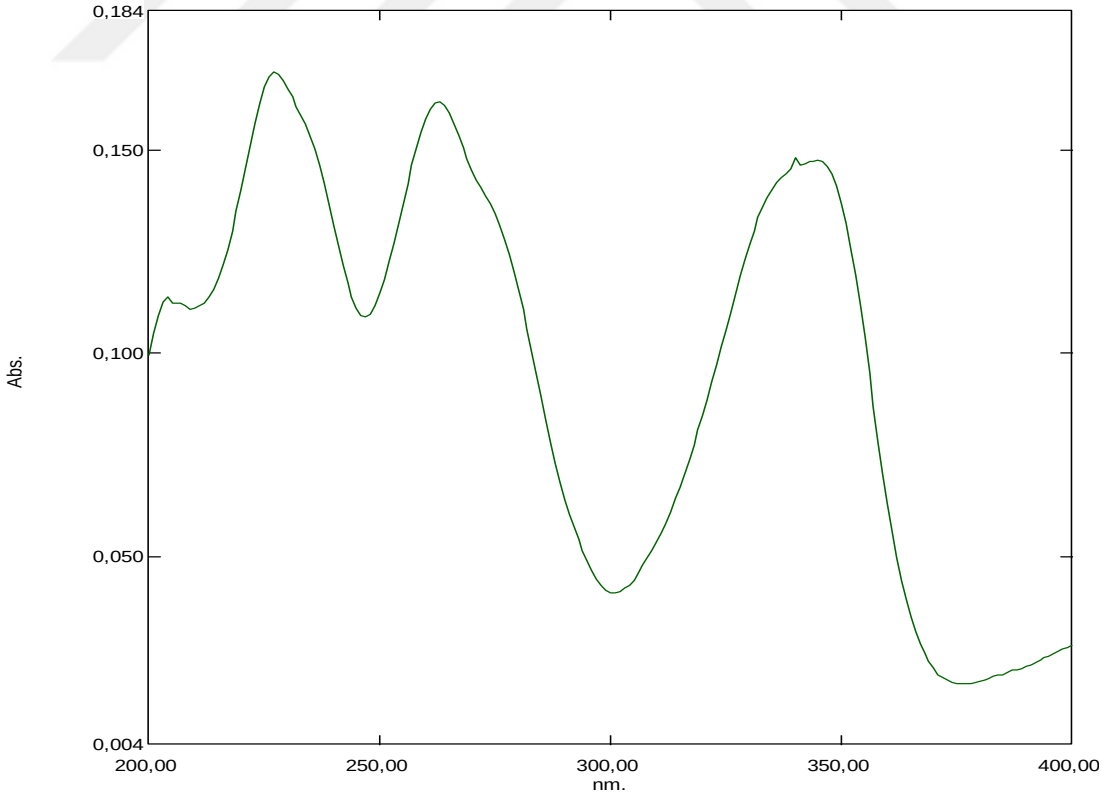
Şekil 3.2. Berberinin DSC termogramı.

3.1.3. Berberinin UV Spektrumuna Ait Bulgular

UV Spektrofotometresi ile yapılan çalışmada berberinin; distile su içindeki λ_{max} değerleri 340 nm ve pH 6,8 fosfat tamponu içindeki λ_{max} değerleri 345 nm olarak belirlenmiştir. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



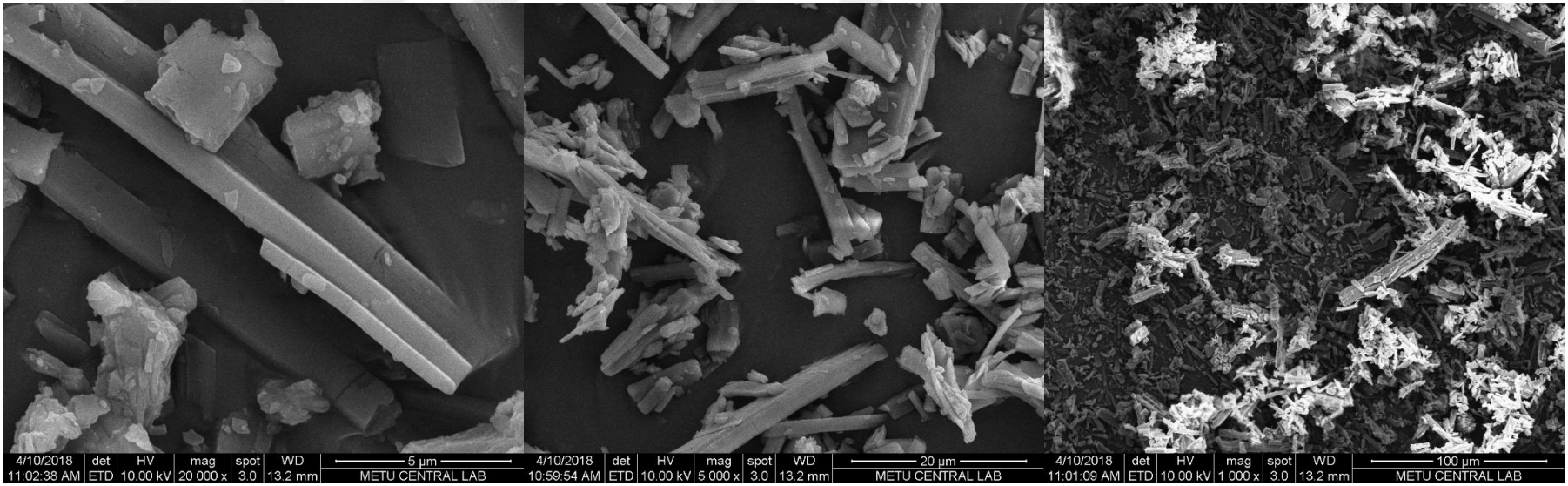
Şekil 3.3. Berberinin distile su içindeki UV spektrumu.



Şekil 3.4. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu içindeki UV spektrumu.

3.1.4. Berberinin SEM Görüntüsünün Ait Bulgular

Berberinin elde edilen üç farklı ölçekte SEM görüntüleri Şekil 3.5'de gösterilmiştr.

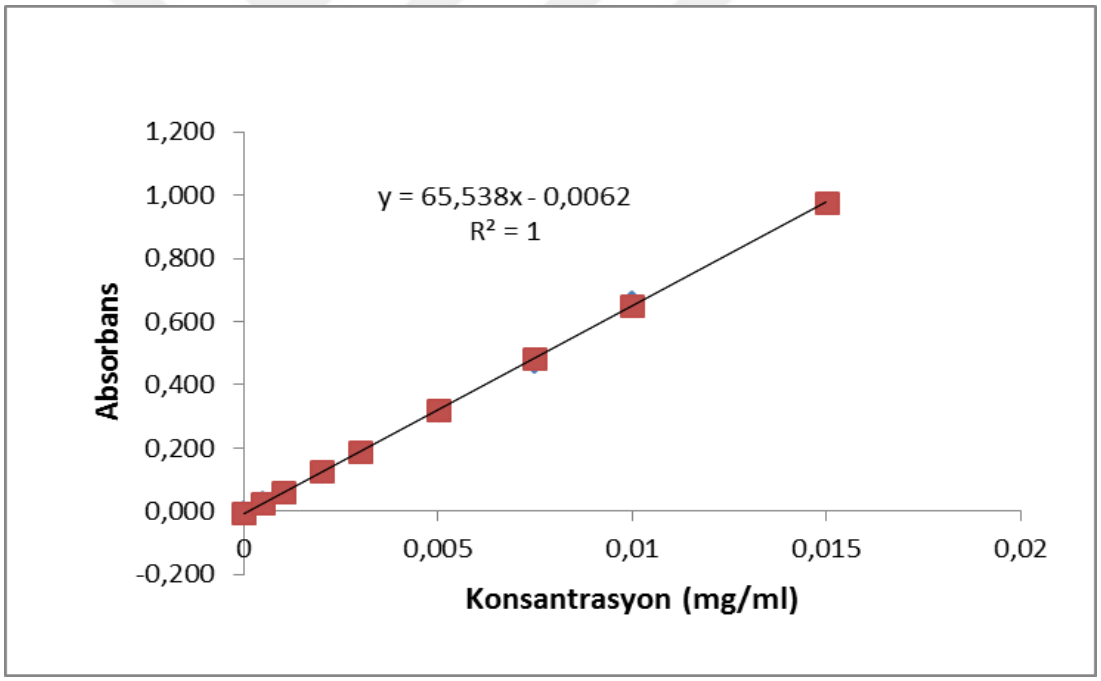


Şekil 3.5. Berberinin üç farklı ölçekteki SEM görüntüleri.

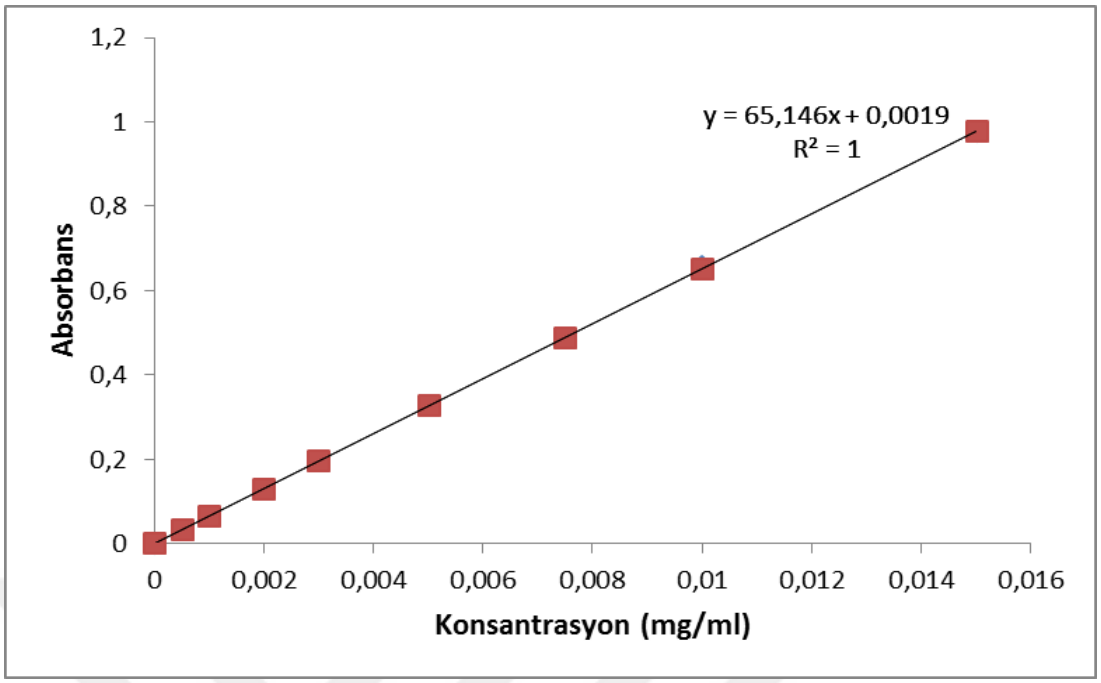
3.1.4. Berberinin Çeşitli Analitik Yöntemler ile Miktar Tayinlerinin Yapılması ve Kalibrasyonu

3.1.4.1. Berberinin Ultraviole (UV) Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini ve Kalibrasyonu Ait Bulgular

Berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponundaki ölçümleri Bölüm 2.2.1.5.1'de açıklandığı şekilde yapılmış ve kalibrasyon grafikleri ve denklenmeleri tespit edilmiştir. Grafikler sırasıyla distile su Şekil 3.6'da, pH 6,8 fosfat tamponu için Şekil 3.7'de; söz konusu grafiklere ait veriler Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.6. Berberinin distile sudaki kalibrasyon grafiği (n=3).



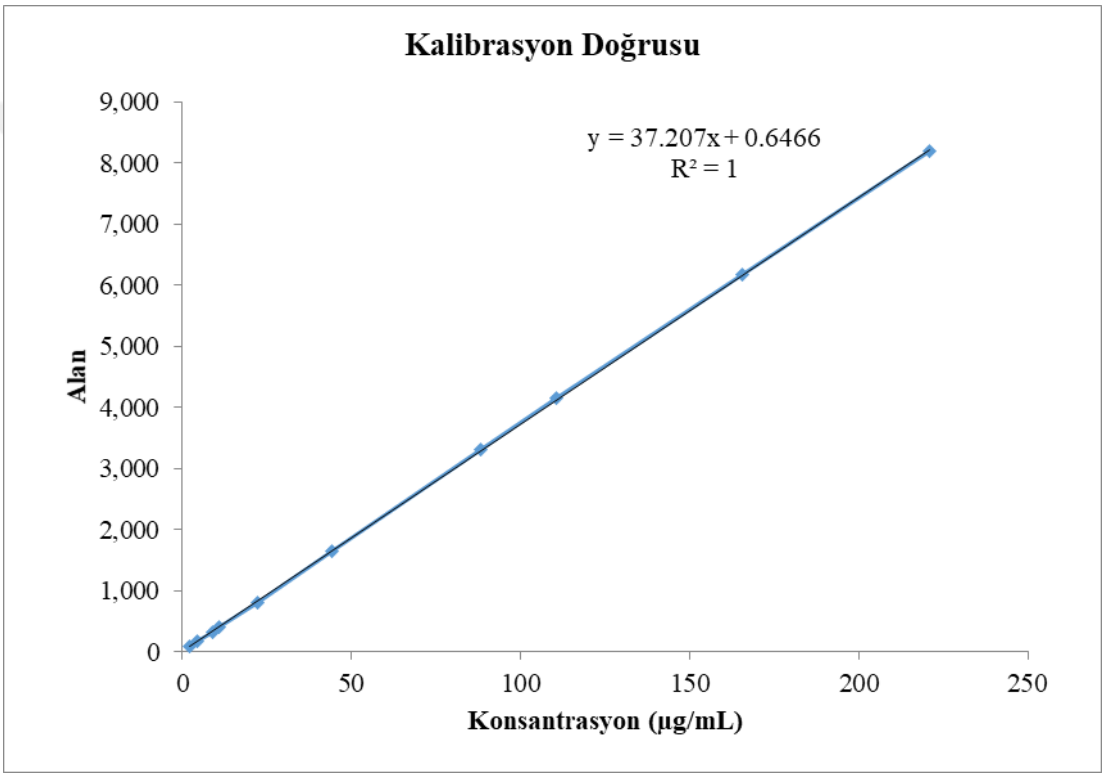
Şekil 3.7. Berberinin pH 6,8 fosfat tampondaki kalibrasyon grafiği (n=3).

Çizelge 3.1. Berberinin distile sudaki ve pH 6,8 fosfat tamponu içindeki kalibrasyon grafiklerine ait veriler.

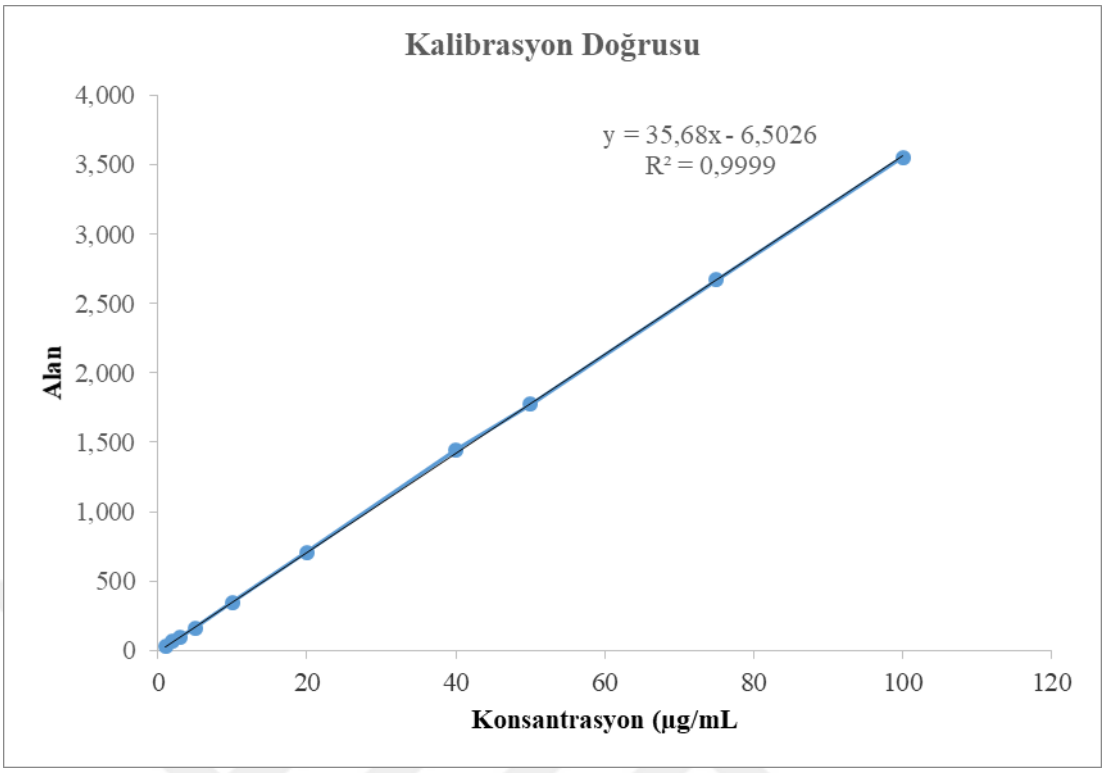
	Distile Su	**pH 6.8 fosfat tamponu**
Eğim (m)	65,538	65,146
Eğimin standart hatası	0,5889	0,168
Güven aralığı (%95)	64,15→66,93	64,75→65,55
Korelasyon kat sayısı (r)	0,9996	0,9998
Determinasyon katsayısı (r2)	0,9994	0,9997
Kesişim (n)	-0,00622	0,019
Kesişimin standart hatası	0,004025	0,0012
Kesişimin güven aralığı (%95)	-0,01574→0,03297	-0,000806→0,004638
Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart sapması (Sy.x)	0,0084	0,0021

3.1.4.2. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu ait Bulgular

Berberinin, HPLC ile tayininde belirlenen koşullar Çizelge 2.1'de verilmiştir. Berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponundaki ölçümler Bölüm 2.2.1.5.2'de açıklandığı şekilde yapılmış ve kalibrasyon grafikleri ve denklemleri tespit edilmiştir. Grafikler sırası ile distile su için Şekil 3.8'de ve pH 6,8 fosfat tamponu için Şekil 3.9'da; bu doğrulara ait veriler Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Berberinin distile su ortamındaki kalibrsyon doğrusu (n=3).



Şekil 3.9. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki kalibrsyon doğrusu (n=3).

Çizelge 3.2. Berberinin kalibrasyon doğrusuna ait veriler.

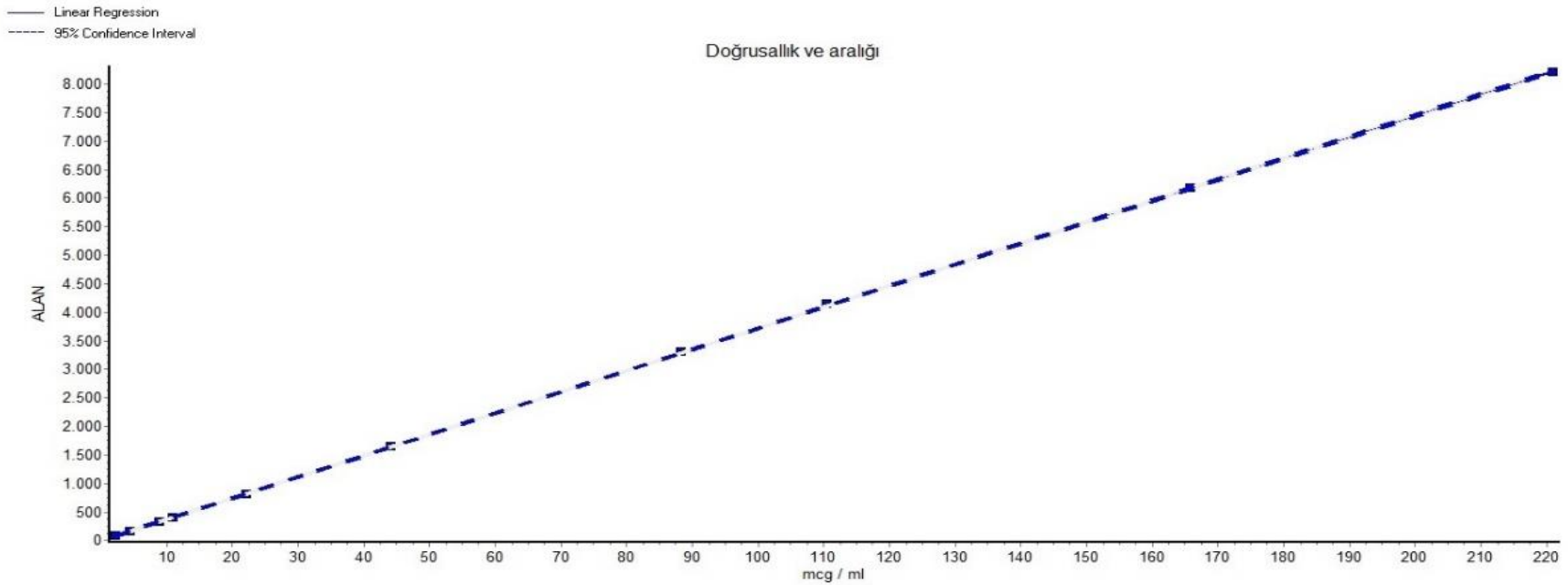
Ortam	**Distile su**	**Ph 6,8 fosfat tamponu**
Eğim	32,207	35,645
Kesişim	0,647	-7,538
Doğru denklemi	y=32,207x+0,647	y=35,645x-7,538
Determinasyon kat sayısı (r^2)	1	0,9999

3.1.5. Berberinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Analitik Valibasyonu ait Bulgular

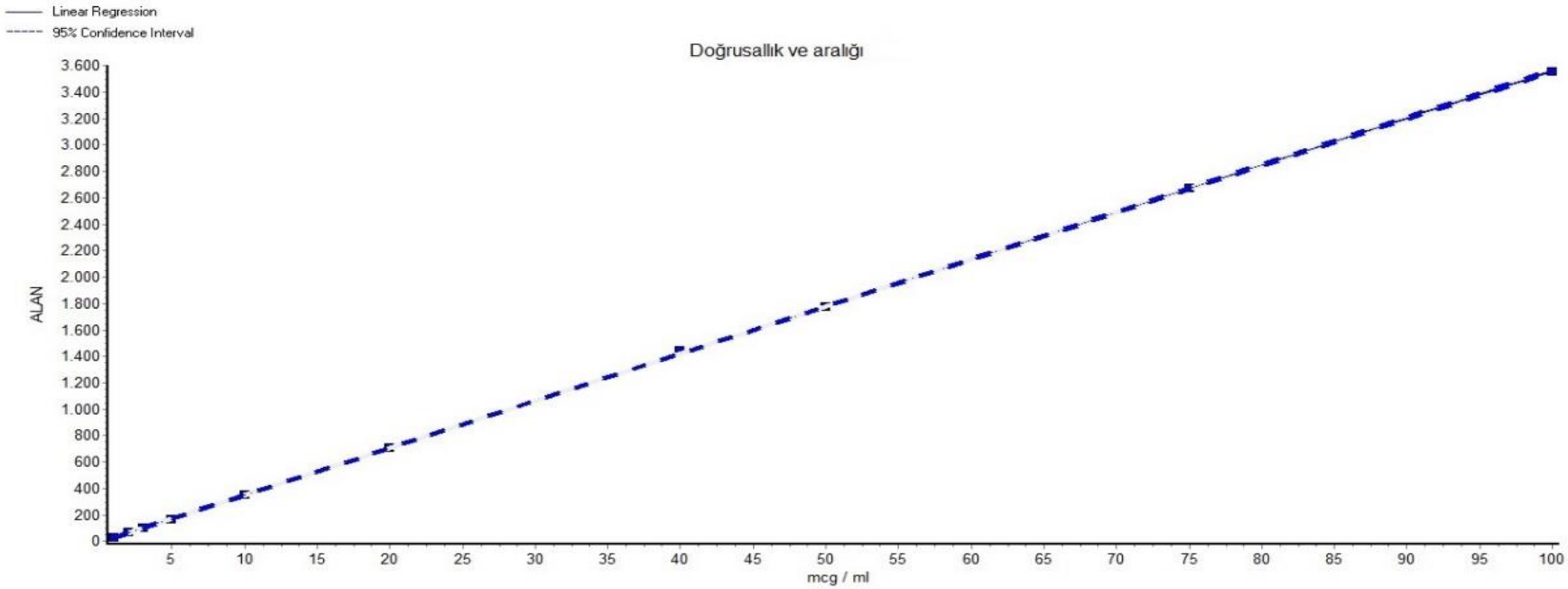
3.1.5.1. Doğrusallık ve Aralığı

Berberinin miktar tayini yöntemini doğrusallık ve aralığı çalışması Bölüm 2.2.1.6.1'de belirtildiği şekilde tayin edilmiştir. Berberinin distile su ortamındaki

miktar tayini yöntemine ait doğrusallık çalışmasından elde edilen doğrusallık grafiği Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.10. Berberinin distile su ortamındaki miktar tayini yönteminin doğrusallık grafiği (n=3).



Şekil 3.11. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminin doğrusallık grafiği (n=3).

Çizelge 3.3. Berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin veriler.

	Distile Su	**pH 6.8 fosfat tamponu**
Eğim (m)	37,207	35,680
Eğimin standart hatası	0,079	0,09731
Güven aralığı (%95)	37,024→37,389	35,456→35,905
Korelasyon kat sayısı (r)	1	1
Determinasyon katsayısı (r2)	1	0,9999
Kesişim (n)	0,6466	-6,503
Kesişimin standart hatası	7,861	4,380
Kesişimin güven aralığı (%95)	-17,481→18,774	-16,603→3,5988
Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart sapması (Sy.x)	18,183	10,159

3.1.5.2. Doğruluk ve Geri Elde

Berberinin miktar tayini yöntemlerine ait doğruluk ve geri eldesi Bölüm 2.2.1.6.2'de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Berberinin distile su ortamında miktar tayini yönteminden elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları (n=3).

Teorik Derişim 3 µg/mL			**Teorik Derişim 20 µg/mL**			**Teorik Derişim 75 µg/mL**		
Alan	**Bulunan Derişim (µg/mL)**	**% Geri Elde**	**Alan**	**Bulunan Derişim (µg/mL)**	**% Geri Elde**	**Alan**	**Bulunan Derişim (µg/mlL**	**% Geri Elde**
109,624	2,929	97,632	734,258	19,717	98,585	2.744,637	73,749	98,332
110,074	2,941	98,034	736,575	19,779	98,896	2.754,734	74,021	98,694
110,218	2,945	98,163	739,633	19,861	99,307	2.761,674	74,207	98,943
109,972	2,938	97,943	736,822	19,786	98,930	2.753,682	73,992	98,657
110,146	2,943	98,099	738,104	19,820	99,102	2.758,204	74,114	98,819
109,849	2,935	97,833	735,416	19,748	98,741	2.749.685	73.885	98.513

Çizelge 3.4. Devam. Berberinin distile su ortamında miktar tayini yönteminden elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları (n=3).

Ort.% Geri Elde	97,951	**Ort.% Geri Elde**	98,927	**Ort.% Geri Elde**	98,660
SS*	0,195	**SS***	0,256	**SS***	0,217
%BSS**	0,199	**%BSS****	0,259	**%BSS***	0,220

*Standart Sapma, **%Bağıl Sapma.

Çizelge 3.5. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminden elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları (n=3).

Teorik Derişim 3 µg/mL			**Teorik Derişim 20 µg/mL**			**Teorik Derişim 75 µg/mL**		
Alan	**Bulunan Derişim (µg/mL)**	**% Geri Elde**	**Alan**	**Bulunan Derişim (µg/mL)**	**% Geri Elde**	**Alan**	**Bulunan Derişim (µg/mL)**	**% Geri Elde**
97,260	2,935	97,833	705,105	19,988	99,939	2.673,757	75,217	100,290
98,441	2,968	98,938	711,464	20,166	100,831	2.672,436	75,180	100,240
98,014	2,956	98,538	716,360	20,303	101,517	2.676,150	75,284	100,379
98,310	2,964	98,815	718,078	20,352	101,758	2.667,814	75,050	100,067
96,640	2,918	97,253	702,585	19,917	99,585	2.669,174	75,089	100,118
96,580	2,916	97,197	702.261	19,908	99,540	2.676,438	75,292	100,390
Ort.% Geri Elde		98,096	**Ort.% Geri Elde**		100,528	**Ort.% Geri Elde**		100,247
SS*		0,776	**SS***		0,980	**SS***		0,133
%BSS**		0,791	**%BSS****		0,974	**%BSS****		0,133

*Standart Sapma, **%Bağıl Sapma.

3.1.5.3. Kesinlik

Berberinin miktar tayini yöntemine ait kesinlik çalışmasında yöntemin tekrarlanabilirliği ile farklı günlere ait ara kesinliği tayin edilmiştir. Berberinin miktar tayin yöntemlerinin tekrarlanabilirlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de ve ara kesinlik sonuçları Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Berberinin su ortamındaki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik sonuçları (n=3).

Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)	Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)	Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)
3	2,929	20	19,717	75	73,749
3	2,941	20	19,779	75	74,021
3	2,945	20	19,861	75	74,207
3	2,938	20	19,786	75	73,992
3	2,943	20	19,820	75	74,114
3	2,935	20	19,748	75	73,885
Ortalama	2,939	Ortalama	19,785	Ortalama	73,995
SS*	0,006	SS*	0,051	SS*	0,163
%BSS**	0,199	%BSS**	0,259	%BSS**	0,220

*Standart Sapma, **% Bağıl Sapma.

Çizelge 3.7. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik sonuçları (n=3).

Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)	Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)	Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)
3	2,935	20	19,988	75	75,217
3	2,968	20	20,166	75	75,180
3	2,956	20	20,303	75	75,284
3	2,964	20	20,352	75	75,050
3	2,918	20	19,917	75	75,089
3	2,916	20	19,908	75	75,292
Ortalama	2,943	Ortalama	20,106	Ortalama	75,185
SS*	0,023	SS*	0,196	SS*	0,100
%BSS**	0,791	%BSS**	0,974	%BSS**	0,133

*Standart Sapma, **% Bağıl Sapma.

Çizelge 3.8. Berberinin su ortamındaki miktar tayini yönteminin ara kesinlik sonuçları (n=3).

Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)			Ortalama	SS*	%BSS**
	Birinci Gün	İkinci Gün	Üçüncü Gün			
5	4,946	4,971	4,990	4,969	0,022	0,452
20	19,507	19,611	19,656	19,591	0,077	0,391
40	39,764	39,985	40,047	39,932	0,148	0,372
100	99,783	100,391	100,808	100,327	0,515	0,513

*Standart Sapma, **% Bağıl Sapma.

Çizelge 3.9. Berberinin pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayini yönteminin ara kesinlik sonuçları (n=3).

Teorik Derişim (µg/mL)	Bulunan Derişim (µg/mL)			Ortalama	SS*	%BSS**
	Birinci Gün	İkinci Gün	Üçüncü Gün			
5	4,735	4,844	4,797	4,792	0,055	1,141
20	20,081	20,031	19,985	20,032	0,048	0,240
40	40,755	40,772	40,670	40,732	0,055	0,134
100	99,870	99,920	99,908	99,899	0,026	0,026

*Standart Sapma, **% Bağıl Sapma.

3.1.5.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

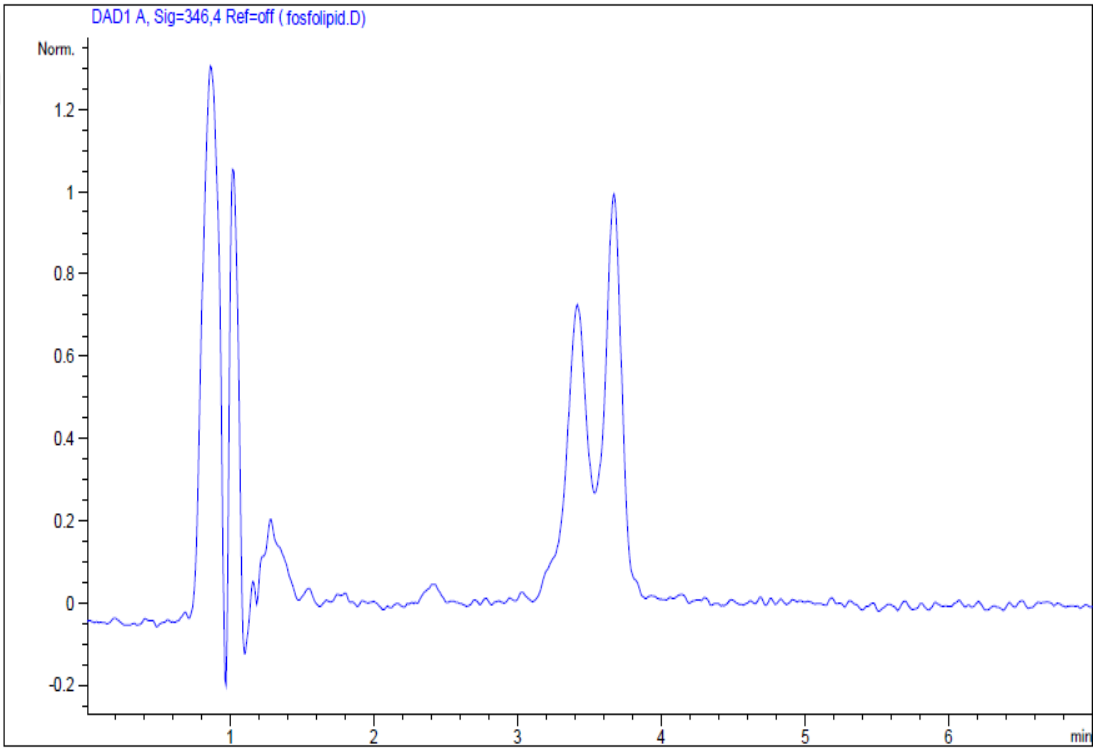
Berberinin miktar tayin yöntemlerinin teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) Bölüm 2.2.1.6.4'de belirtilen şekilde hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Berberinin distile su ve pH 6,8 fosfat tamponundaki ortamındaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları.

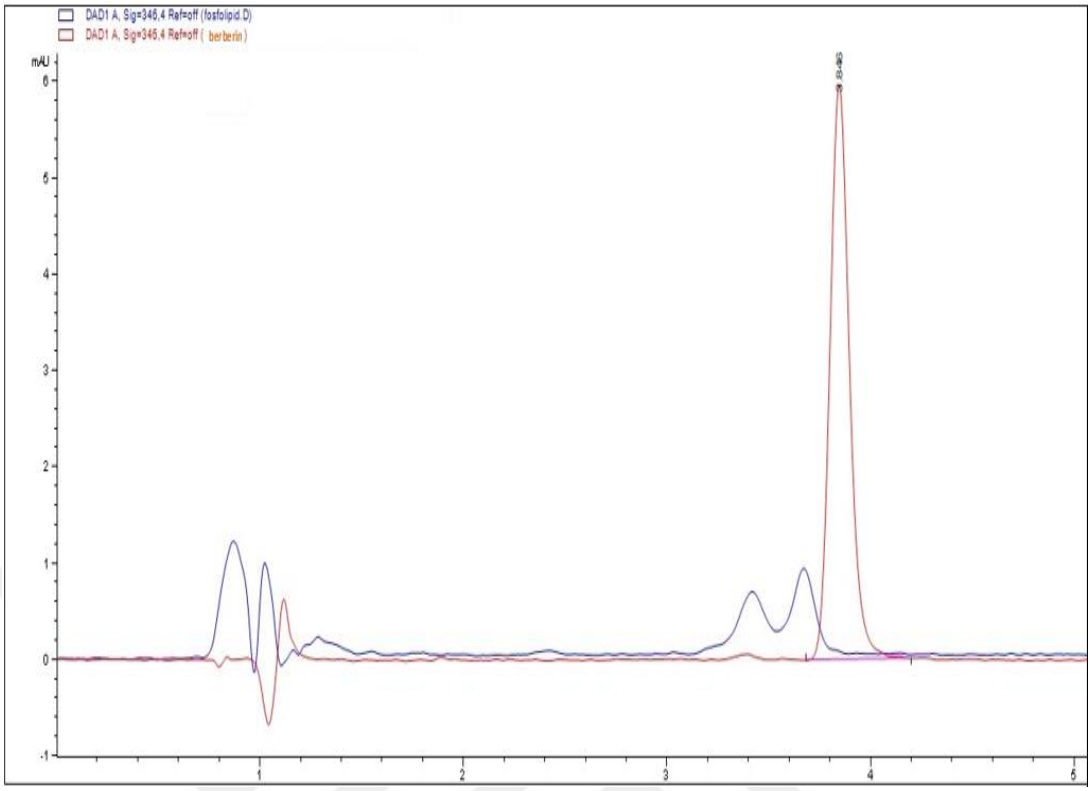
	Distile su	pH 6,8 fosfat tamponu
Teşhis Sınırı (LOD) (µg/mL)	0,020	0,077
Tayin Sınırı (LOQ) (µg/mL)	0,061	0,233

3.1.5.5. Özgünlük

Berberinin formülasyonda bulunan fosfolipit ile girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir. Berberinin keskin ve temiz bir pik verdiği dalga boyunda (346 nm) yardımcı madde olarak kullanılan fosfolipite ait pik Şekil 3.12'de verilmiştir. Bu pikin Berberine yakın bir dalga boyunda olduğu görülmektedir. Bu iki maddenin girişim yapıp yapmadığını net olarak anlamak için her iki kromatogram üst üste getirilmiştir. Şekil 3.13'de görüldüğü gibi bir girişim mevcuttur.



Şekil 3.12. Formülasyonda kullanılan fosfolipite ait HPLC'de gözlenen kromatogram.



Şekil 3.13. Berberin ve fosfolipitin üst üste getirilmiş kromatogramı.

Bu girişimi değerlendirmek amacıyla aşağıda verilen eşitlik kullanılarak R (ayırıcılık) değeri aşağıda verilen denklem ile hesaplanmaktadır.

$$R = 2\left[\frac{tr,A - tr,B}{Tw,A + Tw,B}\right]$$

tr, A : A maddesinin alıkonma zamanı

(A maddesi daha uzun alıkonma süresine sahip maddedir.)

tr, B : B maddesinin alıkonma zamanı

Tw, A : A maddesinin oluşan pik aralığının genişliği

Tw, B : B maddesinin oluşan pik aralığının genişliği

Kromatografide; R=1 olarak tespit edildiğinde piklerin nicel olarak ayrıldığı ancak piklerin %2 oranında kesiştiğini, R=1,5 olması durumunda bu kesişmenin %1 oranında olduğu ve piklerin tamamen ayrıldığını belirtir (Güngör-Ak ve ark., 2020; Yılmaz ve ark., 1997).

Berberin ve fosfolipitin kromotogramlarından elde edilen veriler Çizelge 3.11'de verilmiştir. Söz konusu veriler ile 1,620 ayırıcılık değeri olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.11. Berberin ve fosfolipitin kromotogramlarından elde edilen veriler.

Maddenin Adı	**AlıkonmaZamanı (t_r)**	**Pik Aralığının Genişliği (T_w)**
Berberin	3,846	0,1017
Fosfolipit	3,672	0,1131

3.1.6. Berberinin Çözünürlüğünün Belirlenmesi Ait Bulgular

Çözünürlük deneyleri üç kez yapılmıştır. Bulunan değerlerin ortalaması ve standart sapması (SS) hesaplanmıştır. UV spektroskopik yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlarda, berberinin sudaki çözünürlük değeri ± SS değeri; 25 °C de 1,665 ±0,014 mg/mL ve 37 °C de ise 2,022 ±0,026 mg/mL olarak tayin edilmiştir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. Kullanılan miktar tayini yöntemlerine göre hesaplanan çözünürlük sonuçları (n=3).

Ortam	**Distile su**		**pH 6,8 fosfat tamponu**	
Sıcaklık (°C)	**25°C**	**37°C**	**25°C**	**37°C**
Çözünürlük (mg/mL) ±SS*	1,665 ±0,014	2,022 ±0,026	1,368 ±0,029	1,896 ±0,04

*Standart Sapma.

3.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

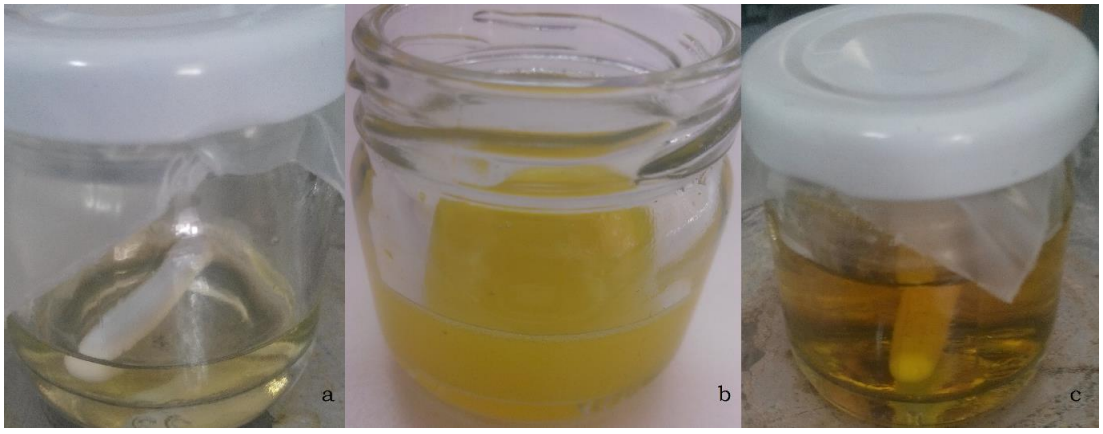
3.2.1. Berberin-Fitozomlarının Hazırlanmasına Yönelik Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.2.1.1. İnce Film Oluşturma Yöntemi (Bangham) ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Bu yöntemle fitozomlar tam olarak elde edilememiştir. Partikül büyüklükleri ve enkapsülasyon etkinliği değerlendirildiğinde anlamlı değerlerin elde edilememesi ve sapmaların fazla olması, yöntemin zor ve veriminin de düşük olması nedeniyle kullanılmasından vazgeçilmiştir.

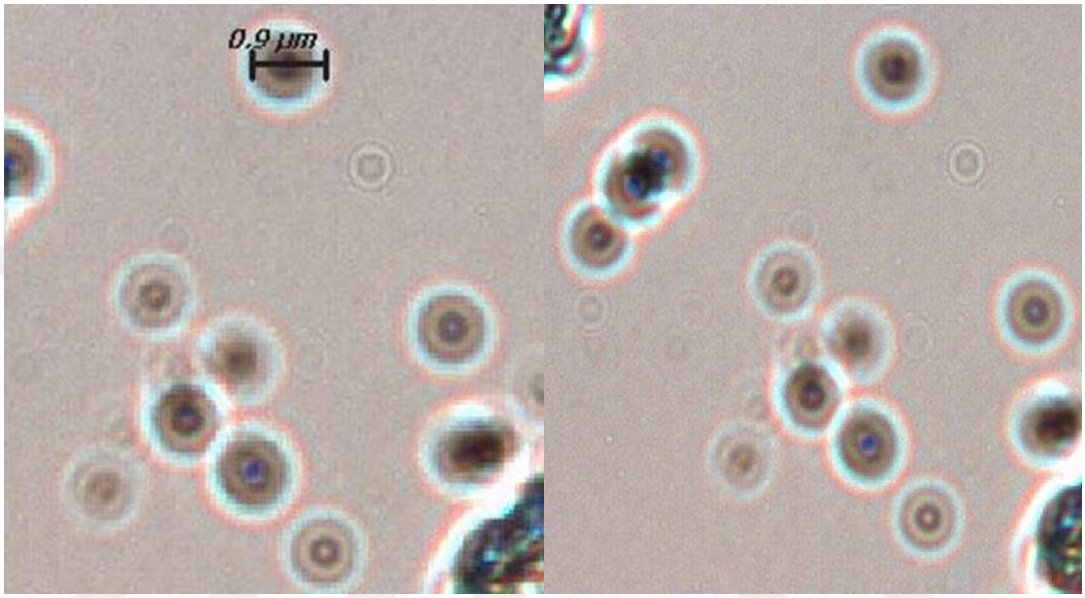
3.2.1.2. Etanol Enjeksiyonu Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Bu yöntem ile berberin-fitozomunun oluştuğu Şekil 3.14'de görülmektedir.



Şekil 3.14. (a) Fosfolipitin etanoldeki çözeltisi, (b) berberin-fitozomu ve (c) berberinin sudaki çözeltisi.

Elde edilen fitozomlar öncelikle mikroskopta da incelenmiştir (Şekil 3.15). Mikroskop görüntüsünde brownian hareketi yapan veziküler partiküller gözlenmiştir. Partiküller sürekli titreşim halinde hareket ettiklerinden çok net görüntüler elde edilememekle beraber, elde edilen veziküler yapıların mikrometre boyutunda olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.15. Oluşan veziküler yapının optik mikroskopta görünümü.

Bu yöntemde Bölüm 2.3.1.2'de verilen Çizelge 2.2'deki deneme formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.13'de sunulmuştur.

Çizelge 3.13. Etanol enjeksiyonu yöntemi ile hazırlanan deneme formülasyonlarının sonuçları (n=3).

Formülasyon	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	EE (%)
F1	410 ±23,2	0,264 ±0.003	37,21
F2	225±3,31	0,161 ±0.012	38,23
F3	246±26,8	0,175 ±0.010	39,51

EE: Enkapsülasyon etkinliği, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

3.2.1.3. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi ile Fitozomların Üretimi ve Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Bu yöntemde Bölüm 2.3.1.3'de verilen Çizelge 2.2'deki formülasyonları hazırlanmıştır. hazırlanmıştır. Formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.14'de sunulmuştur.

Çizelge 3.14. Ters faz buharlaşma yöntemi ile hazırlanan deneme formülasyonlarının sonuçları (n=3).

Formülasyon	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	EE (%)
F1	541,5±0,273	0,075±0,006	48,01
F2	827±0,297	0,088±0,003	44,06
F3	826,6±0,313	0,098±0,011	45,59

EE: Enkapsülasyon etkinliği, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

3.2.1.4. Etken Madde Yükleme Etkinliğine Ait Bulgular

Formülasyonları enkapsülasyon etkinliği (EE) Bölüm 2.3.1.4'de belirtilen yöntem ile hesaplanmış ve Çizelge 3.13'de, Çizelge 3.14'de, Çizelge 3.15'de ve Çizelge 3.16'da verilmiştir.

3.2.1.4.5. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Formülasyonları partikül büyüklüğü ve dağılımı Bölüm 2.3.1.5'de belirtilen yöntem ile hesaplanmış ve Çizelge 3.13'de, Çizelge 3.14'de, Çizelge 3.15'de ve Çizelge 3.16'da verilmiştir.

3.2.1.6. Zeta Potansiyeline Ait Bulgular

Formülasyonları zeta potansiyeli Bölüm 2.3.1.6'da belirtilen yöntem ile hesaplanmış ve Çizelge 3.15'de ve Çizelge 3.16'da verilmiştir.

3.2.2. Formülasyon Çalışmalarına ait Bulgular

Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16'da sırasıyla etanol enjeksiyon ve ters faz buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlara ait zeta potansiyel, partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular yer almaktadır. Ters faz buharlaştırma yöntemi kullanılarak elde edilen formülasyonların enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.15. Etanol enjeksiyonu yöntemi kullanılarak elde edilen formülasyonlara ait sonuçlar (n=3).

For. Kodu	Sıcaklık (ºC)	Reaksiyon Süresi (Saat)	Karışım Oranı (B:F)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	EE (%)
E1	40	1	1:3	-4,27 ±0,1	540 ±0,798	0,637 ±0,005	13,38
E2	40	2	1:3	-4,28 ±0,1	394 ±0,795	0,632 ±0,012	4,44
E3	40	3	1:3	-4,27 ±0,1	121 ±0,974	0,949 ±0,002	9,64
E4	40	1	1:5	-4,27 ±0,1	502 ±0,482	0,232 ±0,009	26,92
E5	40	2	1:5	-5,14 ±0,1	583 ±0,374	0,140 ±0,008	17,74
E6	40	3	1:5	-4,63 ±0,1	607 ±0,473	0,224 ±0,003	24,18
E7	40	1	1:7	-5,03 ±0,1	588 ±0,293	0,086 ±0,013	28,20
E8	40	2	1:7	-4,58 ±0,1	541 ±0,119	0,014 ±0,009	23,62
E9	40	3	1:7	-5,15 ±0,1	750 ±0,229	0,052 ±0,010	23,15
E10	50	1	1:3	-4,27 ±0,1	1.476 ±0,880	0,774 ±0,011	29,03
E11	50	2	1:3	-4,27 ±0,1	1.427 ±0,788	0,621 ±0,007	27,93
E12	50	3	1:3	-4,28 ±0,1	656 ±0,765	0,585 ±0,008	25,81
E13	50	1	1:5	-4,27 ±0,1	749 ±0,601	0,361 ±0,009	36,91
E14	50	2	1:5	-4,63 ±0,1	1.042 ±0,357	0,127 ±0,009	38,66
E15	50	3	1:5	-5,15 ±0,1	728 ±0,992	0,984 ±0,013	42,37
E16	50	1	1:7	-4,27 ±0,1	935 ±0,932	0,869 ±0,010	37,69
E17	50	2	1:7	-4,28 ±0,1	1.036 ±0,638	0,407 ±0,011	48,31
E18	50	3	1:7	-5,03 ±0,1	1.279 ±0,523	0,274 ±0,007	38,10
E19	60	1	1:3	-4,27 ±0,1	815 ±0,865	0,748 ±0,008	28,07
E20	60	2	1:3	-4,27 ±0,1	665 ±0,946	0,895 ±0,003	41,13
E21	60	3	1:3	-4,27 ±0,1	776 ±0,729	0,531 ±0,011	41,97
E22	60	1	1:5	-4,27 ±0,1	1.251 ±1,107	1,225 ±0,005	49,74
E23	60	2	1:5	-4,28 ±0,1	1.421 ±2,274	5,171 ±0,006	47,52
E24	60	3	1:5	-4,27 ±0,1	1.207 ±0,597	0,356 ±0,012	49,34
E25	60	1	1:7	-4,27 ±0,1	1.229 ±1,046	1,094 ±0,015	53,66
E26	60	2	1:7	-5,15 ±0,1	1.066 ±0,871	0,759 ±0,010	50,98
E27	60	3	1:7	-5,03 ±0,1	1.067 ±1,009	1,018 ±0,013	46,67

EE: Enkapsülasyon etkinliği, For.: Formülasyon, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

Çizelge 3.16. Ters faz buharlaşma yöntemi kullanılarak elde edilen formülasyonlara ait sonuçlar (n=3).

For. Kodu	Sıcaklık (ºC)	Reaksiyon Süresi (Saat)	Karışım Oranı (B:F)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	EE (%)
T1	40	1	1:3	-4,27 ±0,1	462,8 ±0,561	0,315 ±0,003	40,80
T2	40	2	1:3	-4,27 ±0,1	580,7 ±0,547	0,299 ±0,011	38,78
T3	40	3	1:3	-4,27 ±0,1	572,4 ±0,511	0,261 ±0,005	32,84
T4	40	1	1:5	-4,27 ±0,1	541,5 ±0,273	0,075 ±0,006	48,01
T5	40	2	1:5	-4,28 ±0,1	632,5 ±1,166	1,360 ±0,012	38,52
T6	40	3	1:5	-4,27 ±0,1	794,1 ±1,446	2,091 ±0,015	40,98
T7	40	1	1:7	-4,27 ±0,1	575,8 ±0,918	0,843 ±0,010	55,45
T8	40	2	1:7	-5,15 ±0,1	555,8 ±0,352	0,124 ±0,005	50,30
T9	40	3	1:7	-5,03 ±0,1	794,6 ±2,451	6,007 ±0,012	46,46
T10	50	1	1:3	-4,58 ±0,1	751,8 ±0,356	0,127 ±0,002	40,33
T11	50	2	1:3	-5,15 ±0,1	667,9 ±0,568	0,323 ±0,009	40,51
T12	50	3	1:3	-4,27 ±0,1	846,9 ±0,526	0,277 ±0,008	40,45
T13	50	1	1:5	-4,27 ±0,1	827 ±0,297	0,088 ±0,003	44,06
T14	50	2	1:5	-4,28 ±0,1	765,2 ±0,554	0,307 ±0,013	46,87
T15	50	3	1:5	-4,27 ±0,1	844,6 ±0,265	0,070 ±0,002	45,27
T16	50	1	1:7	-4,63 ±0,1	587,1 ±0,619	0,383 ±0,009	43,49
T17	50	2	1:7	-5,15 ±0,1	339,2 ±0,531	0,282 ±0,010	48,03
T18	50	3	1:7	-4,27 ±0,1	794,9 ±0,960	0,922 ±0,011	64,54
T19	60	1	1:3	-4,28 ±0,1	987,6 ±0,588	0,346 ±0,007	38,00
T20	60	2	1:3	-4,27 ±0,1	968,4 ±0,573	0,328 ±0,008	54,79
T21	60	3	1:3	-4,28 ±0,1	1.258,7 ±0,35	0,122 ±0,004	40,36
T22	60	1	1:5	-4,27 ±0,1	826,6 ±0,313	0,098 ±0,011	45,59
T23	60	2	1:5	-4,27 ±0,1	1.203,6 ±1,207	1,457 ±0,010	39,68
T24	60	3	1:5	-5,15 ±0,1	1.082,1 ±0,326	0,106 ±0,090	38,63
T25	60	1	1:7	-4,28 ±0,1	632,4 ±0,707	0,500 ±0,011	51,31
T26	60	2	1:7	-4,27 ±0,1	1.009 ±1,33	1,769 ±0,013	46,76
T27	60	3	1:7	-5,03 ±0,1	1.064,5 ±0,796	0,634 ±0,007	52,98

EE: Enkapsülasyon etkinliği, For.: Formülasyon, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

3.3. QbD Yaklaşımla İdeal Formülasyonun Belirlenmesine Ait Bulgular

Bu çalışmada kritik kalite özelliği (CQA) olarak; zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve enkapsülasyon etkinliği (EE); kritik materyal özellikleri (CMA) ve kritik proses parametreleri (CPP) olarak ise; sıcaklık, reaksiyon süresi, karışım oranı belirlenmiştir.

MODDE Pro programı kullanılarak daha önceden belirlenen CQA, CMA ve CPP'lere göre program full factorial design ile 27 farklı deney önermiştir (Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16). İki farklı üretim metodu için elde edilen deney sonuçları programa girilerek program tarafından değerlendirilmesi sonunda program tarafından optimum bir formülasyon önerilmiştir Bu optimum formülasyonlar ve bu yöntemler içersinde bu formülasyonlara en iyi uyum gösteren formüllasyonlar Çizelge 3.17 ve Çizelge 3.18'de verilmiştir.

Etanol enjeksiyon yönteminin MODDE Pro programı kullanılarak değerlendirilmesi sonunda bulunan formülasyon EModd koduyla yer almaktadır. Bu yöntem içersinde EModd formülasyonuna en fazla benzerlik gösteren E18 kodlu formülasyondur.

Çizelge 3.17. Etanol enjeksiyon yöntemi için modelleme programından elde edilen ve kendisine en en fazla uyum gösteren formülasyon sonucu.

For. kodu	Sıcaklık (°C)	Reaksiyon Süresi (Saat)	Karışım Oranı (B:F)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	EE (%)
EModd	48.2	2.9	1:7	-4,883	890,7	0,5227	38,01
E18	50	3	1:7	-5,03±0,1	1.279±0,523	0,274±0,007	38,10

EE: Enkapsülasyon etkinliği, For.: Formülasyon, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

Ters faz buharlaşma yönteminin MODDE Pro programı kullanılarak değerlendirilmesi sonunda bulunan formülasyon TModd koduyla yer almaktadır. Bu yöntem içersinde TModd formülasyonuna en fazla benzerlik gösteren T25 kodlu formülasyondur.

Çizelge 3.18. Ters faz buharlaşma yöntemi için modelleme programından elde edilen ve kendisine en fazla uyum gösteren formülasyon sonucu.

For. kodu	Sıcaklık (°C)	Reaksiyon Süresi (Saat)	Karışım Oranı (B:F)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	EE (%)
TModd	60	1	1:7	-4,485	843,3	0,368	50,11
T25	60	1	1:7	-4,28 ±0,1	632,4 ±0,707	0,5 ±0,011	51,31

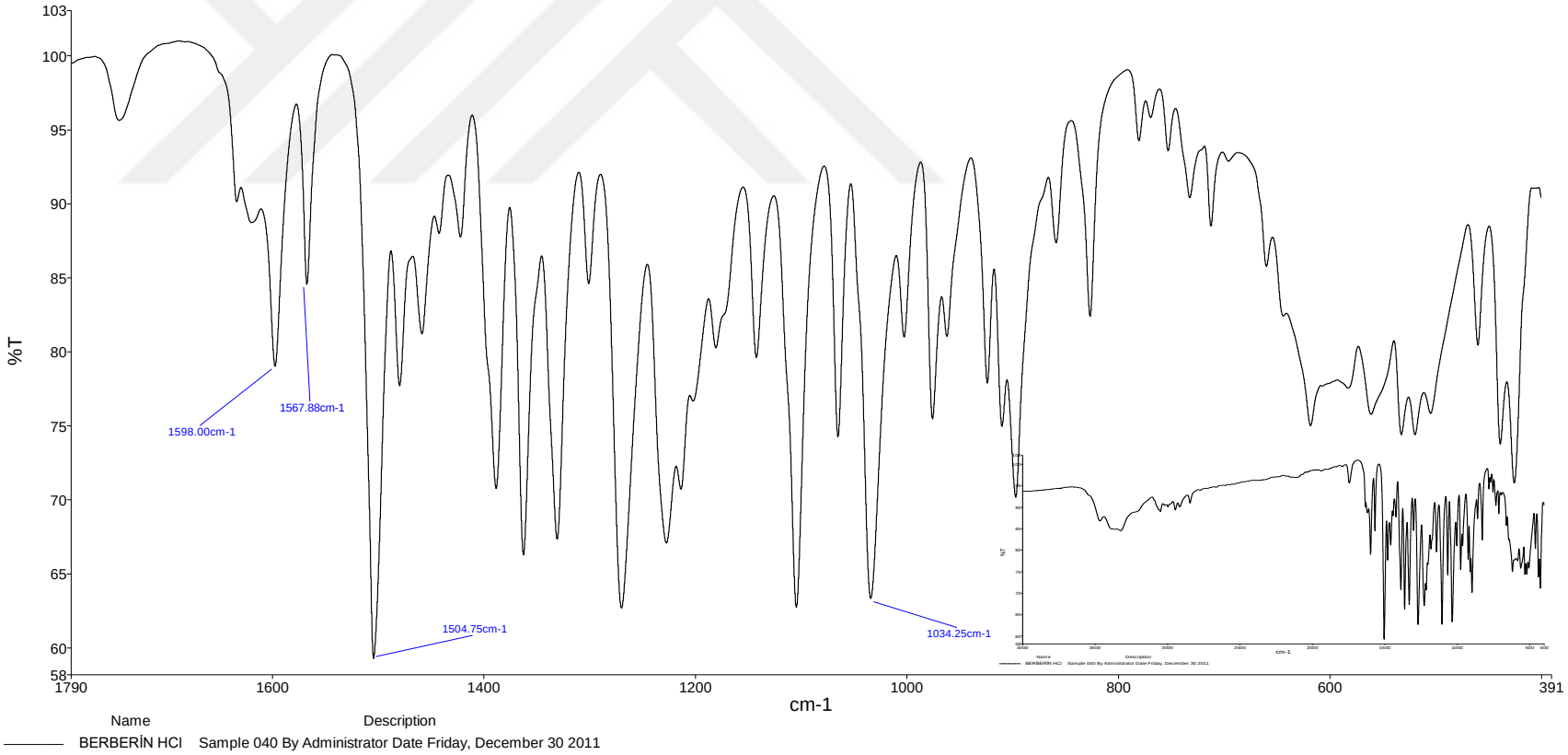
EE: Enkapsülasyon etkinliği, For.: Formülasyon, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

3.3.1. İdeal Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

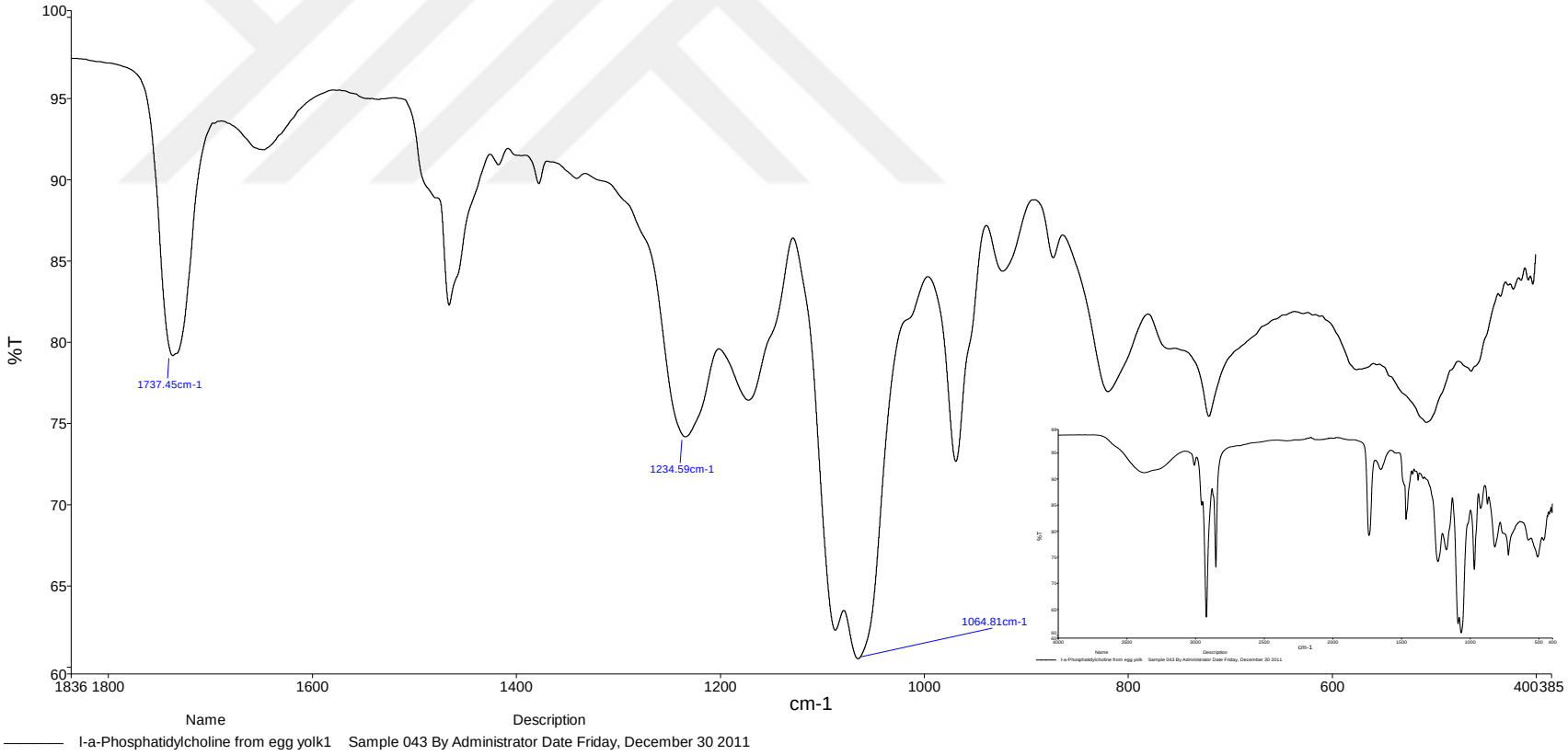
QbD yaklaşımla elde edilen T25 kodlu formülasyon ile üretim tekrarlanabilirliği, formülasyonun SEM, DSC ve FTIR analizleri ve etken madde salım çalışması yapılmıştır.

3.3.1.1. FTIR Spektrumuna Ait Bulgular

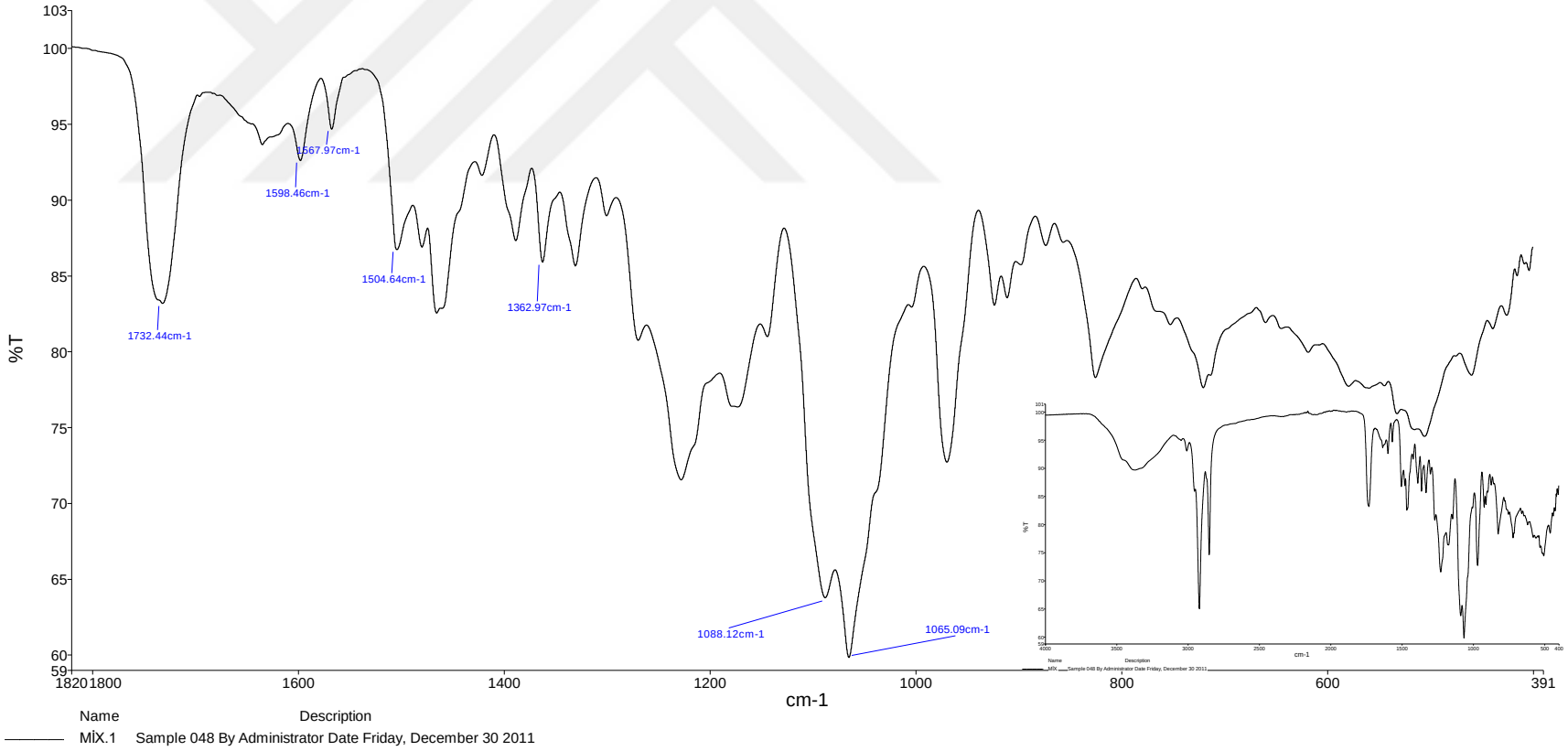
FTIR Spetroskopisi ile berberine (Şekil 3.16), fosfolipite (Şekil 3.17), fiziksel karışımına (Şekil 3.18) ve berberin-fitozomuna (Şekil 3.19) ait verilen spektrumlar görülmektedir.



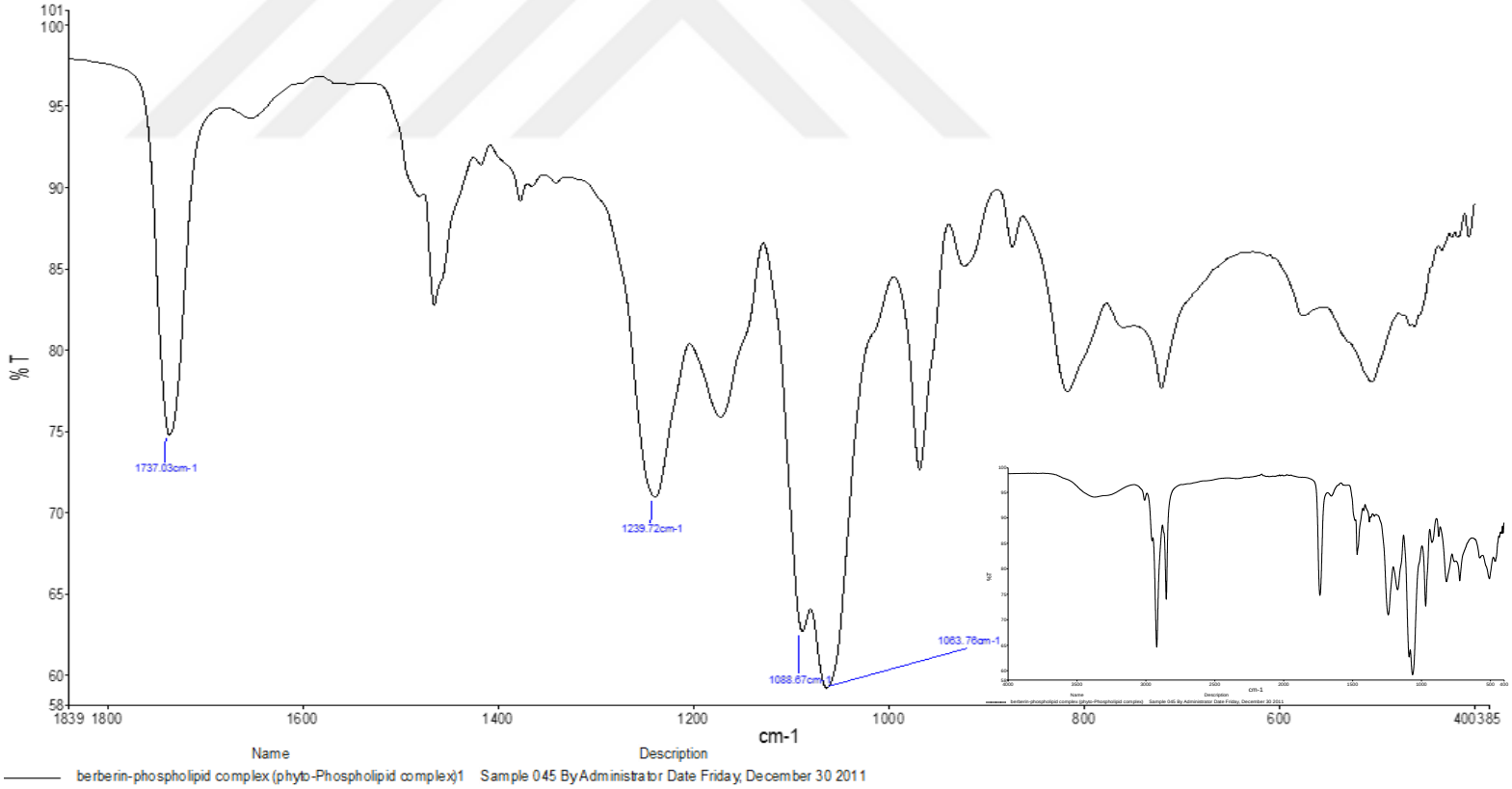
Şekil 3.16. Berberinin FTIR spektrumu (391-1.790 cm^{-1} dalga boyu aralığında). Küçük resimde 400-4.000 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki spektrumu.



Şekil 3.17. L-A-fosfatidilkolinin (egg yolk) FTIR spektrumu (391-1.790 cm^{-1} dalga boyu aralığında). Küçük resimde 400-4.000 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki spektrumu.



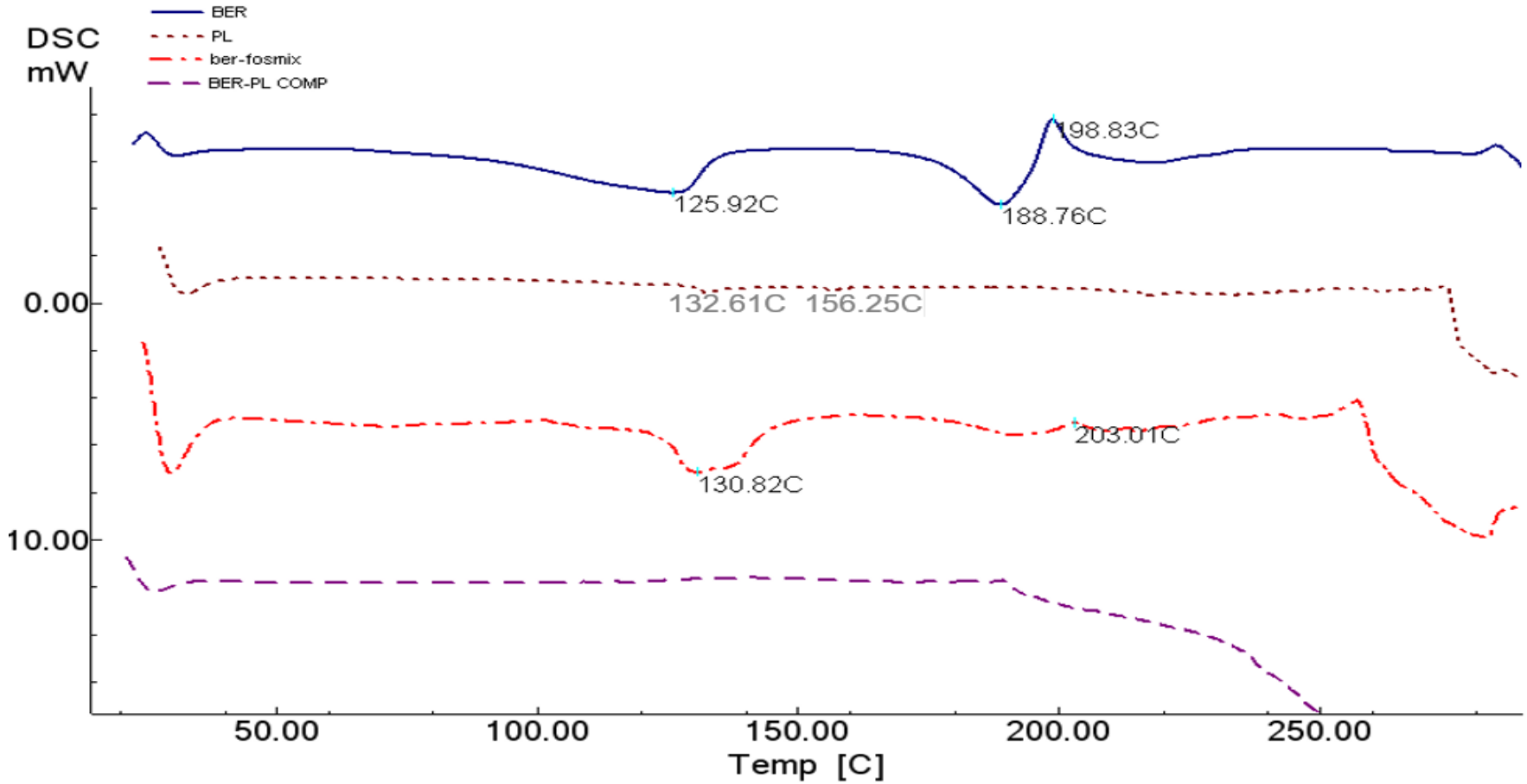
Şekil 3.18. Fiziksel karışımın FTIR spektrumu.(391-1.790 cm^{-1} dalga boyu aralığında). Küçük resimde 400-4.000 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki spektrumu.



Şekil 3.19. Berberin-fitozomunun FTIR spektrumu (391-1.790 cm-1 dalga boyu aralığında). Küçük resim: 400-4.000 cm-1 dalga boyu aralığındaki spektrumu.

3.3.1.2. DSC Spektrumuna Ait Bulgular

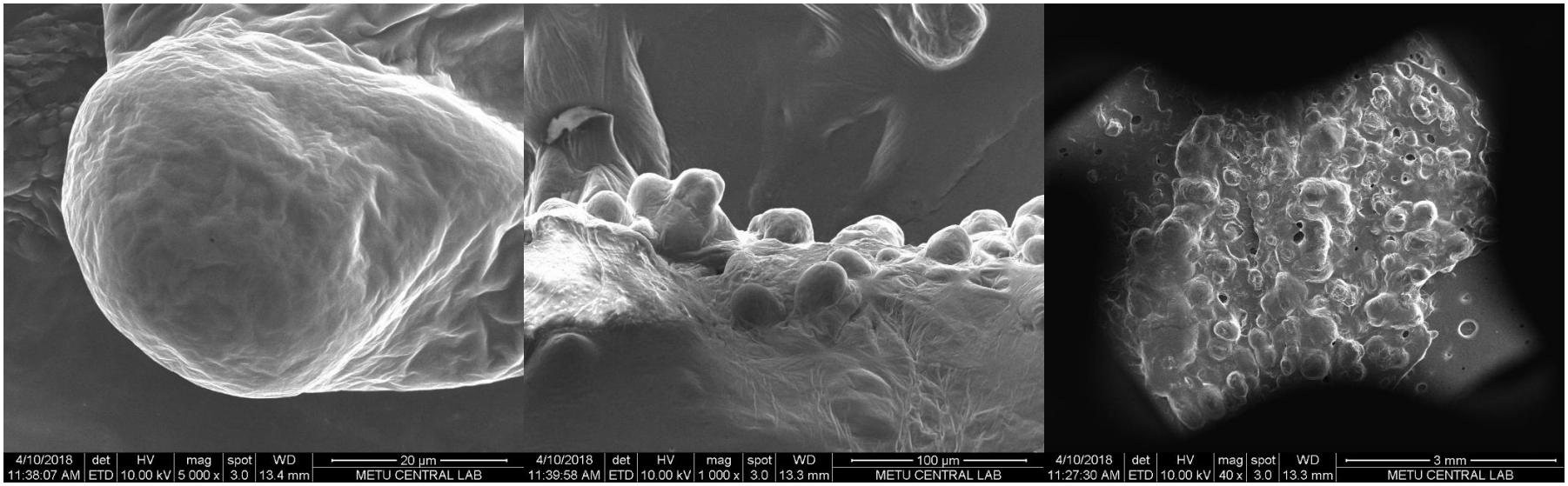
DSC kullanılarak çekilen Berberinin, fosfolipitin, fiziksel karışımın ve berberin-fitozonunun termal analizleri aynı termogram üzerinde karşılaştırmalı olarak Şekil 3.20'de sunulmuştur.



Şekil 3.20. DSC termogramı ve karşılaştırılması (yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla berberin, fosfolipit, fiziksel karışım ve berberin-fitozomu).

3.3.1.3. SEM Görüntüsüne Ait Bulgular

T25 kodlu formülasyonun üç farklı ölçekteki SEM görüntüleri Şekil 3.21'de verilmiştir.



Şekil 3.21. T25 kodlu formülasyona ait üç farklı ölçekteki SEM görüntüleri.

3.3.1.4. Partisyon Katsayısı Tayinine Ait Bulgular

Berberin, fiziksel karışım (1:7) ve ideal fitozomun (T25) sudaki çözünürlüğü, oktanoldeki çözünürlüğü ve bu veriler kullanılarak hesaplanan partisyon katsayıları (Py/s) sonuçları Çizelge 3.19'da verilmiştir.

Çizelge 3.19. Berberin, fiziksel karışım (1:7) ve berberin-fitozomun sudaki, oktanoldeki çözünürlüğü ve partisyon katsayısı (Py/s) (n=3).

	Sudaki çözünürlüğü (mg/mL) ±SS	**n-oktanoldeki çözünürlüğü (mg/mL) ±SS**	**$P_{y/s}$**
Berberin	1,820 ±0.095	0,507±0.047	0,278±0,011
Fiziksel karışım (1:7, a/a)	0,0487±0.061	0,0183±0,071	0,368±0.104
Fitozom (1:7, a/a) (T25)	0.0447±0,006	0.0556±0.014	1,243±0,127

3.3.1.5. İdeal Formülasyonun Üretim Tekrarlanabilirliğine Ait Bulgular

Çalışmalara QbD yaklaşlaşımla ideal formülasyon olarak belirlenen T25 kodlu formülasyonun tekrar üretilmesi ile devam edilmiştir. Sekiz kere üretim yapılarak zeta potansiyel, ortalama çap, polidispersite indeksi (PDI) ve yükleme etkinliği değerlendirilmiştir. Çizelge 3.20'de sonuçlar sunulmuştur. Ortalama enkapsülasyon etkinliği 51,85±1,36 (n=8) olarak tespit edilmiş ve formülasyon üzerinde yapılması düşünülen diğer analizlere geçilmiştir.

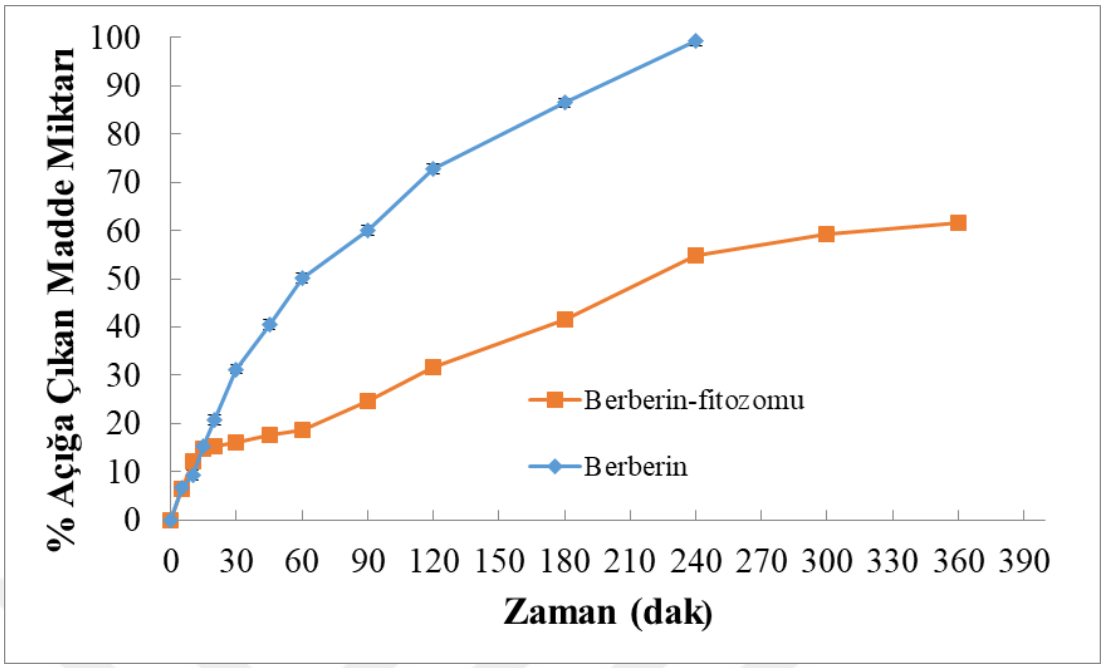
Çizelge 3.20. T25 kodlu formülasyonun üretim tekrarlanabilirliğine ait sonuçları (n=8).

Zeta Potansiyel (mV±SS)	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	EE (%)
-4,47 ±0,1	629,1 ±0,707	0,515 ±0,011	51,3
-4,65 ±0,1	645,1 ±0,894	0,514 ±0,013	50,9
-4,28 ±0,1	597,2 ±0,757	0,493 ±0,010	51,2
-4,58 ±0,1	622,9 ±0,689	0,509 ±0,019	51,3
-4,96 ±0,1	643,6 ±0,355	0,517 ±0,017	53.4
-4,25 ±0,1	631,5 ±0,801	0,500 ±0,015	51,3
-4,82 ±0,1	648,7 ±0,683	0,511 ±0,013	54,8
-4,13 ±0,1	666,3 ±0,723	0,507 ±0,011	52,2

EE: Enkapsülasyon etkinliği, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

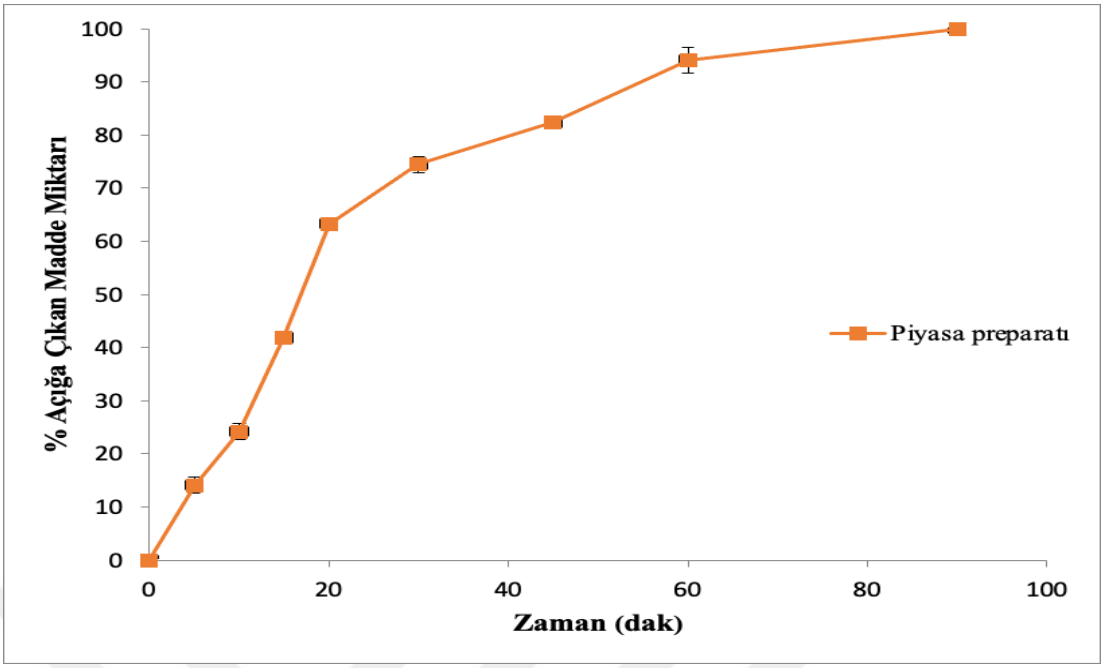
3.3.1.6. Salım Çalışmasına Ait Bulgular

T25 kodlu formülasyonundan 25 mg berberine eşdeğer oranda (piyasa preparatından elde edilen miktar her tablet için 25 mg olarak bulunmuştur.) berberin-fitozomu ve saf berberin kullanılarak yapılan etken madde salım çalışmaları karşılaştırmalı olarak sunulmuştur (Şekil 3.22). Berberinin salımı üçüncü saatte tamamen biterken berberin-fitozomunundan etken maddenin salımının altıncı saatte %60'ının gerçekleştiği görülmektedir. Üç paralel olarak gerçekleştirilen çalışmalarda da tüm zaman noktalarında elde edilen veriler için standart hata değerleri çok düşük çıkmıştır.



Şekil 3.22. Berberin ve berberin-fitozomuna ait salım profilleri (Ortalama±standart hata, n=3).

Piyasada gıda takviyesi kapsamında bulunan Tarım Bakanlığı'ndan ruhsatlı piyasa preparatının salım profili incelendiğinde, 90. dakikada %100'ün çıktığı görülmektedir (Şekil 3.23). Bu preparata ait salım verisi berberin ve berberin-fitozomunu ile aynı grafik üzerinde gösterilmemiştir. Çünkü çözünme hızı yönteminde farklılık vardır. Piyasa preparatı olduğu için Çin Farmakopesinde verilen yöntem baz alınmıştır ve bu yöntem kullanılarak çözünme hızı profili elde edilmiştir.



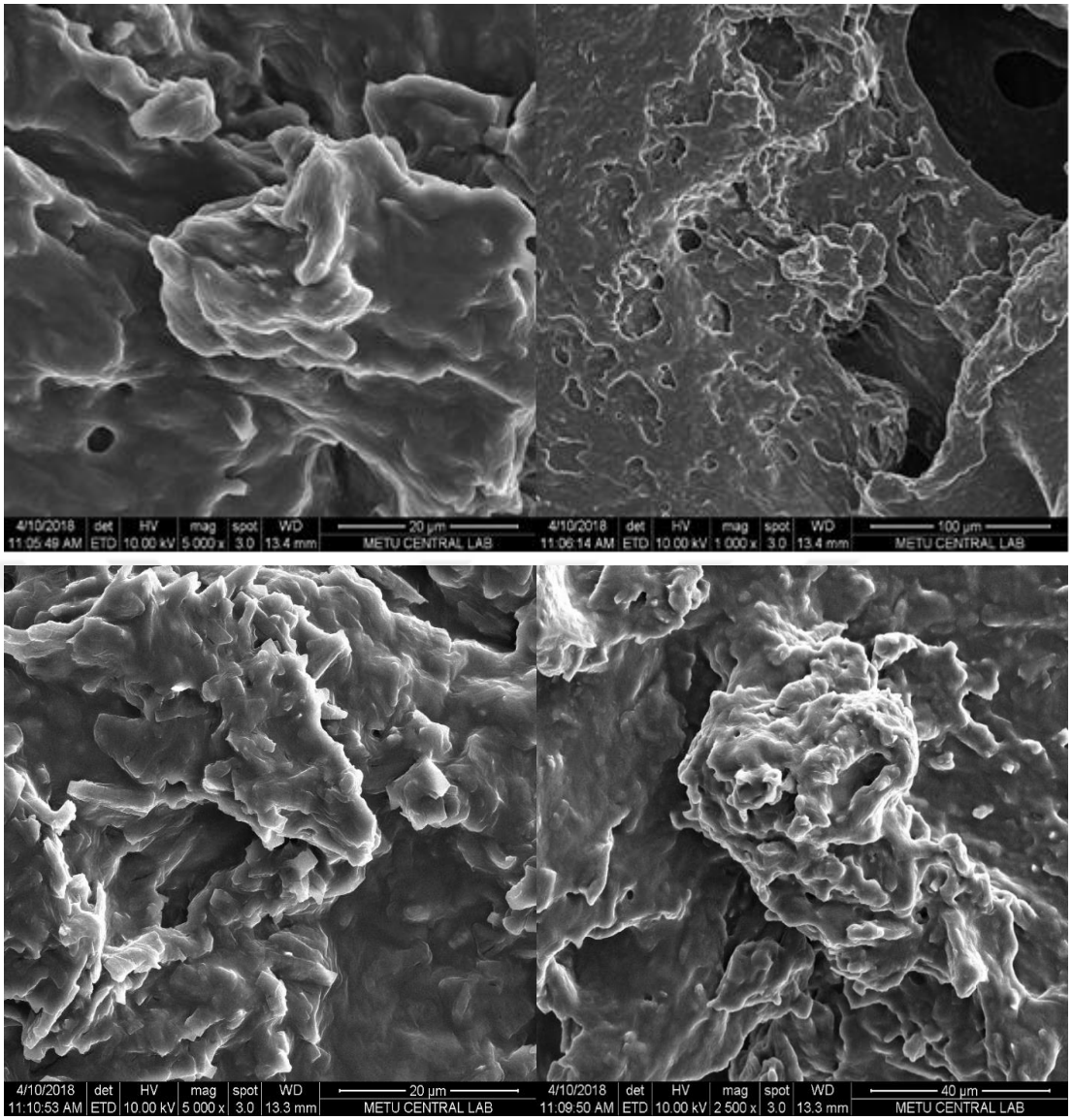
Şekil 3.23. Piyasa preparatına ait salım profili (Ortalama±standart hata, n=3).

3.3.1.7. Stabilite Çalışmasına ait Bulgular

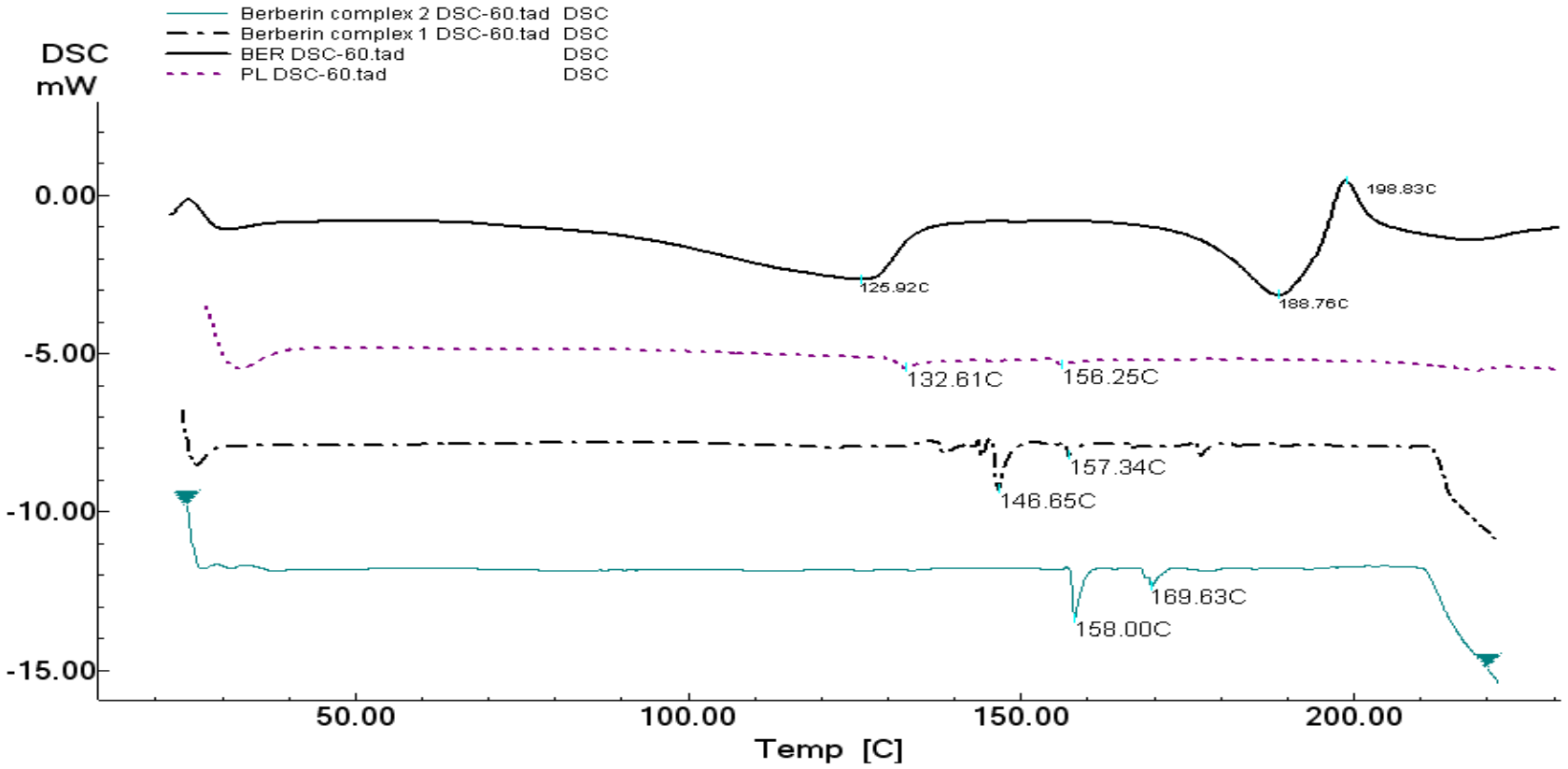
Stabilite çalışmalarında ideal formülasyon olan T25 kodlu formülasyon kullanılmıştır. 25°C ± 2°C / %60±5 BN ortamı için iklim dolabında ve 5°C ± 3°C için buzdolabında ve 3 ay bekletilmiştir. Üçüncü ay sonunda örneklerin öncelikle morfolojik değerlendirmesi yapılmıştır.

25°C ± 2°C / %60±5 BN ortamında ilk haftalardan itibaren formülasyonda erime görülürken 5°C ± 3°C için buzdolabında fitozom ilk günkü görünüş özelliğini korumuştur.

Partikül yüzey analizlerini incelenmesi sonucunda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.24'de (25°C ± 2°C / %60±5 BN) ve Şekil.3.25'de (5°C ± 3°C) görülmektedir.



25°C ± 2°C / %60±5 BN ve 5°C ± 3°C'deki stabilite koşullarına tabi tutulan T25 kodlu formülasyona ait DSC termogramları etken madde ve fosfolipit ile karşılaştırmalı olarak aynı termogramda gösterilmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.26. DSC termogramları (yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla Berberin, Fosfolipit, 5°C ± 3°C'deki T25 kodlu formülasyon ve 25°C ± 2°C / %60±5 BN koşulundaki T25 kodlu formülasyon).

25°C ± 2°C / %60±5 BN ve 5°C ± 3°C ‘deki stabilite koşullarına tabi tutulan T25 kodlu formülasyona ait üçüncü ayda elde edilen etken madde miktarı/yükleme etkinliğine ait sonuçlar Çizelge 3.21’de görülmektedir.

Çizelge 3.21. 25°C ± 2°C / %60±5 BN ve 5°C ± 3°C‘deki stabilite koşullarına tabi tutulan ve başlangıçtaki T25 kodlu formülasyona ait etken madde miktarı/yükleme etkinliğine ait sonuçlar (n=3).

Saklama Koşulu / Test	**Başlangıçtaki**	**5°C ± 3°C’de**	**25°C ± 2°C / %60±5 BN**
T25 kodlu formülasyondaki etken madde miktarı/yükleme etkinliği (±SS)	51,85±1,36	48.3±2,21	46.62±3.6

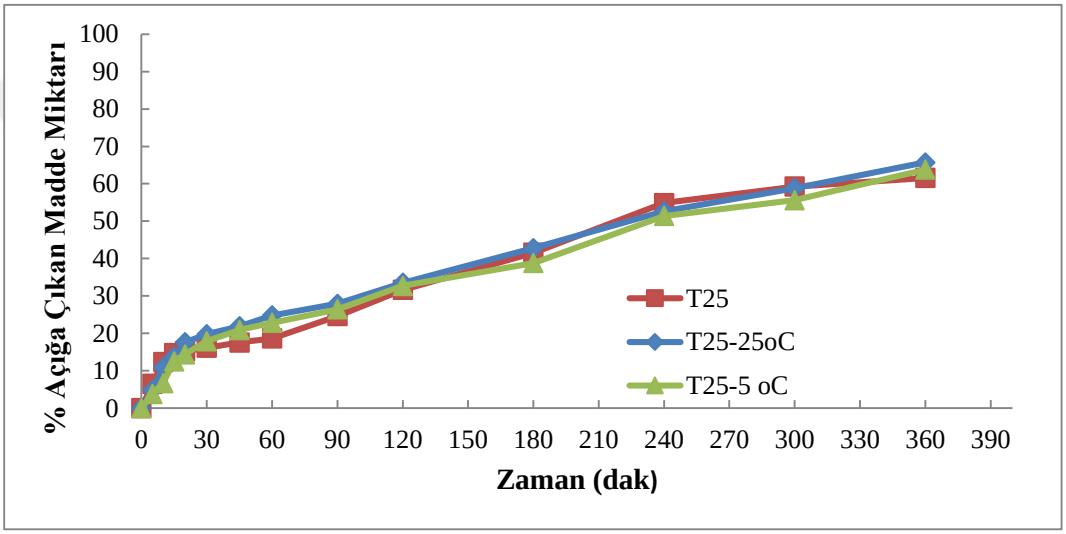
Stabilite çalışmaları sonrasında *in vitro* etken madde salım çalışmaları tekrarlanarak stabilite koşullarının T25 kodlu formülasyonun salım profili üzerindeki etkisi de incelenmiştir. 25°C ± 2 °C/%60±5 BN koşulunda bulunan formülasyonun eriyik haline gelmesine rağmen DSC analizleri ve enkaspsülasyon etkinliği sonuçları değerlendirildiğinde etken maddenin kompleks içindeki amorf yapının devam etmesi ve etken madde miktarında da anlamlı değişiklik olmaması nedeniyle salım profili incelenmiştir.

Belirtilen ortamlarda saklanan formülasyonların salım profilleri, ideal formülasyonun (T25) salım profiliyle karşılaştırılmıştır (Şekil 3.27). Ayrıca Bölüm 3.5.8’de anlatıldığı gibi f_1 fark faktörü ve f_2 benzerlik faktörleri hesaplanarak salım profillerinin benzer olup olmadığı tayin edilmiştir.

T25 kodlu formülasyonu referans olarak, stabilite çalışması yapılan formülasyonlar test olarak kabul edilip bulunan sonuçlara göre elde edilen f_1 ve f_2 değerleri hesaplanıştır. Çizelge 3.22’de paylaşılmıştır. Bu sonuçlara göre stabilite çalışmasındaki formülasyonların etken madde salım profilleri, sonuç formülasyonun salım profiline benzer bulunmuştur.

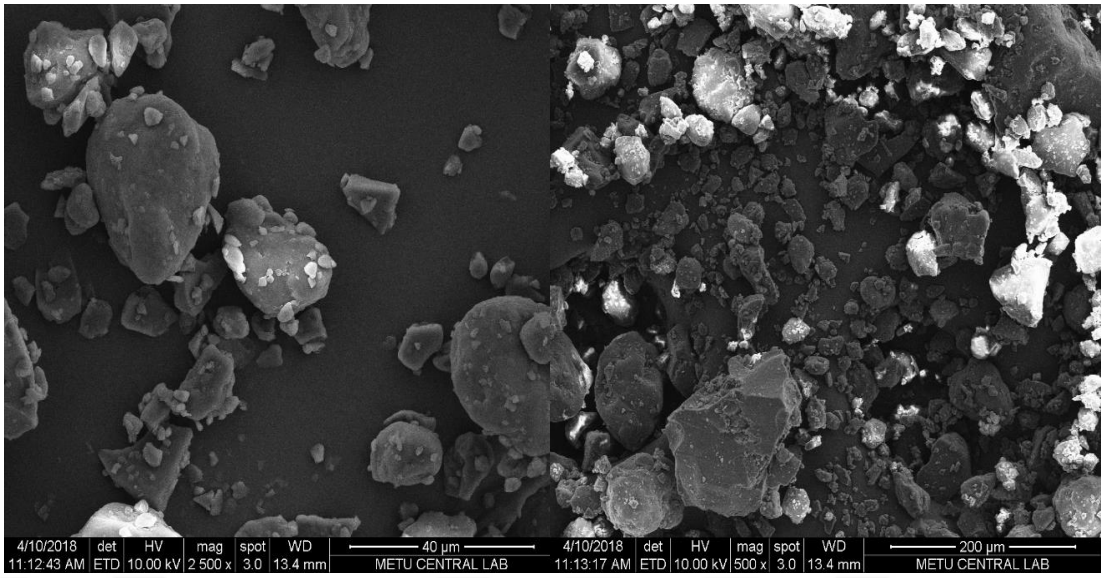
Çizelge 3.22. Stabilite çalışmaları sonunda elde edilen salım profillerinin fark faktörü ve benzerlik faktörü değerleri.

Üçüncü Ay			
25°C ± 2 °C/%60±5 BN		**5°C ± 3 °C**	
f1	f2	f1	f2
8,18	79,71	6,41	81,58



Şekil 3.27. T25 kodlu formülasyonun başlangıçtaki ve stabilite çalışmaları sonundaki etken madde salım profillerinin karşılaştırması (Ortalama±standart hata, n=3).

Hazırlanan tüm berberin-fitozomlarının oldukça yapışkan özellikte olduğu ve sıcaklık ve nem koşullarından kolayca etkilenerek eriyik haline geçme eğiliminde olduğu görüldüğü için en son aşamada berberin-fitozomlarının, silika ile karıştırılarak daha akıcı ve ortam şartlarına daha dayanıklı hale getirilmesi düşünülmüştür. Bu nedenle formülasyona % 20 oranında silika ilave edilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Bu hazırlanan yeni karışımın sadece Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri elde edilmiştir. Görüntüler Şekil 3.28'da verilmiştir.



Şekil 3.28. T25 kodlu formülasyona % 20 oranında silika ilave edildikten sonra elde edilen SEM görüntüleri.

4. TARTIŞMA

4.1. Berberin Üzerinde Yapılan Çalışmalara ait Bulguların Değerlendirilmesi

Berberinin FTIR çalışmasından elde edilen spektrum (Şekil 3.1) etken maddenin açık formülüyle karşılaştırıldığında, belirleyici kimyasal grupları ifade eden absorpsiyon bantlarının çekilen FTIR spektrumunda da yer aldığı saptanmıştır. Belirleyici kimyasal grupları karakterize eden 1.504 cm^{-1} ve 1.598 cm^{-1} te ortaya çıkan absorpsiyon pikleri tespit edilmiştir. 1.504 cm^{-1} furil grubunu temsil ederken, 1.567 cm^{-1} deki band aromatik C=C bağlarını tanımlamaktadır. 1.598 cm^{-1} deki band ise molekül içindeki çifte bağı temsil eden (C=H+) iminiuma karşılık gelmektedir. Yapılan literatür incelemeleri (Battu ve ark., 2010) sonucunda da berberine ait belirleyici kimyasal gruplarını ifade eden absorpsiyon bantlarının hemen hemen aynı yerlerde (1.506, 1.569 ve 1.635 cm^{-1}) olduğu görülmüştür.

DSC, kristal halindeki maddelerin erime noktaları, amorf maddelerin camsı geçiş sıcaklıkları, erime ısıları gibi pek çok fizikokimyasal özelliğini belirlemek için kullanılan önemli bir termal analizdir. Test örneği ile referansı aynı sıcaklıkta tutmak için gerekli enerjinin ölçülmesi esasına dayanır. Etken maddenin saflık, polimorfizm, çözünme, bozunma gibi analizlerinde, formülasyonlarda ise yardımcı maddelerle oluşan geçimsizlik çalışmalarında DSC yaygın olarak kullanılır. Şekil 3.2'de verilen berberinin DSC termogramında 126ºC karşılık gelen ilk pikin dehidrasyon piki olduğu, 188 ºC'de görülen endotermik pikin maddenin katı durumdan sıvı faza geçmesini tanımlayan bir pik olduğu 198°C'deki eksotermik pikin ise etken maddenin kristal trasformasyon piki olduğu görülmektedir. Bu piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Battu ve ark., 2010).

UV Spektrofotometre ile yapılan çalışmada berberinin su içindeki λmax değerleri 340 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve bu doğruya ait veriler Şekil 3.3 ve Çizelge 3.1'de verilmiştir.

UV Spektrofotometre ile yapılan çalışmada berberinin pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisindeki λmax değerleri 345 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve bu doğruya ait veriler Şekil 3.4 ve Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Berberinin λmax değer, The Merck Index'te 265 nm ve 343 nm olarak verilmiştir (O'Neil ve ark., 2001).

HPLC analizleri 346 nm'de gerçekleştirilmiş,berberinin retansiyon zamanı 3,846 dakika olarak bulunmuştur. Bu yöntem için yapılan analitik validasyon çalışmasında doğruluk ve geri elde değerlendirmesinde hesaplanan % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri kalibrasyonda %2'nin altında bulunmuştur. Bu miktar tayini yöntemlerinin doğruluğunu göstermektedir. Analitik yöntemin kesinliğini incelemek amacıyla yapılan deneylerde asetonitril ortamında yine %2'nin altında olan %BSS değerleri yöntemin tekrarlanabilir olduğunu ifade etmektedir.

Analitik validasyon parametreleri incelendiğinde berberinin miktar tayini için kullanılan analitik yöntemin sağlamlığı, doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği ispat edilmiştir (Çizelge 3.3 - Çizelge 3.9). Kullanılan diğer maddelerle ve çözücülerle berberin pikinin HPLC'de hiçbir girişim yapmaması da yöntemin özgünlüğünü göstermektedir.

Spektrofotometre kullanılarak yapılan çözünürlük değerleri Çizelge 3.12'te gösterilmiştir. Su içindeki çözünürlük değerlerinin pH 6,8 tamponunkinden daha fazla olduğu görülmektedir. Literatür bilgileri değerlendirildiğinde berberinin 25°C'taki sudaki çözünürlüğü $1,96 \pm 0,11$ mg/mL ve pH 7,0 fosfat tamponundaki çözünürlüğü ise yaklaşık 4 mMol (1,488 mg/mL) olarak saptanmıştır. Fosfat tamponundaki çözünürlüğünün artmasının daha çözünür bir kompleks oluşmasına yol açan bir etkileşim nedeniyle gerçekleştiği belirtilmektedir (Battu ve ark., 2010).

Tez çalışmamızda, sıcaklığın 25°C den 37°C 'ye yükselmesiyle berberinin çözünürlüğünün %72'lik artış gösterdiği literatürde bu artışın %62 olarak gerçekleşmiştir. Bu sıcaklığa bağlı çözünürlük artışın, berberinin çözünmesi sırasında gerçekleşen kinetik olaylar sırasında gözlenen ekzotermik enerjinin endotermik enerjiye kıyasla daha düşük olmasına bağlanabilir. Bu nedenle, daha yüksek sıcaklıkta, bağların daha fazla kırılması için sisteme fazla miktarda ısı enerjisi sağlar ve berberinin çözünürlüğünün artmasını kolaylaştırır (Battu ve ark., 2010).

4.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.2.1. Berberin-Fitozomlarının Hazırlanmasına Yönelik Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Berberin-fitozomları üç farklı yöntem kullanılarak hazırlanmıştır: "İnce Film Oluşturma Yöntemi (Bangham)", "Etanol Enjeksiyon Yöntemi" ve "Ters Faz Buharlaşma Yöntemi". Bu yöntemlerin uygulanmasında; berberin:fosfolipit oranı (a/a), reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi kritik parametreler olarak belirlenmiş, fitozomların bu parametreler üzerinden, herbir yöntem için üç farklı koşulda hazırlanarak incelenmesi kararlaştırılmıştır. Zhang ve arkadaşlarının (2014), berberin-fitozom kompleks, d-α-tokoferol polietilen glikol 1000 süksinat (TPGS 1000) ve SiO_2'ten oluşan bir katı dispersiyon oluşturdukları çalışmada; önformülasyon aşamasında, etken madde:fosfolipit oranı, reaksiyon ortamı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi parametrelerinin fitozom oluşumu üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Zhang ve ark., 2014).

"İnce Film Oluşturma Yöntemi (Bangham)" kullanılarak elde edilen fitozomların partikül büyüklükleri ve enkapsülasyon etkinliği incelendiğinde, anlamlı değerlerin elde edilememesi, sapmaların fazla olması, yöntemin zor ve veriminin de düşük olması nedeniyle kullanılmasından vazgeçilmiştir.

“Etanol Enjeksiyon Yöntemi” ile yapılan denemeler sonucunda fitozom elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 3.14). Elde edilen fitozomal yapı mikroskopta da incelenmiştir (Şekil 3.15). Mikroskop görüntüsünde brownian hareketi yapan veziküler partiküller gözlenmiştir. Partiküller sürekli titreşim halinde hareket ettiklerinden çok net görüntüler elde edilememekle beraber, elde edilen veziküler yapıların mikrometre boyutunda olduğuna işaret etmektedir.

“Ters Faz Buharlaşma Yöntemi” kullanılarak hazırlanan önformülasyon çalışmalarının da olumlu olması üzerine, bu yöntemin de formülasyon hazırlamak için uygun olduğuna karar verilmiştir.

Önformülasyon çalışmalarında, reaksiyon sıcaklığının fitozom oluşumunda önemli bir parametre olduğu gözlenmiştir. Reaksiyon sıcaklığı 40°C, 50°C ve 60°C’de 1:5 oranında berberin:fosfolipit içeren önformülasyonlar hazırlanarak, polidispersite indeksi, enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü analizleri yapılmıştır.

Her iki yönteme ait önformülasyon sonuçları değerlendirildiğinde (Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14), etanol enjeksiyon yönteminde hem partikül boyutunun daha küçük hem de yükleme etkinliğinin daha az olduğu görülmüştür. Buna karşılık ters faz buharlaşma yönteminde ise her iki sonucun da daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Bu bilgiler doğrultusunda yükleme etkinliğini artırmak ve partikülleri daha küçük hale getirmek için aşağıda yer alan parametrelerinin tümünün her iki yöntem içinde denenmesine karar verilmiştir. Formülasyon çalışmalarında toplam olarak 27’şer formülasyon hazırlanmıştır.

4.2.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16'de sırasıyla etanol enjeksiyon ve ters faz buharlaştırma yöntemleri ile hazırlanan formüllasyonlara ait zeta potansiyel, ortalama partikül çapı, polidispersite indeksi ve yükleme etkinliğine ait sonuçlar yer almaktadır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde ön formülasyon sonuçlarında olduğu gibi ters faz buharlaştırma yöntemi kullanılarak elde edilen formülasyonların yükleme etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Etanol enjeksiyonun yönteminde ise etanol içeren fosfolipit çözeltisinin etken madde çözeltisine ilavesi sırasında bir miktar etanolün ortamdan uzaklaşması sonucu fosfolipitin çözünürlüğünün azalarak ortaya çıkması nedeniyle fitozom oluşması azalabilir ve buna bağlı olarak enkapsülasyon etkinliği düşük olabilir. Buna ilaveten, her iki yöntemin de ortalama partikül çapı ve polidisperse indeksi üzerine anlamlı bir etkilerinin olmadığı görülmektedir.

4.3. QbD Yaklaşımla İdeal Formülasyonun Belirlenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

QbD yaklaşımında kritik kalite özelliği (CQA) olarak; zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve enkapsülasyon etkinliği (EE); kritik materyal özellikleri (CMA) ve kritik proses parametreleri (CPP) olarak ise; sıcaklık, reaksiyon süresi, karışım oranı belirlenmiştir.

QbD tasarım modelinde MODDE Pro programı kullanılmıştır. MODDE Pro programı yapılan çalışmalar arasında en ideal olanı bulan bir programdır. MODDE Pro programı kullanılarak daha önceden belirlenen CQA, CMA ve CPP'lere göre program full factorial design ile 27 farklı formülasyon önermiştir.

Etanol enjeksiyon yönteminin, MODDE Pro programı kullanılarak değerlendirilmesi sonunda bulunan formülasyon EModd koduyla yer almaktadır. Bu yöntem içersinde EModd formülasyonuna en fazla benzerlik gösteren formülasyon E18 kodlu olanıdır (Çizelge 3.17). E18 kodlu formülasyonu Emodd formülasyonu ile karşılaştırıldığında partikül büyüklüğünün yaklaşık %50 daha büyük olduğu görülmüştür Ayrıca söz formülasyonun yükleme etkinliği düşük (%38,10) bulunmuştur.

Ters faz buharlaşma yönteminin MODDE Pro programı kullanılarak değerlendirilmesi sonunda bulunan formülasyon TModd koduyla yer almaktadır. Bu yöntem içersinde TModd formülasyonuna en fazla benzerlik gösteren formülasyon T25 kodlu olandır (Çizelge 3.18). Bu formülasyonun yükleme etkinliği % 51,31 partikül büyüklüğü ise 632 nm bulunmuştur. Bu formülasyon söz konusu yöntem içinde en yüksek yükleme etkinliğine sahip olmamakla birlikte partikül büyüklüğü açısında bu grup içinde ortalama bir değerde olduğu tespit edilmiştir.

E18 ve T25 kodlu formülasyonlara ait sonuçlar (Çizelge 4.1) karşılaştırıldığında T25 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğünün daha küçük olması (632,4 ±0,707) ve yükleme etkinliğinin daha yüksek olması nedeniyle T25 kodlu formülasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.1. E18 ve T25 kodlu formülasyonlara ait sonuçlar.

For. kodu	**Sıcaklık (°C)**	**Reaksiyon Süresi (Saat)**	**Karışım Oranı (B:F)**	**Zeta Potansiyel (mV±SS)**	**Partikül büyüklüğü (nm±SS)**	**PDI (Ort±SS)**	**EE (%)**
E18	50	3	1:7	-5,03±0,1	1.279±0,523	0,274±0,007	38,10
T25	60	1	1:7	-4,28 ±0,1	632,4 ±0,707	0,5 ±0,011	51,31

EE: Enkapsülasyon etkinliği, For.: Formülasyon, PDI: Polidispersite indeksi, SS: Standart sapma.

QbD yaklaşımı ile bitkisel ekstre ya da doğal bileşiklerden fitozomların hazırlanmasına dair az sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Ittadwar ve ark., 2018; Nandhini ve Ilango, 2021; Saudagar ve ark., 2021). Söz konusu çalışmalarda

reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi arasında doğrusal, etkin madde/fosfolipit oranının ise ters orantılı ilişkileri olduğu tespit edilmiş ve QbD yaklaşımı ile tespit edilen formülasyonlar ile karekterizasyon çalışmları yapılmış ve partisyon katsayısı sonuçları etkin madde ile kıyaslanmıştır. Tez çalışmamızda hazırlanan formülasyonlarda da litetür verileri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Qbd yaklaşımla elde edilen T25 kodlu formülasyon ile üretim tekrarlanabilirliği, formülasyonun SEM, DSC analizi, FTIR analizi ve etken madde salım çalışması yapılmıştır. Etken maddenin FTIR spektrumu Şekil 3.16'da, fosfolipite ait olan spektrum Şekil 3.17'de, fiziksel karışımına ait olan Şekil 3.18'de ve berberin-fitozomuna ait olan spektrum Şekil 3.19'da verilmiştir.

Fosfolipite ait olan FTIR spektrumunda (Şekil 3.17), 1.733 cm^{-1}, 1.234 cm^{-1} ve 1.064 cm^{-1} deki pikler bu maddeyi karakterize eden absorpsiyon pikleridir. Fiziksel karışımın spektrumunda (Şekil 3.18) ise etken madde ve fosfolipite ait pikler görülmektedir. Yeni bir pike rastlanılmamıştır.

Berberin-fitozom spektrumunda (Şekil 3.19), berberine ait 1.598 cm^{-1} deki pik kaybolmuştur; 1.504 cm^{-1} deki ise zayıflamıştır. Bu sonuçlar berberine ait benzen halkasında bazı değişimlerin olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte fosfolipitin polar kısmını gösteren 1.733 cm^{-1} deki pikin 1.239 cm^{-1} a kaydığı görülmektedir. Ancak fosfolipitin karbon-hidrojen zincirlerinde değişiklik bulunmamaktadır.

Tüm bu gözlemlerden yeni bir kimyasal bağlanmanın oluşmadığını, ancak berberinin benzen halkası ve fosfolipitin polar başı arasında kompleks oluşturmak üzere bazı fiziksel etkileşimlerin olduğu söylenebilir. Bu durumda hazırladığımız kompleksin fitozom tanımına uyduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar, literatür verileriyle karşılaştırılmış; ufak farklılıklar göstermekle beraber paralellik gösterdiği sonucuna varılmıştır (Yu ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2014).

DSC kullanılarak çekilen berberinin, fosfolipitin, fiziksel karışımın ve berberin-fitozomunun termal analizleri aynı termogram üzerinde karşılaştırmalı olarak Şekil 3.20'de sunulmuştur.

Şekil 3.20'de berberinin 125°C karşılık gelen ilk pikin dehidrasyon piki olduğu, 188°C'de görülen endotermik pikin maddenin katı durumdan sıvı faza geçmesini tanımlayan bir pik olduğu 198°C'deki eksotermik pikin ise etken maddenin kristal trasformasyon piki olduğu görülmektedir. Fosfolipitin sıvı kristal formuna geçtiğini gösteren 2 adet (132 ve 156°C) piki mevcuttur. Fiziksel karışımda küçük kaymalar olsa da her iki maddenin de pikleri (130 ve 203°C) gözlenmektedir. Fitozoma ait termogramında berberinin piklerinin tamamen kaybolduğu görülmektedir. Bu sonuçta etken maddemizin fitozomun içinde amorf forma dönüştüğünü göstermektedir. Berberin-fitozom formülasyon deneylerinin yapıldığı iki farklı çalışmada, oluşan fitozomların DSC analizlerinin gerçekleştirilmiş ve her iki çalışmada, tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçla uyumlu şekilde; saf berberinin endotermik pikinin kaybolduğu, berberinin amorf hale geçtiği sonucuna ulaşılmıştır (Yu ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2014).

SEM görüntüleri hem berberin hem de QbD yaklaşımla belirlenen formülasyon üzerinden yapılmıştır. Şekil 3.5'de etken madde görüntüleri bulunmaktadır. Çubuk şeklinde bir kristal yapıya sahiptir. Şekil 3.21'de ise berberin-fitozomu görülmektedir. Yapının toz halde olmadığı ve berberinin kristal yapısının tamamen kaybolduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz görüntülerin Yu ve arkadaşları (2016), berberin-fitozom formülasyon çalışmasılarında verilen SEM görüntüleri ile uyumlı olduğu sonucuna varılmıştır (Yu ve ark., 2016).

Çizelge 3.19'da verilen partisyon katsayısı sonuçları değerlendirildiğinde partisyon katsayısınının değerlerinin ortamda fosfolipit bulunmasıyla gittikçe artarak fitozomlarda en yüksek miktara ulaştığı görülmektedir. Yani fosfolipit ilavesiyle yağda çözünürlüğün arttığı görülmektedir. Fitozomlarda bu değerin 1'in üzerine çıkmasıyla etken maddenin lipofilik özellik kazandığı görülmektedir. Bu durumda

hem berberin ve fosfolipit arasında oluşan moleküller arası kuvvetler ve hem de fosfolipitin güçlü lipofilik özelliği nedeniyle gerçekleştiği söylenebilir.

Elde ettiğimiz sonuçlar literatür verileriyle paralellik göstermekle beraber küçük farklılıklar olduğu; bu farklılıkların fitozom hazırlama yönteminin ve berberin:fosfolipit oranlarının farklılığından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Zhang ve ark., 2014).

Çalışmalara QbD yaklaşlaşımla ideal formülasyon olarak belirlenen T25 kodlu formülasyonun tekrar üretilmesi ile devam edilmiştir. Sekiz kere üretim yapılarak zeta potansiyel, ortalama çap, polidispersite indeksi (PI) ve yükleme etkinliği değerlendirilmiştir. Çizelge 3.20'de sonuçlar sunulmuştur. Ortalama enkapsülasyon etkinliği 51,85±1,36 (n=8) olarak tespit edilmiştir.

T25 kodlu formülasyondan 25 mg berberine eşdeğer oranda berberin-fitozomu ve saf berberin kullanılarak yapılan etken madde salım çalışmaları karşılaştırmalı olarak sunulduğunda (Şekil 3.22), berberinin salımı üçüncü saatte tamamen biterken berberin-fitozomundan etken maddenin salımının altıncı saatte %60'ının gerçekleştiği görülmektedir. Etken maddenin tampondaki çözünürlüğü nedeniyle pH 6,8 fostat ortamında tamamen açığa çıkarak çözünme hızı %100'e ulaşmıştır. Oysa ki etken madde fosfolipit ile birlikte bir kompleks oluşturduğunda, partisyon katsayısı sonuçlarından da görüldüğü gibi sudaki çözünürlüğünü kaybederek lipofilik hale geçmesi nedeniyle pH 6,8 fostat ortamındaki salımı altıncı saatte ancak %60'lara çıkmıştır. Bu da etken maddenin fitozom yapısından dolayı yağda çözünürlüğünün arttığının bir göstergesidir.

Yu ve arkadaşlarının (2016) gerçekleştirdiği berberin-fitozom kompleksinin *in vitro* etken madde salım çalışmasında simüle intestinal sıvı ortamında 6 saat sonra berberinin salınımının yaklaşık %40'ının gerçekleştiği belirtilmiştir (Yu ve ark., 2016). Tez çalışmamızda bu değer %60 olarak bulunmuştur.

Piyasada gıda takviyesi kapsamında bulunan Tarım Bakanlığı'ndan ruhsatlı piyasa preparatının salım profili incelendiğinde ise, doksanıncı dakikada %100'ün çıktığı görülmektedir (Şekil 3.23). Berberinin piyasa preparatı içerisinde klasik tablet formunda bulunduğunu göstermektedir.

Stabilite sonuçlarına (Çizelge 3.21) yönelik bulgular değerlendirildiğinde formülasyonun 25°C ± 2°C / %60±5 bağıl nem ortamında ilk haftalardan itibaren formülasyonda yumuşama ve erime görülürken 5°C ± 3°C için buzdolabında fitozomun ise ilk günkü görünüş özelliğini korumuştur. Bunun üzerine formülasyonların her iki koşulda da partikül yüzey analizlerini incelenmesi için SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 3.24'de (25°C ± 2°C / %60±5 BN) eriyik yapı belirgin şekilde gözlenirken, Şekil.3.25'de (5°C ± 3°C) bu saklama koşulunda fitozomal yapının özelliğini koruduğu görülmektedir.

25°C ± 2°C / %60±5 BN ve 5°C ± 3°C 'deki stabilite koşullarına tabi tutulan T25 kodlu formülasyona ait DSC termogramları (Şekil 3.26) incelendiğinde, etken maddenin kristal yapısını tanımlayan piklerin her iki stabilite koşulunda saklanan formülasyonlar da bulunmamıştır. Yani etken maddenin amorf yapısını koruduğu görülmektedir. Formülasyonlarda görünen bazı küçük piklerin fosfolipite ait olduğu fosfolipitin termogramıyla karşılaştırıldığında anlaşılmaktadır.

Belirtilen ortamlarda saklanan formülasyonların salım profilleri, başlangıçtaki salım profiliyle karşılaştırılmıştır (Şekil 3.27). Ayrıca f_1 fark faktörü ve f_2 benzerlik faktörleri hesaplanarak salım profillerinin benzer olup olmadığı tayin edilen ve Çizelge 3.25'de paylaşılan sonuçlara göre f1 değerleri 15'den küçük ve f2 değerleri de 50'den büyük olduğu için; stabilite çalışmasındaki formülasyonların etken madde salım profillerinin, başlangıçtaki formülasyonun salım profiline benzer olduğu bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda bitkisel kökenli etken maddelere ilgi giderek artmaktadır. Ancak bu etken maddelerin yapılarında yeralan bazı grupları nedeniyle sıklıkla çözünürlük, absorpsiyon ve biyoyararlanım sorunları karşımıza çıkmaktadır. Bitkisel kökenli etken maddelerle hazırlanan ticari prepartların hemen hemen %90'nın ilaç olarak ruhsatlandırılmaması nedeniyle klinik çalışmaları mevcut değildir. Bu problemlerle ilgili çözüm önerileri de bulunmamaktadır. Son yıllarda, lipozom, nanopartikül gibi nano ilaç taşıyıcı sistemler ile bitkisel moleküllerin biyoyararlanımı artırmak ve hedefleme yapmak amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Fakat bu sistemlerin ilaç endüstrisine uygulanabilirliği çok da mümkün olamamıştır. Fitozomlar ile yapılan çalışmalar ise hızla endüstriye aktarılmış ve aktarılmaktadır. Berberin fitoaktif bileşiği yağda çözünürlüğü zayıf, molekül ağırlığı yüksek bir maddedir. Yapılan çalışmalarda da biyoyararlanımının oldukça düşük olduğu belirtilmiştir. Antiromatizmal analjezik, antipiretik aktivitesi üzerinde de çalışmalar mevcuttur. Berberinin fosfolipit ile kompleks haline getirilerek ilaç taşıyıcı sistem olarak fitozomların değerlendirilen çalışmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Fitozom oluştururken ortam sıcaklığı ve etken madde fosfolipit oranının önemli olduğu görülmüştür. Uygulanan yöntemin kolay olmasının önemi de büyük çaptaki üretim düşünüldüğünde ön plana çıkmaktadır.

- Hazırlanan fitozomların etken maddenin sudaki çözünürlüğünü azaltarak lipofilisitesini arttırdığı bulunmuştur.

- QbD tasarım modelinin formülasyon seçiminde önemli bir parametre olduğu görülmüştür. QbD modelleme sonucunda T25 kodlu formülasyonun kullanılması uygun bulunmuştur.

- Formülasyonumuzun 5°C±3°C'de ve 25°C±2°C/%60±5 bağıl nem ortamındaki saklama koşullarında stabil kaldığı görülmüştür. Ancak 25°C±2°C/%60±5 BN ortamında fiziksel olarak değişime uğraması nedeniyle kompleks şekli ile saklama koşulunun 5°C±3°C olmasının uygun olacağı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar ışığında aşağıda belirtilen çalışmaların yapılması önerilmektedir:

- Öncelikle hazırlanan fitozomun fiziksel dayanıklılığını artırmaya dayanan çalışmalara öncelik verilmesi,
- Fitozomların çeşitli taşıyıcılarla karıştırılarak kapsül formu içinde veya tablet şeklinde hazırlanmasına yönelik çalışmaların yapılması.

ÖZET

Bitkisel Kökenli Etken Madde Taşıyıcı Sistem Olarak Fitozomların Hazırlanması, Tasarımla Kalite Çalışmaları ve Değerlendirilmesi

Bitkisel kaynaklı etken maddelerin modern tedaviye aktarılması giderek yaygınlaşmaktadır. Fakat bu etken maddelerin önemli bir bölümü, gastrointestinal mukozadan veya deriden pasif difüzyonla emilime engel teşkil eden uzun yan zincirlere ve yüksek polariteye sahiptir. Bitkisel kökenli ilaç molekülleri ve doğal fosfolipidlerinin kompleksleştirilmesiyle oluşturulan, "fito-fosfolipid" veya "fitozom" olarak adlandırılan kompleksleştirme tekniği ile hücre zarına benzeyen yapılar oluşturularak, absorbsiyonu kolaylaştırmak ve biyoyararlanımı artırmak mümkün olmaktadır.

Bu tez kapsamında, literatürde absorbsiyonu ve biyoyararlanımı düşük olarak bildirilen, ancak farklı aktiviteleri değişik araştırmacılar tarafından ortaya konulan berberin molekülünün, ilaç taşıyıcı sistem olarak fitozomlarının hazırlanması, karakterizasyonunun yapılması, istenilen özellikleri de içeren fitozomların tasarımla kalite (QbD) yaklaşımı ile değerlendirilip uygun formülasyonun seçilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda "İnce Film Oluşturma (Bangham)", "Etanol Enjeksiyon" ve "Ters Faz Buharlaşma" yöntemleri kullanılarak ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, partikül büyüklükleri ve enkapsülasyon etkinliği parametrelerinin anlamlı sonuç vermemesi, sapmaların fazla olması ve düşük verimli olması nedeniyle "İnce Film Oluşturma (Bangham)" yöntemi elenmiştir. "Etanol Enjeksiyon" ve "Ters Faz Buharlaşma" yöntemleri kulanılarak, berberin:fosfolipit oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi parametrelerinde değişiklikler yapılarak 27'şer farklı formülasyon hazırlanmış, MODDE Pro programına kritik kalite özellikleri olarak zeta potansiyeli, partikül yarıçapı, polidispersite indeksi, yükleme etkinliği; kritik materyal özellikleri ve kritik proses parametreleri olarak sıcaklık, reaksiyon süresi, karışım oranı değerleri girilerek program tarafından optimum formülasyon parametreleri önerilmiştir. Bu parametrelere en yakın formülasyonların E18 ve T25 kodlu formülasyonlar olduğu belirlenmiştir. İki formülasyon arasından ise çalışmalara yükleme etkinli en yüksek olan T25 kodlu formülasyonundan devam edilmiştir. T25 kodlu formülasyon üzerinde etken madde salım, partisyon katsayısı, üretim tekrarlanabilirliği ve stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak doğal kaynaklı berberin etken maddesinin optimum formülasyonu belirlenmiş, karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Hazırlanan fitozomun fiziksel dayanıklılığını artırmaya dayalı ve çeşitli taşıyıcılarla karıştırılarak kapsül veya tablet formunda hazırlanmasına yönelik çalışmaların ileride gerçekleştirilmesi formülasyonun geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Berberin, Fitozom, İlaç taşıyıcı sistem, Tasarım ile kalite (QbD),

SUMMARY

Preparation Of Phytosomes as Drug Carrier System of Plant Origin, Quality by Design Studies and Evaluation

The use of active substances derived from plants in modern medicine is becoming more prevalent. However, most of these active ingredients have long side chains and high polarity, which hinder absorption by passive diffusion from the gastrointestinal mucosa or skin. By producing cell membrane-like structures with the complexing technique known as "phyto-phospholipid" or "phytosome," which is generated by the complexation of herbal medicine molecules and natural phospholipids, it is possible to facilitate absorption and boost bioavailability.

Within the scope of this thesis, it is aimed to prepare and characterize phytosomes of the berberine molecule, which has been reported to have low absorption and bioavailability in the literature, but whose various activities have been revealed by numerous researchers, as a drug carrier system, to evaluate the phytosomes including the desired properties using the quality by design (QbD) approach and to select the appropriate formulation. In this direction, preformulation investigations were carried out using "Thin Film Formation (Bangham)", "Ethanol Injection" and "Reverse Phase Evaporation" methods. Because the particle sizes and encapsulation efficiency parameters did not give significant results, the variations were substantial, and the yield was low, the "Thin Film Formation (Bangham)" method was eliminated. By using "Ethanol Injection" and "Reverse Phase Evaporation" methods, 27 different formulations were prepared by making changes in the parameters of berberine:phospholipid ratio, reaction temperature and reaction time. The optimum formulation was suggested by the MODDE Pro program by entering: zeta potential, particle radius, polydispersity index, loading efficiency as critical quality features; the temperature, reaction time, and mixing ratio values as critical material properties and critical process parameters features. It was determined that the formulations closest to these parameters were E18 and T25 coded formulations. Among the two formulations, studies were continued with the T25 coded formulation with the highest loading efficiency. Drug release, partition coefficient, production reproducibility and stability studies were carried out on the formulation coded T25 as the ideal formulation among the formulations that best matched this formulation among the optimum formulations and methods. As a result, the optimum formulation of the active ingredient of natural origin berberine was determined and characterization studies were completed. Further studies on increasing the physical strength of the prepared phytosome and its preparation in capsule or tablet form by mixing with various carriers will contribute to the development of the formulation.

Key Words: Berberine, Drug carrier system, Phytosome, Quality by design (QbD)

KAYNAKLAR

AGARWAL A, CHAKRABORTY P, CHAKRABORTY DD, SAHARAN VA (2012). Phytosomes: Complexation, Utilisation and Commerical Status. *J Biol Act Prod from Nat*, **2**: 65–77.

AJAZUDDIN, SARAF S (2010). Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*, **81**: 680–689.

AKSU B (2013). İlaçta Kalite Tasarımı (QbD) ve İlgili Yasal Düzenlemeler. Neta Matbaacılık.

AKSU B, PARADKAR A, DE MATAS M, ÖZER Ö, GÜNERI T, YORK P (2013). A quality by design approach using artificial intelligence techniques to control the critical quality attributes of ramipril tablets manufactured by wet granulation. *Pharm Dev Technol*, **18**: 236–245.

AKSU B, YEGEN G (2014). New quality concepts in pharmaceuticals. *J Marmara Univ Inst Heal Sci*, **4**: 1.

ALAM MA, AL-JENOOBI FI, AL-MOHIZEA AM (2013). Commercially bioavailable proprietary technologies and their marketed products. *Drug Discov Today*, **18**: 936–949.

AMIT P, TANWAR YS, RAKESH S (2013). Phytosome : Phytolipid Drug Dilivery System for Improving Bioavailability of Herbal Drug. *J Pharm Sci Biosci Res*, **3**: 51–57.

BAGADE OM, KHADE A, TATHE R, DHAMALE M, SABLE M (2017). Phytosome: A novel drug delivery system in the middle of improved bioavailability. *Int J Pharm Drug Anal*, **5**: 411–418.

BARANI M, SANGIOVANNI E, ANGARANO M, RAJIZADEH MA, MEHRABANI M, PIAZZA S, GANGADHARAPPA HV, PARDAKHTY A, MEHRBANI M, DELL'AGLI M, NEMATOLLAHI MH (2021). Phytosomes as innovative delivery systems for phytochemicals: A comprehensive review of literature. *Int J Nanomedicine*, **16**: 6983–7022.

BATTU SK, REPKA MA, MADDINENI S, CHITTIBOYINA AG, AVERY MA, MAJUMDAR S (2010). Physicochemical characterization of berberine chloride: A perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*, **11**: 1466–1475.

BHAGYASHREE HAP (2015). Phytosome as a novel biomedicine: A microencapsulated drug delivery system. *J Bioanal Biomed*, **07**.. doi:10.4172/1948-593x.1000116.

BHARTI AC, RAJAN P, JADLI M, PANDE D, SINGH T, BHAT A (2018). Berberine as an adjuvant and sensitizer to current chemotherapy. *Role Nutraceuticals Chemoresistance to Cancer*,: 221–240.

BHATTACHARYA S (2009). Phytosomes: Emerging strategy in delivery of herbal drugs and nutraceuticals. *Pharma Times*, **41**: 9–12.

BIRDSALL TC (1997). Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev*, **2**: 94–103.

BOMBARDELLI E, PATRI GF (1992). 5043323 Complex compounds of bioflavonoids with phospholipids,

their preparation and use, and pharmaceutical and cosmetic compositions containing them. *Gen Pharmacol Vasc Syst*, **23**: xxxi.

CHANGEDIYA V, KHADKE M, DEVDHE S (2011). Phytosomes: New approach for delivering herbal drug with improved bioavailability. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, **2**: 57–68.

CHEN W, MIAO YQ, FAN DJ, YANG SS, LIN X, MENG LK, TANG X (2011). Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech*, **12**: 705–711.

CHEN ZP, SUN J, CHEN HX, XIAO YY, LIU D, CHEN J, CAI H, CAI BC (2010). Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of *Ginkgo biloba* extracts, *Ginkgo biloba* extract phospholipid complexes and *Ginkgo biloba* extract solid dispersions in rats. *Fitoterapia*, **81**: 1045–1052.

COHN JS, WAT E, KAMILI A, TANDY S (2008). Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, **19**: 257–262.

COSTA P, SOUSA LOBO JM (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, **13**: 123–133.

DAS MK, KALITA B (2014). Design and evaluation of phyto-phospholipid complexes (Phytosomes) of rutin for transdermal application. *J Appl Pharm Sci*, **4**: 51–57.

DOMITROVIĆ R, CVIJANOVIĆ O, PERNJAK-PUGEL E, ŠKODA M, MIKELIĆ L, CRNČEVIĆ-ORLIĆ Ž (2013). Berberine exerts nephroprotective effect against cisplatin-induced kidney damage through inhibition of oxidative/nitrosative stress, inflammation, autophagy and apoptosis. *Food Chem Toxicol*, **62**: 397–406.

EKŞI G, YILMAZ G, ÖZKAN G, A.M. (2020). 21. Yüzyılda Bitkiler ve İnsan Sağlığı. Eczacılıkta Yenilikler 3. Eds G. Özçelikay, İ. Yıldız. Ankara Üniversitesi Basımevi. pp 221–232.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) (2017). ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. EMA/CHMP/ICH/167068/2004 Committee for Human Medicinal Products. **8**.. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-11.pdf. Accessed December 22, 2021.

GANDHI A, DUTTA A, PAL A, BAKSHI P (2012). Recent trends of phytosomes for delivering herbal extract with improved bioavailability. *J Pharmacogn Phytochem*, **1**: 6–14.

GARCIA T, COOK G, NOSAL R (2008). PQLI key topics - Criticality, design space, and control strategy. *J Pharm Innov*, **3**: 60–68.

GONG T, ZHANG J, PENG Q, SANJUN SHI, ZHANG Q, SUN X, GONG T (2011). Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) loaded with morin-phospholipid complex. *Int J Nanomedicine*, **6**: 3405.

GUNDERMANN KJ, KUENKER A, KUNTZ E, DROŹDZIK M (2011). Activity of essential phospholipids (EPL) from soybean in liver diseases. *Pharmacol Reports*, **63**: 643–659.

GÜNGÖR-AK A, KARATAŞ A (2020). Fitozom formülasyonundan berberin miktar tayini için HPLC yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonu. *Eurasian J Biol Chem Sci*, **3**: 154–159.

Güvenlik Bilgi Formu - Silika jel 60 (35-70 µm) Flash-Kromatografi için (2021). https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/msds/MDA_CHEM-109389?Origin=PDP. Accessed December 20, 2021.

HIRJI KK (1999). Discovering Data Mining : From Concept to Implementation. Prentice Hall.

IMENSHAHIDI M, HOSSEINZADEH H (2019). Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phyther Res*, **33**: 504–523.

ITTADWAR PA, BHOJNE S V, PURANIK PK (2018). Novel salicin phytosomal complex : Development and and optimization using central composite design. *World J Pharm Res*, **7**: 735–751.

JAIN S, DHANOTIYA C, MALVIYA N (2012). Physicochemical characterization and determination of free radical scavenging activity of rutin-phospholipid complex. *Ijpsr*, **3**: 3.

KARATAŞ A, TURHAN F (2015). Phyto-phospholipid complexes as drug delivery system for herbal extracts/molecules. *Turkish J Pharm Sci*, **12**: 93–102.

KHAN J, ALEXANDER A, SARAF S, AJAZUDDIN, SARAF S (2013). Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. *J Control Release*, **168**: 50–60.

KIDD P, HEAD K (2005). A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: A silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos®). *Altern Med Rev*, **10**: 193–203.

KUMAR AB, HABBU P, THIMMASETTY, LAKSHMAN, HULLATTI P, KUMAR S R (2016). Phytosomes as novel drug delivery system for herbal medicine - A review. *Syst Rev Pharm*, **8**: 5–7.

LAMBERT JD, SANG S, HONG J, KWON SJ, LEE MJ, HO CT, YANG CS (2006). Peracetylation as a means of enhancing *in vitro* bioactivity and bioavailability of epigallocatechin-3-gallate. *Drug Metab Dispos*, **34**: 2111–2116.

LAU CW, YAO XQ, CHEN ZY, KO WH, HUANG Y (2001). Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovasc Drug Rev*, **19**: 234–244.

LEPORE J, SPAVINS J (2008). PQLI design space. *J Pharm Innov*, **3**: 79–87.

LI Y, YANG DJ, CHEN SL, CHEN SB, CHAN ASC (2008). Process parameters and morphology in puerarin, phospholipids and their complex microparticles generation by supercritical antisolvent precipitation. *Int J Pharm*, **359**: 35–45.

LOGUERCIO C, ANDREONE P, BRISC C, BRISC MC, BUGIANESI E, CHIARAMONTE M, CURSARO C, DANILA M, DE SIO I, FLOREANI A, FRENI MA, GRIECO A, GROPPO M, LAZZARI R, LOBELLO S, LOREFICE E, MARGOTTI M, MIELE L, MILANI S, OKOLICSANYI L, PALASCIANO G, PORTINCASA P, SALTARELLI P, SMEDILE A, SOMALVICO F, SPADARO A, SPOREA I, SORRENTINO P, VECCHIONE R, TUCCILLO C, BLANCO CDV, FEDERICO A (2012). Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin e in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Free Radic Biol Med*, **52**: 1658–1665.

LU M, QIU Q, LUO X, LIU X, SUN J, WANG C, LIN X, DENG Y, SONG Y (2019). Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): A novel strategy to improve the bioavailability of active constituents. *Asian J Pharm Sci*, **14**: 265–274.

LU W, KELLY AL, MIAO S (2016). Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Sci Technol*, **47**: 1–9.

MAITI K, MUKHERJEE K, GANTAIT A, SAHA BP, MUKHERJEE PK (2007). Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm*, **330**: 155–163.

MAITI K, MUKHERJEE K, MURUGAN V, SAHA BP, MUKHERJEE PK (2010). Enhancing bioavailability and hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata*, a well-known medicinal food, through its herbosome. *J Sci Food Agric*, **90**: 43–51.

MAZUMDER A, DWIVEDI A, FOX LT, BRÜMMER A, DU PREEZ JL, GERBER M, DU PLESSIS J (2016). *In vitro* skin permeation of sinigrin from its phytosome complex. *J Pharm Pharmacol*, **68**: 1577–1583.

VAN MEER G, DE KROON AIPM (2011). Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci*, **124**: 5–8.

MESUT B, ÖZSOY Y, AKSU B (2015). The place of drug product critical quality parameters in quality by design (QBD). *Turkish J Pharm Sci*, **12**: 75–92.

MODDE® Design of Experiments Solution Design of Experiments DOE (2017). https://www.dynacentrix.com/pdf/Brochure_MODDE12.pdf.

MULHOLLAND PJ, FERRY DR, ANDERSON D, HUSSAIN SA, YOUNG AM, COOK JE, HODGKIN E, SEYMOUR LW, KERR DJ (2001). Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. *Ann Oncol*, **12**: 245–248.

MUNIN A, EDWARDS-LÉVY F (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, **3**: 793–829.

MURUGAN V, MUKHERJEE K, MAITI K, MUKHERJEE PK (2009). Enhanced oral bioavailability and antioxidant profile of ellagic acid by phospholipids. *J Agric Food Chem*, **57**: 4559–4565.

NAIK SR, PANDA VS (2008). Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome® in rifampicin induced liver injurym in rats: Evidence of antioxidant activity. *Fitoterapia*, **79**: 439–445.

NAMJOSHI S, DABBAGHI M, ROBERTS MS, GRICE JE, MOHAMMED Y (2020). Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics*, **12**.. doi:10.3390/PHARMACEUTICS12030287.

NEAG MA, MOCAN A, ECHEVERRÍA J, POP RM, BOCSAN CI, CRISAN G, BUZOIANU AD (2018). Berberine: Botanical Occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular, metabolic, hepatic, and renal disorders. *Front Pharmacol*, **9**: 557.

O'NEIL M (2001). Berberine. *Merck Index—An Encycl Chem drugs, Biol,*: 197.

OLOUMI MM, VOSOUGH D, DERAKHSHANFAR A, NEMATOLLAHI MH (2011). The Healing Potential of *Plantago lanceolata* Ointment on Collagenase-Induced Tendinitis in Burros (*Equus asinus*). *J Equine Vet Sci*, **31**: 470–474.

OTHMAN MS, SAFWAT G, ABOULKHAIR M, ABDEL MONEIM AE (2014). The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food Chem Toxicol*, **69**: 175–181.

PATHAN RA, BHANDARI U (2011). Preparation & characterization of embelin-phospholipid complex as effective drug delivery tool. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, **69**: 139–147.

PLANINŠEK O, KOVAČIČ B, VREČER F (2011). Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int J Pharm*, **406**: 41–48.

PODCZECK F (2008). Aims and Objectives and of Experimental Design and Optimization in Formulation and Process Development. in Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Third Edition: Volume 2: Rational Design and Formulation. Eds L.L. Augsburger, S.W. Hoag. Third Edit. Informa Healthcare Inc. pp 105–135.

POURSALEHI HR, SAMAREH FEKRI M, SHARIFI FAR F, MANDEGARI A, IZADI A, MAHMOODI R, NEMATOLLAHI H, PORGHOLAMHOSEIN F, GHORANI V, SAMAREH FEKRI M (2018). Early and late preventive effect of *Nigella sativa* on the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: An experimental study. *Avicenna J phytomedicine*, **8**: 263–275.

PU Y, ZHANG X, ZHANG Q, WANG B, CHEN Y, ZANG C, WANG Y, DONG TTX, ZHANG T (2016). 20(S)-Protopanaxadiol phospholipid complex: Process optimization, characterization, *in vitro* dissolution and molecular docking studies. *Molecules*, **21**: 1396.

PUBCHEM DATABASE (2016). Berberine | C20H18NO4+ - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/berberine. Accessed December 16, 2021.

QIN X, YANG Y, FAN TT, GONG T, ZHANG XN, HUANG Y (2010). Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of bergenin-phospholipid complex. *Acta Pharmacol Sin*, **31**: 127–136.

RAEISZADEH M, ESMAEILI-TARZI M, BAHRAMPOUR-JUYBARI K, NEMATOLLAHI-MAHANI SN, PARDAKHTY A, NEMATOLLAHI MH, MEHRABANI M, MEHRABANI M (2018). Evaluation the effect of *Myrtus communis* L. extract on several underlying mechanisms involved in wound healing: An *in vitro* study. *South African J Bot*, **118**: 144–150.

RAINA H, SONI G, JAUHARI N, SHARMA N, BHARADVAJA N (2014). Phytochemical importance of medicinal plants as potential sources of anticancer agents. *Turk J Botany*, **38**: 1027–1035.

ROY S (2012). Quality by design : A holistic concept of building quality in pharmaceuticals. *Int J Pharm Biomed Res*, **3**: 100–108.

SAUDAGAR WS, SIDRAM G, BABURO G, SHILPI AGARWAL GA, OMPRAKASH GADGEPPA B (2021). Development and characterization of *Terminalia arjuna* phospholipid complex and its tablet formulation by Qbd approach. *Int J Pharma Bio Sci*, **11**: 14–28.

SCHOLFIELD CR (1981). Composition of soybean lecithin. *J Am Oil Chem Soc*, **58**: 889–892.

SEMALTY A, SEMALTY M, RAWAT MSM, FRANCESCHI F (2010). Supramolecular phospholipids-polyphenolics interactions: The PHYTOSOME ® strategy to improve the bioavailability of phytochemicals. *Fitoterapia*, **81**: 306–314.

SHAKERI A, SAHEBKAR A (2016). Opinion Paper: Phytosome: A Fatty Solution for Efficient Formulation of Phytopharmaceuticals. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, **10**: 7–10.

SHIVANAND P, KINJAL P (2010). Phytosomes: Technical revolution in phytomedicine. *Int J PharmTech Res*, **2**: 627–631.

SIKARWAR MS, SHARMA S, JAIN AK, PARIAL SD (2008). Preparation, characterization and evaluation of Marsupsin-phospholipid complex. *AAPS PharmSciTech*, **9**: 129–137.

SINGH A, SAHARAN VA, SINGH M, BHANDARI A (2011). Phytosome: Drug delivery system for polyphenolic phytoconstituents. *Iran J Pharm Sci*, **7**: 209–220.

SINGH D, S.M. RAWAT M, SEMALTY A, SEMALTY M (2012). Rutin-phospholipid complex: An innovative technique in novel drug delivery system- NDDS. *Curr Drug Deliv*, **9**: 305–314.

SOUMYA S, SAHU D (2017). A review on novel drug delivery system: Microsponges. *Int J Drug Deliv Technol*, **7**: 298–303.

SUNDARESAN N, KALIAPPAN I (2021). Development and characterization of a nano-drug delivery system containing vasaka phospholipid complex to improve bioavailability using quality by design approach. *Res Pharm Sci*, **16**: 103–117.

TAKAYAMA K, FUJIKAWA M, NAGAI T (1999). Artificial neural network as a novel method to optimize pharmaceutical formulations. *Pharm Res*, **16**: 1–6.

TAKAYAMA K, FUJIKAWA M, OBATA Y, MORISHITA M (2003). Neural network based optimization of drug formulations. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**: 1217–1231.

TANAKA T, METORI K, MINEO S, HIROTANI M, FURUYA T, KOBAYASHI S (1993). Inhibitory effects of berberine-type alkaloids on elastase. *Planta Med*, **59**: 200–202.

TING Y, JIANG Y, HO CT, HUANG Q (2014). Common delivery systems for enhancing *in vivo* bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *J Funct Foods*, **7**: 112–128.

TRIPATHY S, PATEL DK, BAROB L, NAIRA SK (2013). A review on phytosomes, their characterization, advancement & potential for transdermal application. *J Drug Deliv Ther*, **3**: 147–152.

UPTON R (2020). *Hydrastis canadensis* (Goldenseal) and Other Berberine-Containing Botanicals. In Textbook of Natural Medicine. Elsevier. pp 648-657.e3.

VIRTANEN JA, CHENG KH, SOMERHARJU P (1998). Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 4964–4969.

VISHAL SAURABH K, KESARI A (2011). Herbosome - -a novel carrier for herbal drug delivery. *Int J Curr Pharm Res*, **3**: 37–41.

VU HTH, HOOK SM, SIQUEIRA SD, MÜLLERTZ A, RADES T, MCDOWELL A (2018). Are phytosomes a superior nanodelivery system for the antioxidant rutin? *Int J Pharm*, **548**: 82–91.

WILDE DJ (1962). Optimization Methods. In Advances in Chemical Engineering. Ed J. Swarbrick. Informa Healthcare. pp 273–332.

YANYU X, YUNMEI S, ZHIPENG C, QINENG P (2006). The preparation of silybin-phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats. *Int J Pharm*, **307**: 77–82.

YILMAZ A, GENÇ Ö, BEKTAŞ S (1997). Enstrümantal Analiz Yöntemleri. İkinci bas. Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

YU F, LI Y, CHEN Q, HE Y, WANG H, YANG L, GUO S, MENG Z, CUI J, XUE M, CHEN XD (2016). Monodisperse microparticles loaded with the self-assembled berberine-phospholipid complex-based phytosomes for improving oral bioavailability and enhancing hypoglycemic efficiency. *Eur J Pharm Biopharm*, **103**: 136–148.

YÜCE M, ÇAPAN Y (2010). Farmasötik Tasarimla kalite: Tasarimla kalite yaklaşımı ve unsurlari Pharmaceutical quality by design: Quality by design approach and its elements. *Ankara Ecz Fak Derg J Fac Pharm, Ankara*, **39**: 369–390.

YUE P-F, YUAN H-L (2009). Preparation, characterization and pharmacokinetics *in vivo* of oxymatrine-phospholipid complex. *J Bioequiv Availab*, **01**.. doi:10.4172/jbb.1000015.

YUE PF, YUAN HL, LI XY, YANG M, ZHU WF (2010). Process optimization, characterization and evaluation *in vivo* of oxymatrine-phospholipid complex. *Int J Pharm*, **387**: 139–146.

ZHANG Y, CUI YL, GAO LN, JIANG HL (2013). Effects of β-cyclodextrin on the intestinal absorption of berberine hydrochloride, a P-glycoprotein substrate. *Int J Biol Macromol*, **59**: 363–371.

ZHANG Z, CHEN Y, DENG J, JIA X, ZHOU J, LV H (2014). Solid dispersion of berberine-phospholipid complex/TPGS 1000/SiO 2: Preparation, characterization and *in vivo* studies. *Int J Pharm*, **465**: 306–316.

ZIERENBERG O, GRUNDY SM (1982). Intestinal absorption of polyenephosphatidylcholine in man. *J Lipid Res*, **23**: 1136–1142.

ÖZGEÇMİŞ

I– Bireysel Bilgiler

Adı	Volkan
Soyadı	ERDEM
Doğum yeri ve tarihi	
Uyruğu	T.C.
Medeni Durumu	Evli
İletişim adresi ve telefonu	

II– Eğitimi

Lisans	Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (1999-1995)
Lise	Namık Kemal Lisesi (1995-1992)
Ortaokul	Aydeniz Ortaokulu (1992-1988)
İlkokul	Salih Alptekin İlkokulu (1988-1983)
Yabancı dil	İngilizce

III– Ünvanları Eczacı

IV– Mesleki Deneyimi