

**KARVEDİLOL İÇEREN NANOPARTİKÜL  
FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE *İN*  
*VİTRO* KARAKTERİZASYONU**

**Yüksek Lisans Tezi**

**İrem ARAL**

**Eskişehir 2025**

**KARVEDİLOL İÇEREN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONU  
GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO KARAKTERİZASYONU**

**İrem ARAL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Evrim AKYIL**

**Anadolu Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Mart 2025**

**Eskişehir**

*Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından TYL-2023186 proje numarası ile desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İrem Aral'ın "Karvedilol İçeren Nanopartikül Formülasyonu Geliştirilmesi ve *In Vitro* Karakterizasyonu" başlıklı tezi 07/02/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Evrim AKYIL	.....
Üye	: Prof. Dr. Ebru BAŞARAN	.....
Üye	: Doç .Dr. Umay Merve GÜVEN BÖLGEN	.....

Prof.Dr. Nafiz Öncü CAN  
Anadolu Üniversitesi  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### KARVEDİLOL İÇEREN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU

İrem ARAL

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2025

Danışman: Prof. Dr. Evrim AKYIL

Karvedilol, üçüncü kuşak, non-selektif bir  $\beta$ -adrenoreseptör blokörü olarak farmasötik kategorizasyonda Lipofilik Rasemik yapı ile Sınıf 2'de sınıflandırılmıştır. Kalp yetmezliği, kronik *angina pectoris* ve kronik hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır; ancak düşük çözünürlüğe ve sınırlı biyoyararlanıma sahiptir. Oral yolla alındığında, ilacın hedef dokuya ulaşmasında ve etkin maddenin serbest bırakılmasında bazı zorluklar mevcuttur. Bu problemleri çözmek ve ilacın hedef dokudaki etkisini artırmak amacıyla yapılan bu araştırmada, Eudragit S100 polimeri kullanılarak iki farklı yöntemle nanopartikül formülasyonları oluşturulmuştur. Araştırmada, bu formülasyonların karakterizasyonu yapılmış, *in vitro* özellikleri incelenmiş ve yapılan salım çalışmaları sonucunda ilacın etki süresinin artırıldığı ve etkin maddenin başarılı bir şekilde salındığı belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Karvedilol, İlaç Taşıma Sistemleri, NP Formülasyon Geliştirme, Karakterizasyon, Spektrofotometrik Analiz

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION OF CARVEDILOL- CONTAINING NANOPARTICLE FORMULATION

İrem ARAL

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Education, February 2025

Supervisor: Prof. Dr. Evrim AKYIL

Carvedilol, a third-generation, non-selective  $\beta$ -adrenoreceptor blocker, is classified in Class 2 with a lipophilic racemic structure in pharmaceutical categorization. It is used in the treatment of heart failure, chronic *angina pectoris* and chronic hypertension; however, it has low solubility and limited bioavailability. When taken orally, there are some difficulties in getting the drug into the target tissue and releasing the active substance. In order to solve these problems and increase the effect of the drug in the target tissue, in this study, nanoparticle formulations were created by two different methods using Eudragit S100 polymer. In the study, these formulations were characterized, their *in vitro* properties were examined and as a result of the release studies, it was determined that the effect of the drug was increased and the active substance was successfully released.

**Keywords:** Carvedilol, Drug Delivery Systems, Nanoparticle Formulation Development, Characterization, Spectrophotometric Analysis

07/02/2025

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İrem ARAL

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ihtiyacım olan maddi veya manevi her türlü desteği sunan, bana her daim yol gösteren, çalışmalarımın doğru bir şekilde yönlendirilmesinde deneyimlerinden ve bilgisinden yararlandığım, hayata dair fikirlerinde her zaman önem verdiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Evrim AKYIL'a,

Çalışmalarım sırasında bilgisini ve tecrübelerini benden eksik etmeyen sıkça görüşlerine başvurduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Müzeyyen Demirel'e, Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Prof. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Doç. Dr. Alper ÖZTÜRK'e, Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a, Doç. Dr. Behiye ŞENEL'e ve Dr. Öğr. Üyesi Sinan ÖZER'e

Bu dönemde benden destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Araş. Gör. Kaan YALÇINKAYA'ya, Araş. Gör. Kadir AYKAÇ'a ve Araş. Gör. Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN'e,

FT-IR analizlerinde bana yardımcı olan Serkan LEVENT'e,

Her koşulda yanımda olan ve sırtımda sarsılmaz desteğini daima hissettiren kıymetli Ebrar ACAR'a

Bu uzun ve zorlu süreçte uzakta olsalar da her zaman destekçim olan, sevgisini bana her daim hissettiren, yüreklendiren ve beni bu günlere sevgi ve saygı ile yetiştirerek getiren canım annem Didem ARAL, babam Mehmet Sinan ARAL ve ablam Merve ARAL BIŞAROĞLU'na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İrem ARAL

07/02/2025

## **ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ**

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında, yürütülmesinde, verilerin analizinde Etik Kurul İzni'ne gerek yoktur.

İrem ARAL

## **ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI**

Bu tez çalışmasının hazırlanması, yürütülmesi, verilerin analizi vb. aşamalarının herhangi birinde üretken yapay zekâ programlarından yararlanmadığımı beyan ederim.

İrem ARAL

## **DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE**

I declare that I have not used generative artificial intelligence programs at any stage of the preparation, execution, data analysis, etc. of this study.

İrem ARAL

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	ii
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ.....	vii
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI.....	viii
DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE .	ix
İÇİNDEKİLER .....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. ALAN YAZIN.....	4
2.1. KRV .....	4
2.1.1. KRV farmakolojik özellikleri .....	4
2.1.1.1. Farmakokinetik .....	6
2.1.1.2. Absorbsiyon (Emilim) .....	6
2.1.1.3. Distrübsiyon (Dağılım) .....	7
2.1.1.4. Metabolizma ve atılım .....	7
2.1.1.5. Farmakodinamik .....	8
2.1.1.6. Yan Etki Profili.....	10
2.1.2. Fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	10
2.1.3. KRV miktar tayini metotları .....	19
2.1.3.1. Elektrokimyasal yöntemle tayin .....	19
2.1.3.2. Kimyasal luminesans ile tayin.....	19
2.1.3.3. Spektrofotometrik yöntemle tayin .....	20
2.1.3.4. Kromatografik yöntemle tayin .....	21
2.1.4. KRV içeren ticari preparatlar .....	21
2.2. Oral Yoldan İlaç Uygulanması.....	23

<b>2.3. Nanopartiküler Sistemler .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1.Nanopartiküler Sistemlerde <i>İn Vitro</i> Salım.....</b>	<b>24</b>
2.3.1.1. Nanopartiküler Sistemlerde <i>İn Vitro</i> Salım Yöntemleri .....	28
2.3.1.1.1. Örnek Alma ve Ayırma Yöntemi.....	28
2.3.1.1.2. Membran Difüzyon Yöntemi.....	29
2.3.1.1.3. Ters Diyaliz Kesesi Yöntemi .....	30
2.3.1.1.4. Sürekli Akış Yöntemi .....	31
2.3.1.2. Nanopartiküler Sistemlerde <i>İn Vitro</i> Salım Yöntem Üstünlükleri ve Sakıncaları .....	31
<b>2.4. Polimerik NP'ler (PNP).....</b>	<b>34</b>
<b>2.4.1. Polimerik NP hazırlama yöntemleri .....</b>	<b>34</b>
2.4.1.1. Nanoçöktürme yöntemi.....	34
2.4.1.2. Emülsifikasyon – çözücü uçurma yöntemi .....	34
2.4.1.3. Emülsifikasyon – çözücü difüzyonu yöntemi .....	35
2.4.1.4. Tuz ile çöktürme (salting out) yöntemi.....	36
2.4.1.5. SKA teknolojisi .....	37
2.4.1.6. Koaservasyon yöntemi.....	37
2.4.1.7. Diyaliz yöntemi .....	40
<b>2.4.2. PNP karakterizasyonu .....</b>	<b>40</b>
2.4.2.1. Partikül boyut ve morfolojisi.....	40
2.4.2.2. Zeta potansiyel.....	40
2.4.2.3. Etkin madde yüklenmesi ve enkapsülasyon.....	41
<b>2.5. Polimerler .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5.1. Eudragit.....</b>	<b>42</b>
2.5.1.1. EUD S100 .....	43
<b>3. GEREÇLER .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Kullanılan maddeler .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2. Kullanılan Cihazlar .....</b>	<b>45</b>
<b>4. YÖNTEMLER.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 KRV Çalışmaları .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.1.KRV morfolojisi .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.2. Termal özellikler .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizi.....</b>	<b>46</b>

<b>4.1.4. KRV'nin UV Spektrofotometri Çalışmaları .....</b>	<b>46</b>
4.1.4.1. Doğrusallık .....	46
4.1.4.2. Doğruluk .....	47
4.1.4.3. Kesinlik .....	47
4.1.4.4. Duyarlılık .....	47
<b>4.2. PNP Formülasyon Çalışmaları.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. PNP Karakterizasyonu .....</b>	<b>50</b>
4.3.1. Parçacık büyüklük ve dağılımı .....	50
4.3.2. Zeta potansiyel .....	50
4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (%EE).....	50
4.3.4. Termal analiz.....	50
4.3.5. FT-IR analizi .....	50
4.3.6. <i>In vitro</i> salım .....	51
<b>5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1. KRV ile Yapılan Çalışmalar .....</b>	<b>52</b>
5.1.1. Termal analiz.....	52
5.1.2. FT-IR analizi .....	53
5.1.3. KRV'nin UV spektroskopi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları ....	54
5.1.3.1. Doğrusallık .....	54
5.1.3.2. Doğruluk .....	55
5.1.3.3. Kesinlik .....	56
5.1.3.4. Duyarlılık .....	57
<b>5.2. PNP Formülasyon Çalışmaları.....</b>	<b>58</b>
5.2.1. PNP formülasyonlarının morfolojik özellikleri.....	58
5.2.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı .....	61
5.2.2. Zeta potansiyeli .....	62
5.3.3. Enkapsülasyon etkinliği .....	62
5.3.4. Termal analiz sonuçları .....	63
5.3.5. FT-IR analizi sonuçları .....	66
5.3.6. <i>In vitro</i> salım çalışma sonuçları .....	69
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>71</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>75</b>
<b>EKLER</b>	

## ÖZGEÇMİŞ

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 2.1.</b> KRV'ün sulu pH çözünürlüğü (pH 1-7,6) .....	11
<b>Tablo 2.2.</b> KRV'ün kristal formları için X-ışını kırınım verilerinin özeti.....	13
<b>Tablo 2.3.</b> KRV İçeren Ticari Preparatlar (http-3) .....	22
<b>Tablo 2.4.</b> EUD Türleri.....	42
<b>Tablo 2.5</b> EUD polimerinin özellikleri .....	43
<b>Tablo 4.1</b> PNP Formülasyon İçerikleri .....	49
<b>Tablo 5.1</b> KRV'ye Ait Doğrusallık Verileri .....	54
<b>Tablo 5.2</b> KRV'ye Ait Doğruluk Verileri .....	56
<b>Tablo 5.3</b> KRV Gün İçi ve Günler Arası Kesinlik Çalışması Sonuçları .....	57
<b>Tablo 5.4</b> Hazırlanan Formülasyonların PB ve PDI Değerleri .....	61
<b>Tablo 5.5</b> Hazırlanan Formülasyonların Zeta Potansiyel Değerleri .....	62
<b>Tablo 5.6</b> KRV'nin <i>In vitro</i> Salım Çalışmasına Ait % Kümülatif Değerler .....	69

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 KRV'nin açık kimyasal formülü. ....	4
Şekil 2.2 KRV'ün Kimyasal Yapısı ve Aktif Bölgeleri .....	5
Şekil 2.3 KC'deki KRV Metabolizması. ....	8
Şekil 2.4 KRV'ün IR Spektrumu (KBr pellet). ....	15
Şekil 2.5 KRV'ün 1 H NMR spektrumu (12-0 ppm) .....	15
Şekil 2.6 KRV'ün 1 H NMR genişleme spektrumu (8,5-6,5 ppm). ....	16
Şekil 2.7 KRV'ün 1 H NMR genişleme spektrumu (5.2-2.8 ppm). ....	17
Şekil 2.8 KRV'ün 13C NMR'ı (200-0 ppm) .....	18
Şekil 2.9 KRV'ün 13C NMR genişleme spektrumu (160-138 ppm. ....	18
Şekil 2.10 Karvedilol'ün Numaralandırılması .....	19
Şekil 2.11 Tekli Emülsiyon S/Y Çözücü Buharlaştırma Yöntemi İle NP'lerin Üretimi	35
Şekil 2.12 Çift Emülsiyon S/Y/S Yöntemi ile NP'lerin Üretimi. ....	36
Şekil 5.1 KRV'e ait termogram. ....	52
Şekil 5.2 KRV'e ait FT-IR spektrumu .....	53
Şekil 5.3 Doğrusal Kalibrasyon Grafiği. ....	55
Şekil 5.4 F1 formülasyonuna ait SEM görüntüsü .....	58
Şekil 5.5 F1-placebo formülasyonuna ait SEM görüntüsü .....	59
Şekil 5.6 F2 formülasyonuna ait SEM görüntüsü .....	59
Şekil 5.7 F2-placebo formülasyonuna ait SEM görüntüsü .....	60
Şekil 5.8 F3 formülasyonuna ait SEM görüntüsü .....	60
Şekil 5.9 F3-placebo formülasyonuna ait SEM görüntüsü .....	61
Şekil 5.10 KRV (a), EUD S100 (b), Fiziksel Karışım (c) Termogramları.....	64
Şekil 5.11 Hazırlanan PNP Formülasyonlarına Ait Termogramlar .....	65
Şekil 5.12 F1 Formülasyonuna Ait FT-IR Spektrumları.....	66
Şekil 5.13 F2 Formülasyonuna Ait FT-IR Spektrumları.....	67
Şekil 5.14 F3 Formülasyonuna Ait FT-IR Spektrumları.....	67
Şekil 5.15 EUD S100'e ait FT-IR spektrumu .....	68
Şekil 5.16 KRV'ye Ait Kümülatif Salım Grafikleri .....	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	:Yüzde
%EE	:Enkapsülasyon etkinliği
°	:Derece
µg	:Mikrogram
<sup>1</sup> H	:Hidrojen
BDS	:Bidistile su
BTB	:Bromotimol mavisidmsö
BP	:İngiliz Farmakopesi
BSS	:Bağıl standart sapma
C	:Selsius
cm	:Santimetre
Cmax	:En yüksek plazma konsantrasyonu
CYP	:Sitokrom P450 enzimleri
dk	:Dakika
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DSC	:Diferansiyel taramalı kalorimetre
EP	:Avrupa Farmakopesi
ERP	:Geliştirilmiş geçirgenlik ve alıkonma
EUD	:Eudragit
FK	:Farmakokinetik
FT-IR	:Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	:Gram
GİS	:Gastrointestinal sistem
HDL	:Yüksek yoğunluklu lipoproteinler
<sup>1</sup> HNMR	:Proton nükleer manyetik rezonans
HPLC	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ICH	:Uluslararası Harmonizasyon Konsülü
İTS	:İlaç taşıyıcı sistem
KC	:Karaciğer
kDa	:Kilodalton
KRV	:Karvedilol
KY	:Kalp yetmezliği

LDL	:Düşük yoğunluklu lipoproteinler
LOD	:Saptama sınırı
LOQ	:Tayin sınırı
MeOH	:Metanol
mg	:Miligram
MI	:Miyokard enfarktüsü
mL	:Mililitre
mm	:Milimetre
MWCO	:Diyaliz membranının moleküler ağırlık kesme değeri
nm	:Nanometre
NP	:Nanopartikül
Ort	:Ortalama
PB	:Parçacık Büyüklüğü
PBS	:Fosfat tamponu
PDI	:Polidispersite indeksi
PEG	:Polietilenglikol
Pgp	:P-glikoprotein
PNP	:Polimerik Nanopartikül
R <sup>2</sup>	:Determinasyon katsayısı
rpm	:Dakikadaki devir sayısı
Rt	:Alıkonma süresi
SEM	:Taramalı Elektron Mikroskobu
S/Y	:su/yağ
S/Y/S	:su/yağ/su
SH	:Standart hata
SK	:Süperkritik
SKA	:Süperkritik akışkan
Sn	:Saniye
SS	:Standart sapma
T1/2	:Yarı ömür
Tmax	:Cmax değerlerine ulaşma süresi
USP	:Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi

V	:Volt
Vd	:Dağılım hacmi
YEM	:Yüzey etkin madde
Zp	:Zeta potansiyel

## 1. GİRİŞ

Nanoteknolojinin günümüzdeki gelişimi, nanometre ölçekli ilaç taşıyıcı sistemlerin (İTS) hızlı bir şekilde geliştirilmesine ve dünya çapında birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar arasına eklenmesine olanak tanımaktadır. Bu nanotaşıyıcılar, küçük boyutları, geniş yüzey alanları ve avantajlı fizikokimyasal özellikleri sayesinde bilim insanlarının dikkatini çekmektedir.

Dünya çapında kardiyovasküler hastalıklar, kalp yetmezliği (KY) gibi ciddi sonuçlar doğurduğundan dolayı bu hastalıkların tedavisi kritik öneme sahiptir. Dünya Kalp Federasyonu'nun raporuna göre her yıl 17,3 milyon insan bu hastalıklar nedeniyle yaşamını yitirmekte, bu sayının ilerleyen yıllarda artması öngörülmektedir. KY tedavisinde kullanılan Karvedilol(KRV), stabil durumdaki hastalar için miyokard enfarktüsünden sonra ejeksiyon fraksiyonunun azaldığı durumlar, hipertansiyon ve sol ventrikül disfonksiyonu için önerilen, seçici olmayan bir adrenerjik blokör olarak işlev görür. KRV'un endikasyon dışı kullanımları arasında stabil *angina*, atriyal fibrilasyon, sirotik özofagus varislerinin kanamasının önlenmesi ve ventriküler aritmiler bulunmaktadır. Bu ilaç, alındıktan 1-2 saat sonunda maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır ve yiyeceklerle alındığında emilim hızı düşerken, biyoyararlanımı değişmez. Yüksek dağılım hacmine (yaklaşık  $V_d=1,5$  L/kg) sahip ve dokulara kolaylıkla yayılabilen bu lipofilik ilacın sistemik biyoyararlanımı, ilk geçiş metabolizması nedeniyle düşüktür (%25). Bu bilgiler doğrultusunda, tez kapsamında KRV içeren yeni nanopartikül (NP) bazlı İTS geliştirilmesi, bu sistemlerin karakterizasyonu ve sağlıklı epitel hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi planlanmaktadır.

Kontrollü İTS'lerin geliştirilmesi ile ilaç dozajının azaltılması ve yan etkilerin minimize edilmesi amaçlanmaktadır. Bu sistemler, bir ilacın vücutta kontrollü bir şekilde salınmasını sağlayarak, terapötik etkilerini maksimize etmek üzere tasarlanmıştır. 1-1000 nm boyut aralığındaki bu partiküller, doğal veya sentetik polimerlerden, ya da yağlardan üretilmiş katı ve küresel kolloidal yapılardır. İlaç molekülleri, NP'lerin matrisinde çözünebilir, enkapsüle edilebilir veya bu NP'lere adsorbe olabilir. Tez çalışmasının bir parçası olarak, yan etkileri minimum düzeye indirmek ve doz aralıklarını genişletmek için biyouyumlu polimerler ve lipitler kullanılarak farklı sistemler geliştirilecek ve bu sistemlerin etkinlikleri karşılaştırılacaktır. Geliştirilecek formülasyonların morfolojik özellikleri, yüzey yükleri, partikül boyutları ve dağılımları, yükleme kapasiteleri ve enkapsülasyon verimlilikleri, *in vitro* çözünürlük profilleri ve hücre kültürü çalışmaları

ile değerlendirilecektir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarla KRV içeren yeni İTS formülasyonları üzerinde çalışmalar sürdürülmekte ve yan etkileri azaltan bir sistem geliştirme çabaları devam etmektedir.

Bu tez çalışmasının temel amacı, KY ve kardiyak aritmiler için kullanılan antihipertansif bir beta bloker olan KRV tabanlı Nanopartiküler İTS'lerin geliştirilmesi ve bu sistemlerin *in vitro* salım profillerinin detaylı bir şekilde analiz edilmesidir. Çalışmanın sonucunda, piyasadaki mevcut alternatiflerden daha yüksek biyoyararlanım ve kontrollü salım özelliklerine sahip bir formülasyon geliştirilerek tedavi başarısının artırılması amaçlanmaktadır. Bu tez kapsamında, KRV içerikli yeni nanopartiküler İTS'lerin geliştirilmesi, bu sistemlerin ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi ve geliştirilen formülasyonların sağlıklı epitel hücreleri üzerindeki etkilerinin test edilmesi planlanmaktadır.

Nanopartiküler İTS'ler, 1000 nanometreden daha küçük boyutlu aktif maddeleri içeren ve iç faz ile dış fazdan oluşan sıvı dispersiyon sistemleridir. Bu sistemler uzun raf ömrüne sahip olup, katı dozaj formlarına kolayca dönüştürülebilir (Merisko-Liversidge ve Liversidge, 2008). Nanopartiküllere entegre edilen etkin maddeler çevresel faktörlere karşı korunur ve NP matrisinde buldukları için suda daha iyi çözünürlük gösterirler. Ayrıca, geleneksel dozaj biçimlerine kıyasla yan etki risklerini azaltır, hedeflemeye daha uygun olmaları ve ilk geçiş etkisini ortadan kaldırma potansiyelleri sayesinde etkin maddelerin toksik etkilerini de minimize ederler (Sobczykński ve Bielecka, 2019). Nanopartiküler, yüksek basınçlı homojenizasyon, çözücü emülsifikasyon/uçurma, çözücü enjeksiyonu, mikroemülsiyon, çift emülsiyon teknikleri (Nasirizadeh ve Malaekheh-Nikouei, 2020), tuz ile çöktürme, çözücü deplasman/çöktürme yöntemleri ve süperkritik akışkan (SKA) teknolojisi (Bhatia, 2016) gibi çeşitli yöntemlerle üretilir. KRV ile yapılan biyoyararlanım çalışmaları, ilacın oral yolla alımını bypass ederek biyoyararlanımı artırmayı amaçlamıştır; bu amaçla bukkal (Vamsi, 2013), nazal (Prathi ve Sudhakar, 2013) ve transdermal (Ahmed vd., 2010) gibi alternatif dozaj formları geliştirilmiştir. KRV'ün bukkal dozaj formları arasında film, yama ve tablet gibi çeşitler geliştirilmiş olup, Venkatalakshmi R vd. (2011) HPMC E15 polimeri ile mukoadhezif bukkal formülasyon geliştirmişlerdir. Anuj vd. (2011) ise HPMC K15 ve karbopol 940 polimerlerini kullanarak 8 saatte %77.05-97.2 ilaç salımı sağlayan mukoadhezif yamalar hazırlamışlardır. Aijaz vd. (2011) ise HPMC K4M kullanarak kontrol edilebilir bukkal tablet formülasyonu geliştirmiştir. Aboud vdadaşlarının çalışmasında, nazal uygulama

için geliştirilen KRV yüklü polimerik NP'ler, oral yolla alınan KRV'e göre daha yüksek bir biyoyararlanım sağlamış ve bu yöntemle ilacın etkinliğinin artırılması mümkün olmuştur (Aboud vd. 2016).

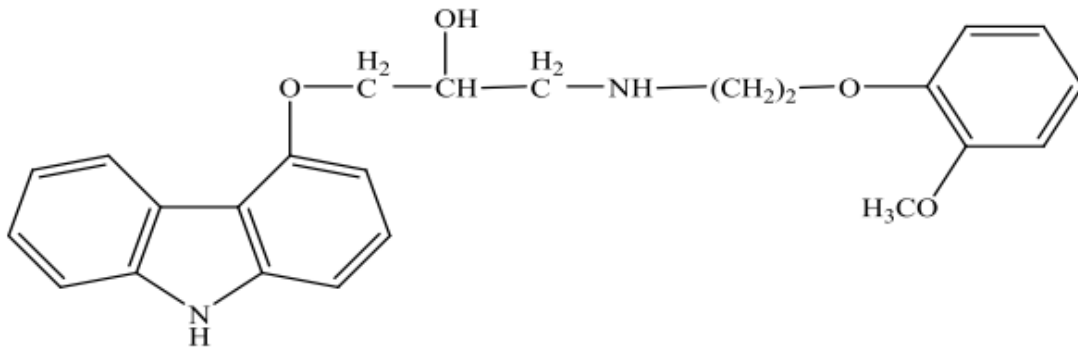
## 2. ALAN YAZIN

### 2.1. KRV

KRV, genellikle beyaz ya da beyaza yakın bir toz formunda bulunur. KRV, beta blokerler sınıfına aittir. Bu madde, 114 ile 115°C arasında erir. Dimetilsülfoksit, metilen klorür ve metanol içinde çözünebilirken, etanol ve izopropanolde sınırlı çözünürlüğe sahiptir ve suyla neredeyse hiç karışmaz (Moffat, 2004). Bu bileşiğin IUPAC ismi, (±)-1-(karbazol-4-iloksi)-3-((2-(O-metoksifenoksi)etil) amino)-2-propanol şeklindedir. Moleküler ağırlığı 406,47 gram/mol olan bu kimyasalın moleküler formülü C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>'tür. KRV'nin açık kimyasal formülü Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (Rashad vd, 2024).

#### Şekil 2.1

*KRV'nin açık kimyasal formülü.*



*Kaynak: Gannu vd., 2007*

#### 2.1.1. KRV farmakolojik özellikleri

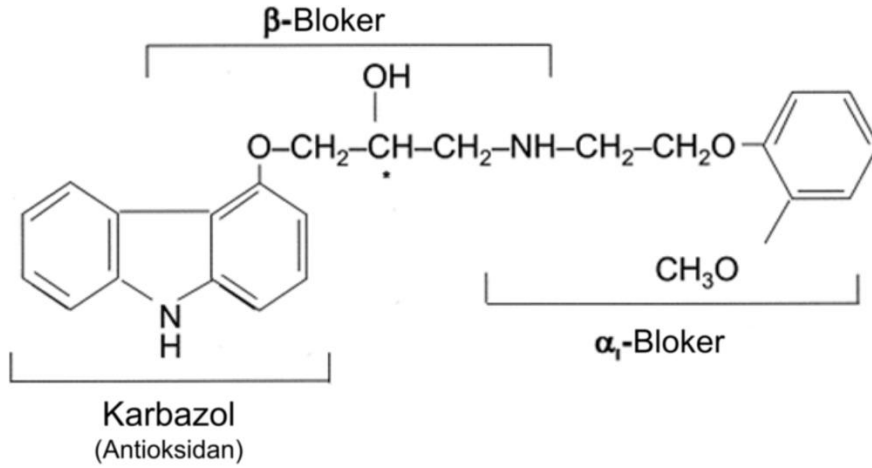
KRV, birincil olarak KY tedavisinde kullanılan bir ilaç ve üçüncü nesil, seçici olmayan bir β-adrenoreseptör antagonisti olarak FDA tarafından onaylanmış rasemik lipofilik bir ariloksipropanolamin ilaçtır (Brunton vd., 2017, Frishman vd., 1998). Ayrıca, α1-adrenerjik blokörü, antioksidan, kalsiyum antagonisti antiproliferatif ve anti-endotelin etkisinin olduğu hayvan deneyleri ile desteklenmiştir (Dulin ve Abraham, 2004; Kayaalp, 2012). KY tedavisinde, KRV hem β1- hem de β2-adrenerjik reseptörleri bloke eder ve bu da kalp fonksiyonlarını düzeltir ve olumsuz miyokardiyal yeniden şekillenmenin yayılmasına yol açar. KRV ayrıca, vazodilatasyon yoluyla periferik vasküler direnci azaltmak için α1-adrenerjik reseptörlerin antagonizmasından yararlanmaktadır. Bu farklı etkiler, KRV molekülünün farklı bölümlerine bağlanabilir. KRV, asimetric bir karbon atomuna sahip olduğundan, sadece tek bir enantiyomer çifti üretir (Dulin ve Abraham,

2004).  $\beta_1$  adrenoreseptör blokaj etkisi öncelikle (S) enantiyomerine atfedilirken,  $\alpha_1$  adrenoreseptör blokaj aktivitesine hem (S)- hem de (R) enantiyomerleri sahiptir. Klinik olarak kullanılan rasemik karışım, KRV'ün tüm farmakolojik etkilerini sağlar (Beattie vd., 2013).

KRV, non-selektif beta-adrenoreseptör blokerleri sınıfına ait bir ilaçtır ve aynı zamanda vazodilatör özelliklere sahiptir. Bu iki temel özellik, KRV'ün hipertansiyon, KY ve iskemik kalp hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmasını sağlar. İlacın etki mekanizması, beta-1 ve beta-2 adrenoreseptörlerini bloke ederek adrenerjik uyarılma sonucu kalbin çalışma hızını ve kuvvetini azaltırken, alfa-1 reseptörlerini bloke ederek de periferik damar direncini düşürüp kan akışını artırır. Bu çift yönlü etki, KRV'ü kardiyovasküler tedavilerde öne çıkan bir seçenek haline getirir (Güven vd., 2020).

### Şekil 2.2

*KRV'ün Kimyasal Yapısı ve Aktif Bölgeleri*



Not\*: "\*" Asimetri noktasını gösterir.

Kaynak: Dulin ve Abraham, 2004

Tek bir reseptör üzerinden etki göstermeme durumu KRV'ü selektif olmayan blokörler grubuna dahil etmektedir.  $\beta_1$  reseptörler kalp hücrelerinde bulunur ve sempatik etkinliğin kalbe ulaşmasından sorumludur.  $\beta_2$  reseptörler ise damar, bronş ve düz kasların gevşemesinde rol oynar. Hem  $\beta_1$  hem  $\beta_2$  reseptörlerinin inhibisyonu KRV tarafından gerçekleştirilebilmektedir (Kayaalp, O.S., 2012).

Sistolik disfonksiyona bağlı konjestif KY tedavisinde, terapötik etkililik genellikle  $\beta$ -blokör etkisi ve vazodilatör etkisi ile ilişkilidir. *COPERNICUS denemesi*, ağır konjestif KY olan hastaların da dahil edildiği 6 aylık bir çalışmadır ve KRV'ün hastaların mortalite

oranlarını ve hastaneye yatırılma sıklıklarını azalttığını göstermiştir (Packer, M. vd., 2002). KRV'nin iyi tolere edilebildiği ve tedaviye başlanmadan önce hastalarda sıvı retansiyonu olmaması koşulu ile kullanılabilceği de bu çalışmada belirlenmiştir. Bu nedenle, KRV, konjestif KY tedavisinde etkili bir seçenek olarak kabul edilmektedir. KRV'nin, oral formülasyon halinde, semptomatik kronik KY'de diüretiklere, anjiyotensin antagonistlerine (ADE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokörleri) ve digoksin'e yardımcı olarak kullanılmaktadır (Kayaalp, O.S., 2012).

KRV, diğere  $\beta$ -blokör ilaçlara kıyasla daha olumlu sonuçlara yol açabilecek bazı özelliklere sahiptir. Bu ilaç, KY tedavisinin yanı sıra, koroner arter hastalığı, inme böbrek yetersizliği, diyabet ve atriyal fibrilasyon gibi KY ile sıklıkla birlikte görülen diğere rahatsızlıkların tedavisinde de etkili olduğu birçok araştırma tarafından gösterilmiştir (Ongun Özdemir ve Ertaş, 2005).

#### **2.1.1.1. Farmakokinetik**

Bilimsel çalışmaların sonuçlarına göre, KRV'nin farmakokinetik (FK) özellikleri, 1 mg/mL infüzyon hızında 15 mg'lık dozun intravenöz infüzyonu üzerine değerlendirilmiştir. Bu özellikler, KRV'nin eliminasyon yarı ömrü (T<sub>1/2</sub>) değeri olan 2,2 saat, V<sub>d</sub> değeri olan 1,5 L/kg ve toplam vücut klirensi değeri olan 0,521 L/sa/kg olarak belirlenmiştir. KRV, rasemik ve/veya bireysel enantiyomerleri olarak sağlıklı gönüllülerde, hipertansiyonlu hastalarda, konjestif KY olan veya miyokard enfarktüsünden (MI) sonra yetişkinlerde ve pediatrik hastalarda incelenmiştir. Bu çalışmalar, KRV'nin FK özelliklerinin farklı popülasyonlarda benzer olduğunu göstermiştir (Beattie vd., 2013).

KRV'nin FK profilinin değerlendirilmesi, insan serumu veya plazmasında tayin edilmesi için birincil hedeftir. Ancak, KRV aynı zamanda bazı sporlarda yasaklanmış bir ilaç olduğu için, idrarda tespit edilmesi de anti-doping taraması için özel bir öneme sahiptir. Bu nedenle, KRV'nin idrarda tayini, diğere  $\beta$ -blokörlerle birlikte anti-doping kurallarına uygunluğu sağlamak için gereklidir (Beattie vd., 2013).

#### **2.1.1.2. Absorbsiyon (Emilim)**

KRV'nin emiliminin hızlı olduğu ve en yüksek plazma konsantrasyonlarına (C<sub>max</sub>) uygulanan dozdan 1 ila 2 saat sonra ulaştığı bildirilmiştir. KRV 50 mg'ın gıda ile birlikte uygulanmasının araştırılması ile ortaya çıkan sonuç, C<sub>max</sub> değerlerine ulaşma süresi (t<sub>max</sub>) açlık koşullarında 0.97 saatten 1.3 saate değiştiğinden, emilim hızının gıda ile

değiştii görülmüştür (Morgan, T., 1994). İlaç gıda ile birlikte uygulandığında emilim hızının düştüğü, ancak biyoyararlanımın gıdadan etkilenmediği değerlendirilmiştir. Oral yolla alınan KRV'nün, yaklaşık %25'lik nispeten düşük ve değişken bir mutlak biyoyararlanım göstermesi de ilk geçiş metabolizmasına uğraması ve bağırsak kanalındaki yavaş çözünme hızı ile açıklanmaktadır (McTavish vd., 1993; Liu vd, 2015). İki enantiyomer arasındaki mutlak oral biyoyararlanımda farklılıklar olduğu bilinmektedir; R(+) ve S(-) enantiyomerler için mutlak biyoyararlanım sırasıyla %31,1 ve %15,1'dir (Dulin ve Abraham, 2004).

### **2.1.1.3. Distrübsiyon (Dağılım)**

KRV, yüksek lipofilik özelliği nedeniyle vücutta yaygın olarak dağılır ve yaklaşık 1,5 ila 2 L/kg arasında bir Vd'ne sahiptir (Morgan, 1994; Singh ve Preuss, 2022). İlaç, %95 oranında proteine bağlanır ve R-(+) enantiyomeri S(-)-enantiyomerine göre daha güçlü bir şekilde bağlanır. Bu nedenle, KRV'nün  $\beta$ -bloke edici ve  $\alpha$ 1-bloke edici etkilerinin dokular üzerindeki etkisi, karışımdaki ilaç oranlarına, kkdaraçiğer (KC) metabolizmasının hızına ve protein bağlanma derecesine bağlı olarak karmaşık bir etkileşim gösterir. KRV, bazik yapısı ve lipofilikliği nedeniyle, hayvan sütünde diğer  $\beta$ -bloke edici ilaçların birikimine benzer bir şekilde birikir (Morgan, T., 1994). Lipofilik ve hidrofobik bir ilaç olan KRV çözünme hızı ve biyoyararlanımı partikül boyutundan büyük ölçüde etkilenmektedir. Eşdeğer çözünme profilleri ve kan konsantrasyon profilleri elde etmek için hidrofobik ilaçların partikül boyutunu kontrol etmek gerekmektedir. 40 mg eşdeğer mikronize KRV fosfat içeren matris tablet formülasyonu uygulanarak sürdürülen bir çalışmada, 24 saat sonra %99 ilaç salımı gösterirken, ilacın mikronize edilmediği aynı formülasyon %75 ilaç salımı göstermiştir (Fernandes vd., 2018).

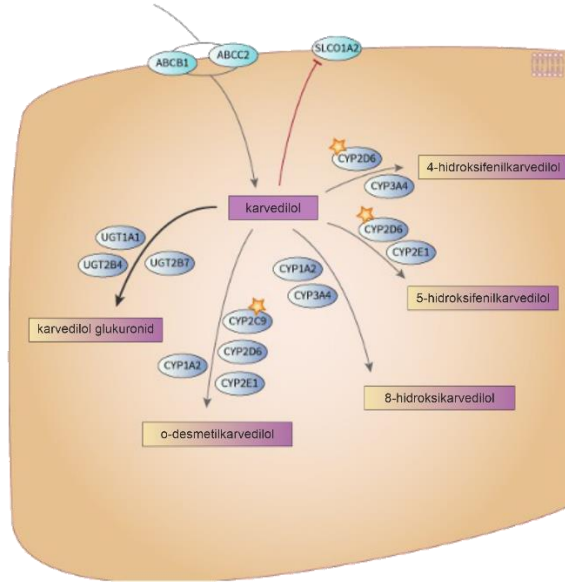
### **2.1.1.4. Metabolizma ve atılım**

50 mg'lık oral KRV dozunun insanlarda metabolizmasının incelendiği araştırma sonuçları, metabolizmanın neredeyse tamamının hepatik yolla gerçekleştiğini ve ana metabolitler arasında glukuronid konjugatı, alifatik yan zincir oksidatif ürünleri ve aromatik halka hidrosillenmiş konjugatlarının yer aldığını göstermiştir. Bu metabolitlerin bazıları farmakolojik olarak aktif görünmektedir. KRV'nün neredeyse tamamen metabolizma yoluyla vücuttan atıldığı bulunmuştur; metabolitlerin yaklaşık %16'sı renal yolla ve %60'ına kadarı fekal yolla atılmıştır. Yalnızca %2'si idrarda değişmemiş ilaç olarak atılmaktadır (Dulin ve Abraham, 2014; Morgan, 1994). İnsan KC

mikrozomları, sitokrom P450 enzimlerinin (CYP) inhibitörleri ve rekombinant CYP proteinleri ile yapılan *in vitro* deneyler, R-KRV'ün esas olarak CYP2D6 (%40) tarafından CYP3A4 (%30), CYP1A2 (%20) ve CYP2C9 katkılarıyla metabolize edildiğini, S-KRV'ün ise çoğunlukla CYP1A2 (%60) tarafından metabolize edildiğini, %20 CYP2D6 ve %15 CYP3A4 ile metabolize edildiğini göstermiştir. Oksidatif metabolik yolların çoğunluğu, hepatic CYP2D6 ve CYP2C9 enzimleri aracılığıyla gerçekleşir ve S(-) enantiyomeri R(+) enantiyomerinden daha hızlı metabolize edilmektedir (Dulin ve Abraham, 2004).

### Şekil 2.3

KC'deki KRV Metabolizması.



Kaynak: <http-1>

#### 2.1.1.5. Farmakodinamik

Rasemik KRV,  $\beta$ -adrenoseptör antagonistidir ve damar genişletici özelliklere sahiptir.  $\beta$ 1-adrenoseptörleri antagonize etme gücü propranolol ile benzer, ancak daha uzun sürelidir ve labetalol ile karşılaştırıldığında daha güçlüdür. KRV,  $\beta$ 2-adrenoseptörleri de antagonize edebilir, ancak seçiciliği  $\beta$ 1-adrenoseptörlere göre daha zayıftır. Vazodilatör aktivitesi  $\alpha$ 1-adrenoseptörlerin antagonizmasından kaynaklanır, ancak kalsiyum kanallarının da antagonizması vardır. Diğer  $\beta$ -blokörlerden vazodilatasyon nedeniyle renal fonksiyon üzerindeki olumlu etkisiyle ayırt edilebilmektedir (Sürer, 2014). KRV, intrinsik sempatomimetik aktivite göstermez ve sadece zayıf membran stabilize edici (lokal anestetik) aktiviteye sahiptir (McTavish vd., 1993). KRV'ün, kardiyoprotektif etkileri çeşitli bilimsel çalışmalarca kanıtlanmıştır. Hayvan modellerinde akut MI'ne

karşı etkili olduğu gösterilmiştir ve propranololden daha etkili olduğu bilinmektedir. Akut MI'nün klinik öncesi deneysel modellerinde, KRV domuz, sıçan ve köpekte enfarktüs boyutunda belirgin azalmalar sağlamıştır (Ruffolo vd., 1993). Nöronal hasara karşı koruyucu özellikleri ve antiproliferatif etkileri de bulunmaktadır. Hipertansif hastalarda düşük dozlarda kan basıncını düşürür ve yaşlı hastalarda da etkilidir. Kalp hızı ve kardiyak indeks üzerinde genellikle çok az etkisi vardır ancak egzersiz yapan hipertansif hastalarda kalp debisinin azaldığı gözlenmiştir. Koroner arter hastalığı olan hastalarda egzersiz kapasitesini ve sol ventrikül fonksiyonunu iyileştirmekte ve sol ventrikül hipertrofisini geriletmektedir. İdiyopatik dilate kardiyomyopati hastalarda da kardiyak fonksiyonu iyileştirdiği gözlemlenmiştir (McTavish vd., 1993). KRV, ayrıca, güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir ve reaktif oksijen radikallerinin etkisini engellemektedir. Sonuçlanan klinik araştırmalar, uzun süreli KRV tedavisi sırasında oksidatif stresle ilişkili birçok parametrede düşüş olduğunu göstermiştir (http-2).

KRV'nün antioksidan etkileri, son yıllarda miyokardın kronik patolojik durumlarında reaktif oksijen radikallerinin önemli bir rol oynadığını gösteren kanıtlarla birlikte, KY'de yeni bir etki mekanizması olarak öne çıkmaktadır. Özellikle apoptotik hücre ölümünün önlenmesindeki potansiyel rolü vurgulanmaktadır (Feurstein vd., 1998). KRV diğer  $\beta$ -blokörlerden farklı olarak karbonhidrat ve lipid metabolizmasına farklı etki eder ve lipid profili üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur. Yüksek yoğunluklu lipoproteinlerle düşük yoğunluklu lipoproteinler arasındaki (HDL/LDL) oran, KRV kullanımıyla korunur (Sürer, 2014; http-2).

KRV'nün kardiyoprotektif etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammış olsa da, *in vitro* olarak gösterilen antioksidan ve antiproliferatif etkilerin bu etkilerde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların klinik ortamda doğrulanması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Ancak, oksijen tüketimindeki azalma,  $\beta$ -blokaj ve vazodilatasyon gibi etkileri farklı deneysel modellerde gösterilen kardiyoprotektif etkilerde önemli bir rol oynamaktadır (Morgan, 1994; McTavish vd., 1993).

KRV'nün birincil endikasyonu olan hafif veya ciddi KY hastalarında, ventrikül fonksiyonunu düzelttiği ve mortalite ile morbidite oranlarını azalttığı birçok çalışma tarafından doğrulanmıştır. Bu nedenle, standart tedavi seçenekleri arasında yer alması ve KY olan hastalar için düşünülmesi gereken önemli bir ilaçtır (Ongun Özdemir ve Ertaş, 2005).

### **2.1.1.6. Yan Etki Profili**

KRV, KY tedavisinde kullanıldığında tedavinin başlangıcında ve doz artışlarında iyi tolere edilebilir ve güvenli kabul edilmektedir. Ayrıca, yaşlı hastalar da %76 gibi yüksek bir oranda başlangıç dozunun üzerindeki dozları tolere edebilmektedirler (Özyıldız, 2014). KRV kullanımı sırasında bazı advers reaksiyonlar ile karşılaşılabilir. Bu reaksiyonlar arasında ödem, baş dönmesi, bradikardi, hipotansiyon, bulantı, diyare ve bulanık görme bulunmaktadır. ABD KRV KY Programında, KY hastalarının yaklaşık %5'inde KY'nin kötüleşmesi, baş dönmesi veya bradikardi nedeniyle KRV kesilmiştir. Ancak, yaşlı hastalar ve genç hastalar arasında advers reaksiyon insidansında bir farkı bildirilmemiştir. Nadir durumlarda, KRV düşük kan basıncı, böbrek yetmezliği veya yaygın vasküler hastalığı olan hastalarda böbrek fonksiyonlarında geri dönüşümlü bozulmaya neden olabilmektedir. Bu nedenle, böbrek fonksiyon bozukluğu riski taşıyan hastalar ilaç kullanımı sırasında takip edilmelidir. KRV kullanımından sonra hafif hepatoselüler hasar nadiren meydana gelmiştir, ancak KC yetmezliğine bağlı ölüm bildirilmemiştir. KRV alan hastalarda KC fonksiyonlarında anormallik insidansı düşüktür, ancak KC hastalığı öyküsü olan hastalarda ilaç kontrendikedir. Aşırı doz KRV kullanımı hipotansiyon ve bradikardi gibi semptomlara neden olabilmektedir. Aşırı bradikardi için atropin verilebilir ve bozulmuş ventriküler fonksiyonu desteklemek için intravenöz glukagon, dobutamin veya izoproterenol önerilmektedir. Şiddetli hipotansiyon için norepinefrin veya epinefrin verilebilir ve ilaca bağlı bronkospazm için izoproterenol veya intravenöz aminofilin önerilmektedir (Frishman, 1998).

#### **Doz**

Başlangıç dozu; 3.125 mg günde 2 kez

Mutad aralık; 25 mg günde 2 kez

( >85 kg ağırlığındaki hastalar için 50 mg günde 2 kez) (Wells vd., 2019).

### **2.1.2. Fiziksel ve kimyasal özellikleri**

KRV'nin Dimetilsülfoksit (DMSO)'da serbestçe çözüldüğü, metilen klorür ve metanolde çözünebildiği, etanol ve izopropanolde az çözünür olduğu ve etil eterde hafif çözünür olduğu bildirilmektedir (Shewale vd., 2008). KRV'nin %96 etanoldeki çözünürlüğü, İngiliz Farmakopesi (BP)/Avrupa Farmakopesi (EP) tarafından hafif çözünür olarak raporlanmıştır. Çeşitli sulu ortamlarda KRV'nin çözünürlüğü, su ve seyreltilmiş asitlerde neredeyse çözünmez olduğu (British Pharmacopoeia, 2013), simüle edilmiş gastrik

sıvısında (pH 1.1) ve pankreatin içermeyen simüle edilmiş bağırsak sıvısında (pH 7.5) (Beattie vd., 2013) neredeyse çözünmez olarak raporlanmıştır. 1–8 pH aralığında, farmasötik açıdan önemli olan bu pH değerlerinde, sulu ortamlardaki KRV'ün çözünürlüğü yaklaşık olarak 0.01 ile 1 mg/mL arasında değişmektedir (Desai, 2011). Bu, fizyolojik pH aralığında oda sıcaklığında KRV için sunulan sulu çözünürlük profiliyle tutarlıdır ve Tablo 2.1'de sunulmuştur. Tablo 2.1'den anlaşıldığı üzere, KRV pH bağımlı bir çözünürlüğe sahiptir ve pH azaldıkça çözünürlüğü artmaktadır. KRV'ün, çeşitli seyreltilmiş sulu asit çözeltilerinde pH 5'ten düşük değerlerde geniş bir aralıkta çözünürlüğü olduğu bildirilmiştir. Çalışmalar, hidroklorik asitte (0.2 M) KRV'ün çözünürlüğünün fosforik asitte (0.1 ve 0.3 M) olanın 10 kat ve asetik asitte (0.2–0.5 M) olanın 400 kat daha az olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni, KRV asetat tuzunun, ilgili fosfat veya hidroklorür tuzlarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir çözünürlüğe sahip olmasıdır (Loftson vd., 2008).

**Tablo 2.1.**

*KRV'ün sulu pH çözünürlüğü (pH 1-7,6)*

	Nihai pH değeri	Çözünürlük (mg/mL)
0.1 N HCl	1.44	0.033
0.01 N HCl	3.58	0.773
pH 2.5 Tampon	3.42	0.415
pH 3.5 Tampon	5.91	0.048
pH 4.5 Tampon	6.18	0.039
pH 5.5 Tampon	6.28	0.037
pH 6.0 Tampon	6.44	0.037
pH 6.8 Tampon	6.85	0.031
pH 7.2 Tampon	7.26	0.013
pH 7.5 Tampon	7.56	0.007

\* "Tampon" 50 mM potasyum fosfat anlamına gelmektedir.

*Kaynak: (Beattie vd., 2013)*

Literatürde KRV'ün çeşitli polimorfik ve psödopolimorfik formları tanımlanmıştır. Bunlar arasında amorf KRV (Pokharkar, 2006; Raut vd., 2011), kristal Form I (Patil vd., 2008), Form II (Patil vd., 2008; Ramanjaneyulu vd., 2009), Form III (Hildesheim vd., 2006), Form IV (yarihidrat) (Hildesheim vd., 2006), Form V (metil etil keton solvatu) (Hildesheim, 2006;2009), Form VI (etil asetat solvatu) (Kor ve Wizel, 2009), Form VII (Zupet vd., 2009) ve Form IX (yarihidrat) (Zupet vd., 2009) bulunmaktadır. Ayrıca daha önce alıntılanan etil asetat solvattan farklı olarak, "muhtemelen bir etil asetat solvatu"

olarak tanımlanan yeni bir kristal KRV formu da rapor edilmiştir (Lifshitz ve Wizel, 2007). KRV Form I, termodinamik olarak en kararlı kristal form olarak tanımlanmıştır (Patil vd., 2008; Beyer ve Reinholz, 2004). Her kristal formun X-ışını kırınımı ile ilgili karakterizasyon verilerinin özeti Tablo 2.2'de verilmiştir. Ayrıca, kristal KRV varlığında, düşük miktarlarda (yani, %1 kadar düşük) amorf KRV'ün varlığının PXRD ile nicel olarak belirlendiği çalışmalar rapor edilmiştir (Raut vd., 2011).

KRV'ün bir kristal formunun (yani, Form II) toz X-ışını kırınım deseni Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

KRV, Form II'nin tek kristal yapı X-ışını verileri, birim hücre boyutlarını  $a=15.5414$  (Kor ve Wizel, 2009) Å,  $b=15.2050$  (Hildesheim vd., 2006) Å,  $c=9.1174$  (Menon vd., 2012) Å,  $b=100.730$ , ve  $V=2116.8$  Å olarak doğrular. Bu, monoklinik, P21/c uzay grubu ile tutarlıdır. Hem KRV Form I hem de II'nin monoklinik olduğu ve aynı uzay grubunda kristalleştiği gösterilmiş olmasına rağmen, hücre parametreleri tamamen farklıdır (yani, Form I için:  $a=9.094$  Å,  $b=12.754$  Å,  $c=18.330$  Å, ve  $b=97.36$ ). Her form iki klasik hidrojen bağına sahiptir; karbazol N atomu 2-metoksi O atomuna bir intermoleküler hidrojen bağı oluşturur ve hidroksil grubu amino N atomuna bir intermoleküler hidrojen bağı oluşturur, ancak aromatik kalıntıları bağlayan zincirin iki torsiyon açısında önemli farklılıklar gösterir (Yathirajan vd., 2007).

KRV Form IV (yarıhidrat) için kristal verileri de literatürde rapor edilmiştir. Bu yarıhidratın rapor edilen birim hücre boyutları  $a=13.517$  Å,  $b=16.539$  Å,  $c=19.184$  Å,  $b=94.27$ , ve  $V=4276.9$  Å'dir. Bu solvatomorf, monoklinik, P21/n uzay grubunu sergiler. KRV konformasyonlarının tükenmiş analizi yayımlanmıştır. Çok boyutlu konformasyon analizi, bu ilaç maddesi için toplam 177,147 (yani, 3 1011) konformasyon olasılığı olduğunu önermektedir. KRV konformasyonlarının farmakofor parça bazlı tahmini ve gaz fazı ab initio optimizasyonu da KRV'ün konformasyon kimliğini açıklamak için gerçekleştirilmiştir (Almeida vd., 2004).

**Tablo 2.2***KRV'ün kristal formları için X-ışını kırınım verilerinin özeti*

<b>Polimorfik kimlik</b>	<b>Raporlanan X-ışını kırınım pikleri (2θ)</b>	<b>Ek veriler (FTIR, DSC, TGA)</b>	<b>Referanslar</b>
<b>Form I</b>	9.5, 10.8, 12.0, 14.6, 19.6, 21.5, 22.3	FTIR: 3451 cm <sup>-1</sup> (karakteristik pik) Form 2 ile karşılaştırıldığında (3345 cm <sup>-1</sup> )	(Beyer ve Reinholz, 2004)
<b>Form II</b>	5.8, 11.6, 13.0, 13.6, 14.8, 15.2, 16.5, 17.0, 17.5, 18.4, 19.2, 20.3, 21.0, 21.4, 21.7, 22.9, 23.5, 24.5, 26.2, 27.5, 28.1, 29.4, 31.4, 32.5, 34.2, 35.4, 38.2, 39.3, 41.9, 44.8, 48.1	FTIR: 3345, 2061, 2997, 2836, 1630, 1608, 1591, 1504, 1455, 1444, 1403, 1348, 1334, 1305, 1286, 1253, 1215, 1178, 1156, 1120, 1101, 1042, 1023, 1002, 980, 958, 915, 871, 850, 785, 748, 728, 721, 621, 580, 465 cm <sup>-1</sup>	(Ramanjaneyulu vd., 2009)
<b>Form III</b>	8.4, 9.3, 11.6, 13.2, 13.5, 14.2, 15.3, 15.8, 17.4, 18.4, 19.4, 20.6, 21.4, 22.0, 26.5, 27.6	DSC (endotermik pik): 96–100 °C	(Bubendorf vd., 2006)
<b>Form IV (hemihidrat)</b>	11.9, 14.2, 15.7, 16.5, 17.7, 18.3, 19.2, 19.6, 21.7, 22.2, 23.9, 24.2, 24.9, 27.4, 28.2	DSC: (başlangıç) 94–96 °C, (pik) 104 °C, TGA: 2% sudan kaynaklanan kayıp	(Aronhime vd., 2007; Bubendorf vd., 2006)
<b>Form V (MEK solvatu)</b>	4.1, 10.3, 10.7, 11.5, 12.6, 14.0, 14.8, 15.4, 16.4, 16.8, 18.8, 20.8, 21.1, 21.6, 25.4	DSC (endotermik pik): 67 °C, 115 °C; TGA: %14 ağırlık kaybı (bir KRV molekülü başına bir MEK molekülü kaybıyla tutarlı, ardından yeniden kristalleşme olayı ve Form II ile tutarlı 115 °C'de bir erime piki)	(Aronhime vd., 2007)
<b>Form VI (etil asetat solvatu)</b>	5.8, 6.5, 7.3, 10.7, 11.1, 11.5, 13.1, 13.7, 16.0, 16.8, 17.7, 18.5, 23.0, 30.5	DSC (74 °C'de endotermik pikler (ana); 112 °C'de (minör)); FTIR: 613, 740, 994, 1125, 1228, 1257, 1441, 1508, 1737, 2840, 3281, 3389, 3470 cm <sup>-1</sup> ; TGA: ağırlık kaybı: 35 ila 104 °C arasında %13	(Kor ve Wizel, 2009)
<b>Form VII</b>	6.4, 6.8, 10.9, 11.6, 12.9, 13.6, 16.8, 17.5, 17.9, 23.3, 27.2	FTIR: 3469, 3278, 2871, 1124, 1096, 745, 723 cm <sup>-1</sup> ; DSC (endotermik pikler): 73 °C (Form VII'den Form II'ye geçiş), 114 °C (Form II erimesi)	(Zupet vd., 2005)
<b>Polimorfik kimlik</b>	<b>Raporlanan X-ışını kırınım pikleri (2θ)</b>	<b>Ek veriler (örn. FTIR, DSC, TGA)</b>	<b>Referanslar</b>
<b>Form IX (hemihidrat)</b>	6.2, 6.5, 11.4, 12.4, 13.6, 14.7, 16.9, 19.3, 19.6, 23.2	FTIR: 3568, 3339, 3288, 2943, 2896, 1350, 1308, 1288, 1104, 997, 737 cm <sup>-1</sup> ; DSC (endotermik pikler): 80 °C (minör: kristal kafesten su salınımı), 99 °C (majör)	(Zupet vd., 2005)
<b>Potansiyel olarak bir etil asetat solvatu</b>	4.3, 8.5, 10.1, 10.6, 11.1, 12.7, 13.6, 15.6, 16.6, 17.0, 19.1, 19.9, 20.3, 21.2, 25.0, 25.4	DSC (endotermik pikler): 60 °C ve 113.0 °C; TGA: 25 ila 60 °C arasında %40 ağırlık kaybı	(Lifshitz ve Wizel, 2007)

\* Okunabilirlik amacıyla yukarıdaki 2y değerleri ilişkili aralıklarıyla (tipik olarak 0,1 veya 0,2) rapor edilmemiştir.

Termodinamik olarak kararlı form olan KRV, Form I'in erime noktası 123–124°C ve 123–126°C olarak rapor edilmiştir. KRV, Form II'in erime aralığı ise etil asetat kristalleri için 114–115°C olarak bildirilmiştir (Beyer ve Reinbolz, 2004).

KRV'ün çeşitli polimorf ve solvatomorfları, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile gözlenen karakteristik termal olaylar açısından literatürde bahsedilmiştir. DSC termal olaylarına ilişkin tablolü özet ve tartışmalar Tablo 2.2'de yer almaktadır.

KRV, Form II'nin termogravimetrik analiz (TGA) ile yapılan termal analizi, bu polimorf ısının oda sıcaklığından 335°C'ye dakikada 10°C artış hızıyla ısıtıldığında, 150°C'ye kadar %0.1'den az ağırlık kaybı gözlemlendiğini doğrulamıştır. 250°C'nin üzerindeki sonraki ağırlık kaybı, KRV'ün termal bozunmasını yansıtmaktadır.

KRV'ün UV spektrumu, Perkin-Elmer Lambda 2 UV–görünür spektrometre kullanılarak elde edilmiştir. Örnek, 8 mg/L konsantrasyonda metanol içinde çözülüp, 200'den 400 nm'ye kadar absorbands modunda taranmıştır. UV spektrumu,  $n \rightarrow \pi^*$  ve  $\pi \rightarrow \pi^*$  elektronik geçişlerinden kaynaklanan maksimum emilimleri 223 nm'de ( $\epsilon=3.6 \times 10^4$ ), 242 nm'de ( $\epsilon=5.0 \times 10^4$ ), 285 nm'de ( $\epsilon=1.4 \times 10^4$ ) ve 332 nm'de ( $\epsilon=5.4 \times 10^3$ ) göstermektedir.

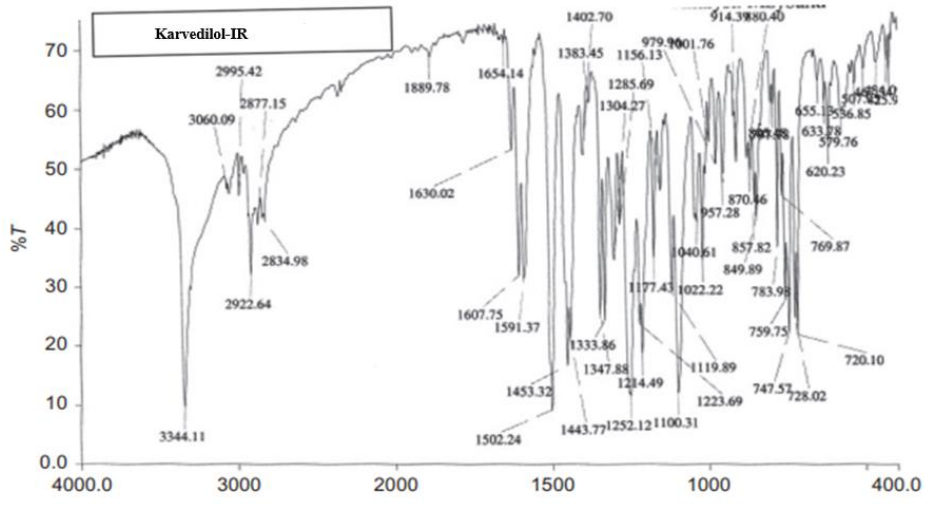
KRV, Form II için FTIR spektrumu (KBr tableti üzerinden kaydedilmiş) Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Alkol OdH gerilmesinden kaynaklanan karakteristik kızılötesi (IR) absorpsiyon bantları (3344  $\text{cm}^{-1}$ ), aromatik (CdH) gerilmesi (3060  $\text{cm}^{-1}$ ), aromatik (C=C) gerilmesi (1608, 1591, 1502, 1453, 1444  $\text{cm}^{-1}$ ) ve alifatik-aromatik eter (CdO) gerilmesi (1252–1100  $\text{cm}^{-1}$ ) gözlemlenmiştir (Beattie vd., 2013).

KRV'ün <sup>1</sup>H NMR spektrumu, 400 MHz'lik bir NMR cihazı kullanılarak, 5-mm QNP probu ve CH<sub>3</sub>OD çözücüsü ile elde edilmiştir. Spektralar 400 MHz'de, 5-mm QNP probu kullanılarak alınmıştır. Kimyasal kaymalar, TMS'ye göre ppm cinsinden, <sup>1</sup>H NMR spektrumundaki artık çözücü sinyalinin iç referans olarak kullanılarak bildirilmiştir. Proton manyetik rezonans sinyal atamaları Şekil 2.5.-Şekil 2.7.'te verilmiştir.

KRV'ün <sup>13</sup>C NMR spektraları, 100 MHz'de, 5 mm çift frekanslı <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C probu ve CH<sub>3</sub>OD çözücüsü kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal kaymalar, TMS'ye göre ppm cinsinden, <sup>13</sup>C NMR spektrumundaki artık çözücü sinyalinin iç referans olarak kullanılarak bildirilmiştir. <sup>13</sup>C manyetik rezonans sinyal atamaları Şekil 2.8.-Şekil 2.9.'da verilmiştir (KRV'ün numaralandırılması için Şekil 2.10'ye bakınız).

## Şekil 2.4

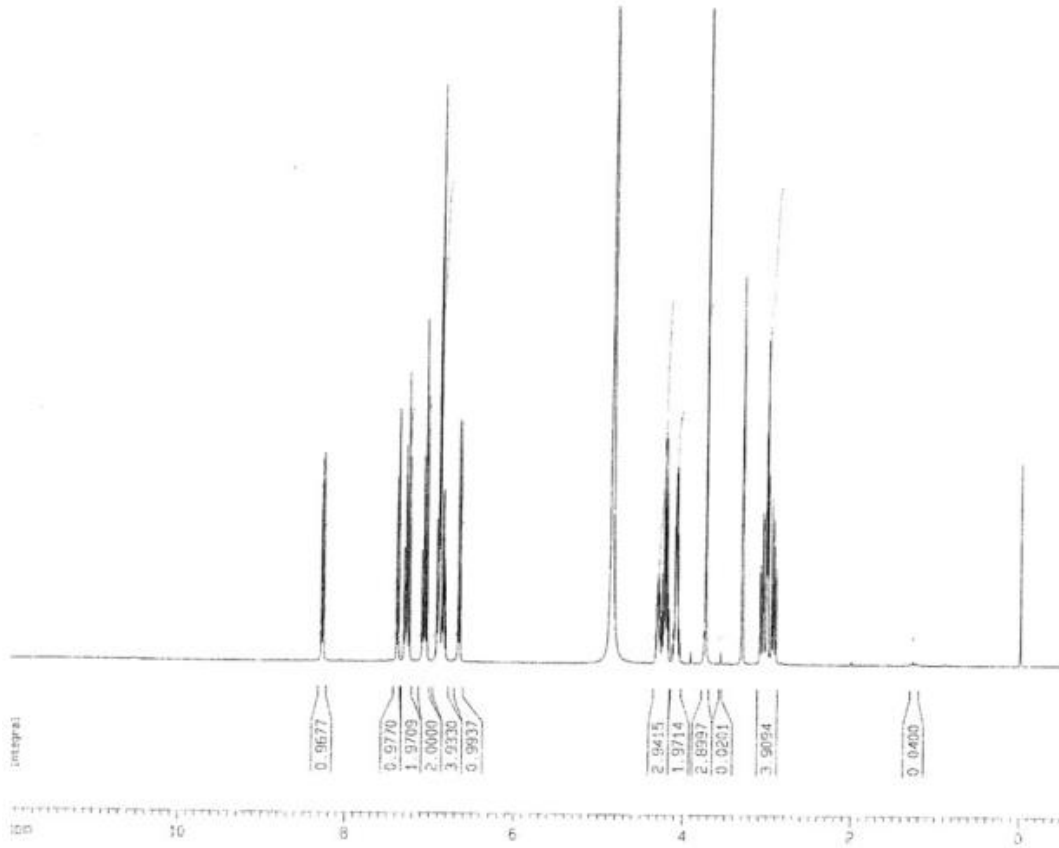
KRV'ün IR Spektrumu (KBr pellet).



Kaynak: Beattie vd., 2013

## Şekil 2.5

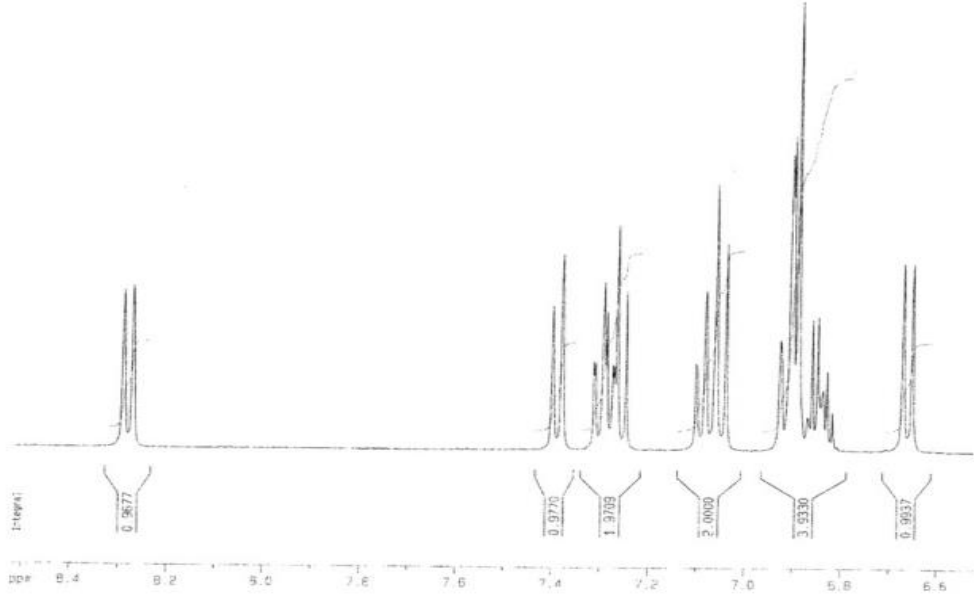
KRV'ün <sup>1</sup>H NMR spektrumu (12-0 ppm)



Kaynak: Beattie vd., 2013

**Şekil 2.6**

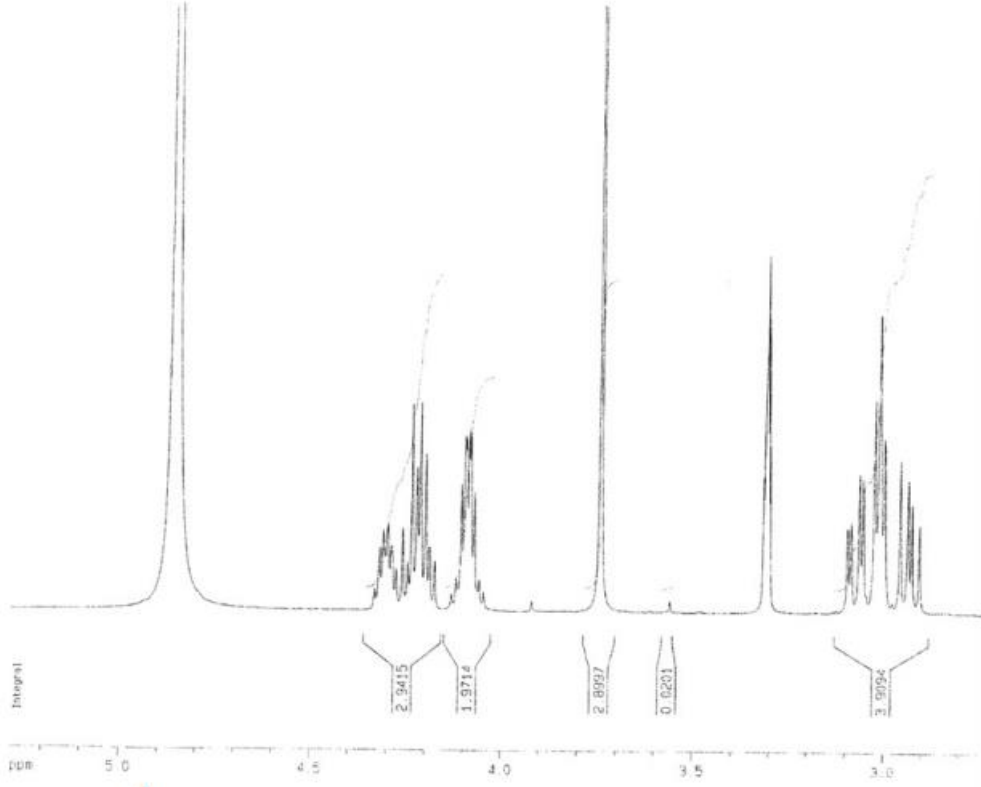
*KRV'nin 1 H NMR genişleme spektrumu (8,5-6,5 ppm).*



*Kaynak: Beattie vd., 2013*

**Şekil 2.7**

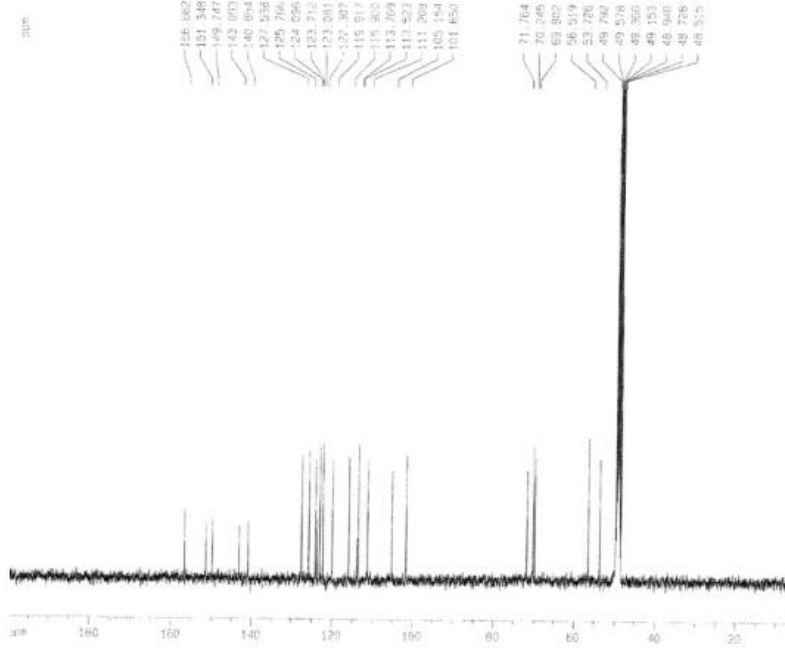
*KRV'nin 1 H NMR genişleme spektrumu (5.2-2.8 ppm).*



*Kaynak: Beattie vd., 2013*

## Şekil 2.8

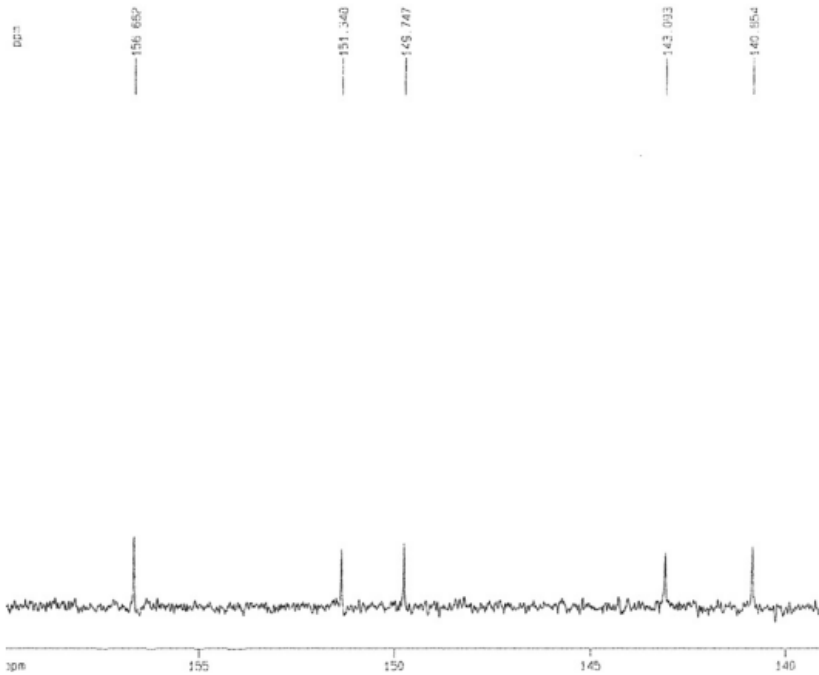
KRV'ün  $^{13}\text{C}$  NMR'ı (200-0 ppm)



Kaynak: Beattie vd., 2013

## Şekil 2.9

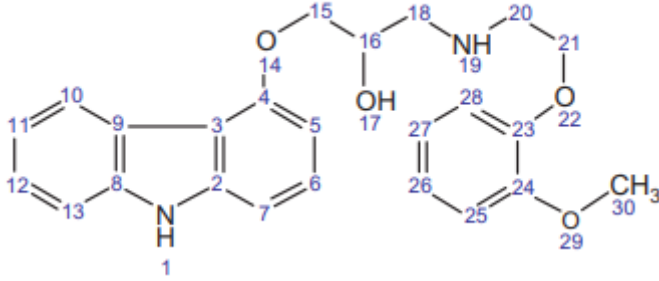
KRV'ün'ün  $^{13}\text{C}$  NMR genişleme spektrumu (160-138 ppm).



Kaynak: Beattie vd., 2013

## Şekil 2.10

### Karvedilol'ün Numaralandırılması



Kaynak: Beattie vd., 2013

H NMR, KRV'ün'ün metal şelatlayıcı özelliklerini incelemek için kullanılmıştır. Demir (III), çinko (II) ve bakır (II) kompleksleri KRV ile sentezlenmiş ve yapısal ve spektroskopik özellikleri açısından karakterize edilmiştir. 2D COSY NMR, metal etkileşimlerinin KRV'ün alifatik kısmındaki alifatik hidroksil ve amino grupları (O ve N donörleri) ile olduğunu doğrulamak için kullanılmıştır (Zoroddu vd., 2009). Daha karmaşık KRV–Bakır "süperdimer" zincirleri benzer şekilde çeşitli NMR teknikleri ile incelenmiştir (Zoroddu vd., 2003).

### 2.1.3. KRV miktar tayini metotları

#### 2.1.3.1. Elektrokimyasal yöntemle tayin

KRV'nin tablet formu kullanılarak, diferansiyel puls voltametri yöntemi ile yapılan bir analizde KRV'nin 2.0-11.0 pH aralığındaki davranışı incelenmiş, difüzyon kontrollü oksidasyon süreci saptanmıştır. 0.25-10.00 mg/mL aralığında doğrusal yanıtla KRV miktarı belirlenmiş tespit limiti 0.10 mg/mL ve kantitasyon limiti 0.25 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Radi ve Elmogy, 2005).

#### 2.1.3.2. Kimyasal luminesans ile tayin

KRV'nin analizi için hızlı ve güvenilir bir kemilüminometrik yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde KRV'nin antioksidan özellikleriyle luminol-hipoklorit reaksiyonunu inhibe edilmiştir. Yöntem Campspec CL-2 dedektörü ve mikro pompalı akış sistemi kullanılarak geliştirilmiştir. KRV konsantrasyonları için  $1,2 \times 10^{-7}$  ile  $3,0 \times 10^{-6}$  mol/L arasında doğrusal bir yanıt aralığı elde edilmiş ve metodun tespit sınırı  $8,7 \times 10^{-9}$  mol/L olarak saptanmıştır (Pires vd., 2005).

### 2.1.3.3. Spektrofotometrik yöntemle tayin

Xu ve ekibi, farmasötik formülasyonlardaki KRV miktarını belirlemek için etkin ve basit bir spektrofotometrik metod geliştirdiler (Xu vd., 2005). KRV'nin asit ve alkali koşullardaki özellikleri bu yöntemle incelenmiş, floresan yoğunluğu 254 nm'deki uyarma ve 356 nm'deki emisyon ile ölçülmüştür. Analiz için elde edilen doğrusal yanıt aralığı 0.50-270 ng/mL iken, tespit sınırı 0.19 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Silva vd.adaşları, farmasötik yardımcı maddelerin etkisini elemek için tabletlerdeki KRV konsantrasyonunu ölçebilen yeni bir akış enjeksiyon spektrofotometrik yöntem rapor etmişlerdir (Silva vd., 2008). KRV'nin floresan özelliklerini artırmak için sodyum dodesil sülfat içeren misel sistem kullanılmıştır. Bu durum, floresan moleküllerin ışınımsız süreçlerden korunmasını sağlayarak, 286 ve 341 nm'lik uyarma ve emisyon dalga boylarında  $3,63 \times 10^{-9}$  mol/L tespit limiti ile  $9 \times 10^{-8}$  ila  $1 \times 10^{-6}$  mol/L arasında bir doğrusallık göstermiştir.

Verma ve ekibi, farmasötik formülasyonlardaki KRV'ü tespit etmek için ekstraktif spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir (Verma ve Syed, 2007). Yöntem, asidik ortamda KRV ve bromokresol yeşili (BCG) arasındaki kloroformda çözünebilen iyon çifti kompleksinin oluşumuna dayanır. 415 nm'de maksimum absorbans gösteren sarı renkli kompleks, 5-25 mg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal bir ilişki göstermiş ve 12 saatten daha uzun süre stabil kalmıştır. Tüm spektral ölçümler 1 cm eşleşen kuvars hücreli Jasco spektrofotometre-V530 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Cadosa vd.adaşları, tablet ve kapsüllerdeki KRV'ü spektrofotometrik olarak tayin etmek için iyot ve asidik boyalarla yapılan iki farklı yöntemi tanımlamışlardır (Cardosa vd., 2001). İlaç, iyotla yük-transfer reaksiyonu için asetonytril ve bromotimol mavisi (BTB) ile BCG için kloroformda iyon çifti oluşumu için kullanılmıştır. İyot, BTB ve BCG için sırasıyla 363, 411 ve 414 nm'de maksimum absorbans gösteren kompleksler elde edilmiştir. Her iki yöntem de ekstraksiyon adımı gerektirmeden ilacın doğrudan ölçümünü sağlar, iyot için 2-7 mg/mL ve BTB ile BCG için 2,5-15 mg/mL arasında Beer yasasına uygundur.

#### **2.1.3.4. Kromatografik yöntemle tayin**

KRV'nin farmasötik formülasyonlarda analizi için HPTLC yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada toluen, etil asetat ve metanol (1:4:3.5) mobil fazıyla 242 nm'de analiz edilmiş, Rf değeri  $0.65 \pm 0.02$  olarak saptanmış ve yöntem 0.05-0.30 mg/mL aralığında doğrusal sonuçlar vermiştir. Tespit sınırı 0.01 mg/mL, kantitasyon limiti ise 0.035 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Patel vd., 2006).

#### **2.1.4. KRV içeren ticari preparatlar**

KRV içeren ticari preparatlar, çeşitli dozaj formlarında ve farklı dozaj güçlerinde sunulmaktadır. Bu preparatlar, genellikle oral yolla alınan tablet formunda bulunur. Pazar mevcudiyeti açısından, KRV dünya genelinde birçok ülkede farklı marka isimleri altında sunulur. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde en bilinen formu "Coreg" ismi altında satılırken, diğer ülkelerde farklı isimlerle bulunabilir. Her bir ticari ürün, farklı hasta gruplarının ihtiyaçlarına yönelik olarak formüle edilmiştir. Bu nedenle hastaların ve sağlık hizmeti sağlayıcılarının spesifik tedavi gereksinimlerini karşılayacak şekilde sunulur (Mahmoud vd., 2009). Bu preparatların farmakokinetik profilleri, ilacın emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı üzerinde önemli etkilere sahiptir. KRV, oral alım sonrasında KCde yoğun bir şekilde metabolize olur ve bu durum, biyoyararlanımını nispeten düşük tutar. Bununla birlikte, ilacın farmakodinamik etkileri genellikle doza bağlıdır, bu da dozajın dikkatlice ayarlanmasını gerektirir. Hastaların tedaviye başlangıç ve devam dozları, genellikle KY veya hipertansiyonun şiddetine bağlı olarak titrasyon yöntemiyle ayarlanır (Morgan, 1994; Tenero vd., 2006).

**Tablo 2.3***KRV İçeren Ticari Preparatlar (http-3)*

<b>İlaç İsimleri</b>	<b>Dozları</b>	<b>Üretici Firma</b>
Arlec	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 3.125 mg</li><li>• 6.25 mg</li></ul>	Ali Raif
Calbikor	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 6.25 mg</li></ul>	Santa
Carvesan	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 6.25</li></ul>	Drogsan
Carvexal	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 6.25</li></ul>	Sandoz
Coronis	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 6.25 mg</li></ul>	Bilim İlaç Sanayii
Delotran	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 6.25 mg</li></ul>	Saba İlaç
Dilatrend	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 3.125 mg</li><li>• 6.25 mg</li></ul>	Deva Holding
Kinetra	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12.5 mg</li><li>• 25 mg</li><li>• 6.25 mg</li></ul>	Sanovel

## 2.2. Oral Yoldan İlaç Uygulanması

Oral yoldan ilaç uygulanması, hasta uyuncunun sağlanması konusunda diğer uygulama yöntemlerine göre avantajlı olduğu için daha çok tercih edilmektedir. Ancak, yeni geliştirilen kimyasal maddelerin bazıları, oral yolla düşük emilim ve biyoyararlanım nedeniyle araştırma ve geliştirme süreçlerinde başarısız olabilmektedir (Agrawal vd., 2014). Bu düşük emilim; zayıf suda çözünürlük, düşük membran geçirgenliği ve P-glikoprotein (Pgp) akışından kaynaklanmaktadır (Khadka vd., 2014; Arzani vd., 2015). Oral uygulama için ilacın gastrointestinal sistemde çözünmesi, suda çözünürlüğe bağlıdır. Hidrofobik ilaçların oral biyoyararlanımı zayıf olup, yan etkiler ve doz sorunlarına yol açabilir (Wang ve Zhang, 2012). KRV, hipertansiyon ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan, vazodilatasyon ve  $\alpha$ -adrenerjik blokaj özellikleri bulunan bir  $\beta$ -blokördür. Yüksek lipofilik yapıya sahip olan bu ilaç, yüksek ilk geçiş metabolizması nedeniyle %25-35 oral biyoyararlanım göstermektedir. KRV'nin biyofarmasötik sınıflandırmasında sınıf II olarak yer almasına neden olan bu özellikler, literatürde çözünürlük artışı ve biyoyararlanımın iyileştirilmesi amacıyla katı dispersiyon, inklüzyon kompleksasyonu ve mikronizasyon gibi çeşitli yöntemlerin araştırıldığını göstermektedir (Manohar vd., 2014). Ancak, bu geleneksel yöntemlerin dozaj ve hasta uyumu gibi kısıtlamaları terapötik etkinliği sınırlamaktadır (Patwekar ve Baramade, 2012).

Nanoteknoloji, lipofilik ilaçların terapötik etkilerini artırma potansiyeli taşıyan stratejiler arasında öne çıkmaktadır (Varshosaz vd., 2014). Özellikle KRV'nin oral biyoyararlanımını artırmak için umut verici bulunan NP'ler, ilacın kapiller ve epitelyal membranlara kolay nüfuz etmesine olanak tanıyarak etkin dağıtımını sağlar.

## 2.3. Nanopartiküler Sistemler

Nanopartiküler sistemlerin ilaç endüstrisindeki yeri, geleneksel yöntemlerle sağlanamayacak birçok avantajı beraberinde getirmektedir. İlaçların çözünürlüğünü ve vücuttaki emilim oranını iyileştirmek bu teknolojinin öne çıkan yararları arasında yer almaktadır. Bu sayede, aktif bileşenler doğrudan hedef dokuya ulaşarak, etkilerini daha spesifik bir şekilde göstermekte ve yan etkileri minimuma indirmektedir. Ayrıca, ilaçların vücutta salınımı daha dengeli bir hale gelerek, hasta tarafından ilaç alımının daha seyrek yapılmasına olanak tanımaktadır ki bu da hastaların tedaviye uyumunu ciddi şekilde artırmaktadır. Ancak, nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesi ve üretimi, teknik ve mali

açından bazı zorlukları da kapsamaktadır. Bu sistemlerin üretimi için ileri düzey teknikler gerektiğinden, üretim maliyetleri önemli ölçüde artabilmektedir. Aynı zamanda NP'lerin fiziksel ve kimyasal stabilitesi büyük bir dikkat ve özen gerektirmektedir. Bu da ilacın depolanması ve taşınması sırasında bazı ekstra zorluklara neden olabilmektedir. Güvenlik açısından da NP'lerin potansiyel toksisite riskleri ve vücut içinde birikim yapabilmeye ihtimali, bu teknolojinin kullanımını sınırlayıcı faktörler arasında yer almaktadır. Tüm bu faktörler, nanopartiküler ilaçların piyasaya sürülmesi sürecini uzatabilmekte ve ilaç geliştirme maliyetlerini yükseltmektedir (Öztürk, A. A., Yenilmez, E., & Özarda, M. G., 2019).

Nano taşıyıcı sistemlerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri, hastalıkların önlenmesi, teşhisi ve tedavisinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Shen ve Burgess, 2013; Kammari vd., 2017; Hami, 2021). NP'ler gibi sistemler sayesinde, ilaçlar belirli organlara, hücrelere veya hücre içi organellere daha doğrudan yönlendirilerek, istenen süre ve düzeyde etkin madde salımı ile hem ilacın etkinliği artırılmakta hem de yan etkiler asgariye indirilmektedir (Ventola, 2017). Bu tür nanopartiküler sistemler arasında nanosüspansiyonlar, nanoemülsiyonlar, PNP'ler, katı lipit NP'ler ve lipozomlar bulunmaktadır (Gregoriadis ve Perrie, 2010). Bu sistemlerden yapılan ilaç salımı, ilacın güvenliği, etkinliği ve kalitesinin değerlendirilmesi açısından hayati bir adımdır ve geliştirilen formülasyonların *in vitro* performansının değerlendirilmesi ile ilacın *in vivo* davranışının modellenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, Nanopartiküler bir ilaç sisteminin geliştirilmesinde, ilaç salımının uygun test yöntemleri ile değerlendirilmesi kritik öneme sahiptir (Souza, 2014; Gupta vd., 2021).

### **2.3.1. Nanopartiküler Sistemlerde *İn Vitro* Salım**

İlaç salım profilleri, bir ilacın vücuttaki davranışı hakkında kritik bilgiler sağlar ve ilacın güvenliği ve etkinliği üzerine çalışmalar için temel oluşturur. *İn vitro* salım profilleri, ilacın vücuttaki muhtemel etkilerini tahmin etmek için kullanılır (FDA, 1997). Amidon vd. tarafından 1995'te geliştirilen Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi, ilaçların çözünürlük ve geçirgenlik özelliklerine dayanarak, ilaçların *in vivo* davranışını *in vitro* testlerle tahmin etmeyi amaçlar. Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi kullanılarak yapılan *in vitro* salım çalışmaları, *in vivo* çalışmaları azaltmaya ve *in vitro* - *in vivo* korelasyonu sağlayarak biyodeşdeğerlik çalışmalarına dair muafiyetlerin belirlenmesine olanak tanır (Wallace vd., 2012).

Farmasötik sektörde, *in vitro* salım testleri, dozaj formlarının geliştirilmesi ve kalite kontrolünde kritik bir role sahiptir. Bu testler ayrıca ilaçların *in vivo* etkililiği hakkında da önemli bilgiler sunar. 1971 yılında Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) tarafından sepet yöntemi (USP aparat 1) resmi bir salım testi olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem, 1978'de palet yöntemi (USP aparat 2) ve 1985'te ilaç salımı hakkında genel bir bölümün USP 21'de yayımlanması, 1990'da USP 22-NF 18'de modifiye salım sağlayan dozaj formları için 23 adet monografinin yer alması, 1991'de uzatılmış salım sağlayan ilaçlar için pistonlu silindir (USP aparat 3) ve 1995 yılında uzatılmış salım sağlayan ilaçlar için sürekli akış hücresinin (USP aparat 4) kabul edilmesiyle devam etmiştir. Başarılı salım profilleri elde etmek için, salım test yöntemlerinin dikkatlice seçilmesi ve tasarlanması şarttır. Bu bağlamda, *in vitro* salım testi yapılırken dikkate alınması gereken önemli hususlar şunlardır (USP 43, 2019):

- Seçilecek salım ortamının içeriği ve hacmi, ilacın fizikokimyasal özelliklerine, dozaj şekline ve uygulama sıklığına uygun olmalıdır.
- Sink koşullarının oluşturulması tavsiye edilir ancak zorunlu değildir. Sink koşulu, test sonunda salım ortamındaki etkin maddenin, doygunluk konsantrasyonunun %30'unu aşmamasını ifade eder (EMA/CHMP/WQP, 2014).
- Genellikle sulu ortamlar tercih edilmeli ve ilk değerlendirmeler fizyolojik pH değerlerinde yapılmalıdır. Yüzey aktif madde kullanımı kaçınılmalı, kullanılması gerekiyorsa nedenleri açıkça belirtilmelidir. Örneğin, suda zayıf çözünen maddeler için yeterli çözünürlük sağlamak amacıyla kullanılabilir. Yüzey aktif maddenin konsantrasyonu olabildiğince düşük tutulmalı ve kullanımı çözünürlük verileri ve bilimsel kanıtlarla desteklenmelidir.
- *İn vitro* salım testi için kullanılacak aparatın seçimi gerekçelendirilmelidir. Palet aparatı kullanılan metodlarda başlangıçta 50 rpm'de karıştırılmalı, sepet aparatı kullanılanlarda ise 100 rpm karıştırma hızı önerilir. Gerekçelendirilmiş durumlarda daha yüksek karıştırma hızları veya farklı boyutlarda sepetler kullanılabilir.
- *İn vitro* salım testi prosedürünün geliştirilmesi sırasında, metod parametrelerinin sonuçlardaki değişkenlik üzerindeki etkisi incelenmeli ve minimize edilmelidir.

Farmakopelerde sunulan test yöntemleri arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Avrupa Farmakopesi, katı dozaj şekilleri için sepet (aparat 1), palet (aparat 2), pistonlu silindir (aparat 3), ve sürekli akış hücresi (aparat 4) gibi çeşitli metodları önermektedir. Ayrıca, transdermal yamalar için disk üzerinde palet, hücre ve dönen silindir gibi aparatlar; ilaçlı sakızlar için ise çiğnemeyi taklit eden sakız makineleri önerilmektedir (European Pharmacopoeia, 2019).

Amerikan Farmakopesi, hemen salım, uzatılmış salım ve geciktirilmiş salım sağlayan dozaj şekilleri için, sepet (aparat 1), palet (aparat 2), pistonlu silindir (aparat 3), sürekli akış hücresi (aparat 4) gibi aparatların kullanılmasını önermektedir. Transdermal yamalar için disk üzerinde palet (aparat 5), dönen silindir (aparat 6), ve aşağı-yukarı hareket eden örnek tutucu (aparat 7) yöntemleri önerilir (USP, 43, 2019).

Türk Farmakopesi, ilaç salım çalışmalarını; katı dozaj şekilleri, transdermal yamalar ve lipofilik katı dozaj şekilleri olmak üzere üç farklı başlık altında sunar. Konvansiyonel ve modifiye salım sağlayan dozaj şekilleri ile transdermal yamalar için Avrupa Farmakopesi ile uyumlu aparatlar önerilirken, lipofilik katı dozaj şekilleri için sürekli akış hücresi önerilir (TFA, 2017).

İlaç salım yöntemlerinin ve koşullarının belirlenmesi, ilacın ve dozaj formunun özelliklerine bağlı olarak yapılır. Ayrıca bazı farmakopelerde (örneğin, USP) belirli dozaj formlarına yönelik monograflar da yer almaktadır. Genellikle bu monograflara uyulması gerekmektedir. Ancak nanopartiküler sistemler için mevcut farmakopelerde resmi bir *in vitro* salım testi bulunmamaktadır. NP'lerin davranışını incelemek için kullanılacak bir *in vitro* salım testi geliştirirken, uygun aparatın ve salım koşullarının (salım ortamı, karıştırma yöntemi vb.) doğru seçilmesi büyük önem taşır. Seçim, ilacın uygulanacağı bölge ve formülasyonun etki alanı dikkate alınarak yapılmalıdır, ancak Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin karmaşık yapısı nedeniyle *in vivo* koşulların tam olarak simüle edilmesi oldukça zordur (Siewert vd., 2003).

*In vitro* salım testleri, sadece ilaç kalitesini ve performansını değerlendirmek için değil, aynı zamanda nanopartiküler sistemlerin geliştirilme aşamalarında da önemli bir araçtır. NP'ler için düzenleyici otoriteler tarafından onaylanmış resmi salım testleri bulunmadığından, mevcut farmakope yöntemlerinin uyarlanması veya modifiye edilmesi yaygın bir yaklaşımdır (Gupta vd., 2021). Yapılan birçok çalışmada, USP aparat 2 (palet), USP aparat 4 (akış hücresi) ve modifiye edilmiş akış hücresi, nanopartiküler sistemlerden ilacın *in vitro* salımını test etmek amacıyla kullanılmıştır (Wang vd., 2014). NP'lerin *in*

*vitro* salımında kullanılan akış hücresinde, hücrenin çapı ve reseptör bölmesinin hacmi gibi parametreler ayarlanmış, salım ortamının akış hızı ise oldukça düşük tutulmuştur. Nanopartiküler sistemlerde en sık karşılaşılan sorunlardan biri, partiküllerin topaklanmasıdır (agregasyon). Bu sorunun önüne geçmek için salım testi sırasında karıştırma hızının, örnek alma yöntemlerinin (örneğin, santrifüj, ultrasantrifüj, filtrasyon vb.) ve test metodunun dikkatlice seçilmesi gerekmektedir (Barzegar-Jalali vd., 2012). Bu kapsamda, sürekli akış hücresine cam boncuklar eklenmesi, agregasyonun önlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir (Brown vd., 2011).

Nanopartiküler sistemlerde *in vitro* salım testleri genellikle uzun süreli (örneğin birkaç hafta) olarak yürütüldüğü için, bu süreçte buharlaşmayı önlemek adına önlemler alınmalıdır. Ayrıca mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için test ortamına uygun koruyucular eklenebilir. Metil paraben, etil paraben, sorbik asit, sodyum benzoat gibi birçok antimikrobiyal madde bu amaçla kullanılabilir. Ancak bu maddelerin etkinliklerinin yanı sıra formülasyon bileşenleri ve test ortamının pH'sı ile uyumlu olması da dikkate alınmalıdır. Antimikrobiyallerin seçimi sırasında iyonizasyon özellikleri, fizikokimyasal etkileşimler ve analitik girişimler de göz önünde bulundurulmalıdır (Brown vd., 2011).

Salım ortamının içeriği belirlenirken, ilacın uygulanacağı bölgedeki sıvıların ozmolaritesi, pH'sı ve tampon kapasitesi dikkate alınmalıdır (Faisant vd., 2006). Ayrıca, salım profilinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için uygun test süresi ve örnekleme aralıkları titizlikle seçilmelidir. Yüksek sıcaklık veya pH gibi hızlandırılmış koşullarda yapılan salım testlerinin de başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Tomic vd., 2016).

Nanopartiküler sistemlerden ilaç salımı test etmede üç ana yöntem öne çıkar: i) örnek alma ve ayırma, ii) sürekli akış, ve iii) membran difüzyon. Araştırmalar genellikle bu yöntemlerin çeşitli kombinasyonlarını kullanmıştır (Joshi vd., 2008).

PNP'lerin salımını değerlendirmek için sıklıkla tercih edilen bu yöntemler, basitlikleri ve uygulama kolaylıkları sebebiyle popülerdir. Bu testlerde, Nanopartiküler taşıyıcı sistemler, sabit bir sıcaklıkta muhafaza edilen bir salım ortamına eklenir. Belirlenen zaman aralıklarında, salım ortamından alınan örnekler (süzüntü veya süpernatant) üzerinden ilacın salınan miktarı ölçülür. Salınmayan aktif madde miktarı hesaplanarak, toplam ilaç miktarından çıkarılır ve böylece salınan ilaç miktarı belirlenir. Kullanılan düzenekler, karıştırma mekanizmaları (mıknatıslı karıştırıcı, palet, çalkalayıcı, sepet vb.), salım ortamı içeriği, nanopartiküler sistemlerin konulduğu kaplar, örnek hacimleri ve

örnek alma teknikleri açısından farklılık göstermektedir. Salım çalışmalarının gerçekleştirildiği kapların tipi, gerekli ortam hacmine bağlı olarak seçilir. Genellikle, 10 mL'den az hacimler için flakon, 100-400 mL arasındaki daha büyük hacimler için ise şişe veya flask kullanılır (Yen vd., 2001). Nanopartiküler sistemlerin agregasyonunu önlemek ve islanmayı artırmak için salım ortamının karıştırılması büyük önem taşır. Büyük hacimler için çoğunlukla USP aparat 1 veya USP aparat 2 tercih edilirken, 10 mL'den küçük hacimlerde flakonlarda salım ortamını karıştırmak için manyetik karıştırıcılar veya orbital çalkalayıcılar gibi alternatif yöntemler kullanılmaktadır (Prabha ve Labhasetwar, 2004).

### **2.3.1.1. Nanopartiküler Sistemlerde *In Vitro* Salım Yöntemleri**

İlaç salımının değerlendirilmesinde kullanılan örnek alma ve ayırma yöntemleri, örnek alma sonrası yapılan ayırma prosedürlerini kritik bir bileşen olarak içermektedir. Araştırmalar genellikle, örnekleme sonrası nanopartiküler sistemler ile salım ortamını ayırmak için, uygun gözenek boyutlarına sahip polimerik membran filtrelerle filtrasyon yöntemini kullanmıştır (Zhang vd., 2014). Bunun yanı sıra, nanopartiküler sistemlerin küçük boyutları, santrifüjleme, ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon ve basınç altında ultrafiltrasyon gibi yüksek enerjili ayırma tekniklerinin sıklıkla kullanılmasına neden olmaktadır (Guo vd., 2015). Salım ortamından belirli zamanlarda alınan örneklerde, santrifüjleme en yaygın kullanılan yüksek enerjili ayırma tekniğidir ve bu yöntemle süpernatantta kalan veya çökende bulunan ilaç miktarı tespit edilir. Örneğin, selekoksib içeren bir Nanopartiküler sistemden ilaç salımı testinde, alınan örnekler 0.45 µm'lik membran filtreler kullanılarak fiziksel olarak ayrılmıştır (Zhan vd., 2014). Büyük moleküller için, örneğin insülin veya DNA, genellikle ultrasantrifüj veya santrifüj gibi yüksek enerjili ayırma teknikleri tercih edilir (Prabha vd., 2002). Başka bir yöntem olan basınçlı ultrafiltrasyon, nanopartiküler sistemlerin salım ortamından hızlıca ayrılmasını sağlamak için kullanılmıştır, bu işlem 5 dakika içinde tamamlanabilmektedir (Yue vd., 2009).

#### **2.3.1.1.1. Örnek Alma ve Ayırma Yöntemi**

Örnek alma ve ayırma yöntemi ile ilaç salımının doğrudan belirlenmesi mümkündür, ancak bu süreçte agregasyon gibi sorunlar yaşanabilmektedir. Ayrıca, filtrasyon sırasında filtre tıkanıklığı veya ilaç maddelerinin filtreye adsorpsiyonu gibi problemler ortaya çıkabilmekte ve filtrelerin önceden doyurulması gerekmektedir (Heng vd., 2008). Yüksek enerjili ayırma işlemlerinde ise ilacın salımı devam ettiği için sorunlar yaşanabilmektedir.

Kolistin yüklü lipozomların geliştirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada, ilacı nanopartiküler sistemden ayırmak için farklı ayırma teknikleri uygulanmış ve basınçlı ultrafiltrasyon en etkili yöntem olarak belirlenmiştir. 300.000 x g'de 8 saat süren ultrasantrifüj işlemi bile kolistin yüklü lipozomları tamamen ayırmaya yetmemiştir. Uzun süreli ve yüksek hızda gerçekleştirilen yüksek enerjili ayırma işlemleri, NP'lerin stabilitesini bozabilmekte ve ilaç salımını değiştirebilmektedir. Bu sebeple, nanopartiküler sistemlerin salım ortamından doğru ve tam şekilde ayrılmasını sağlamak ve sürecin optimizasyonu kritik önem taşımaktadır. (Fan vd., 2021).

### **2.3.1.1.2. Membran Difüzyon Yöntemi**

Membran difüzyon yönteminde ise, ilaç yüklü nanopartiküler sistemler, belirli bir moleküler ağırlık kesme değerine sahip diyaliz membranları ile fiziksel olarak salım ortamından ayrılır. Bu sistem, donör bölüme yerleştirilen NP'den salınan ilaçlar, membranı geçerek reseptör bölümüne difüze olur ve belirlenen zamanlarda reseptör tarafından alınan örneklerle ilaç miktarı ölçülür. Bu yöntem bazı çalışmalarda diyaliz olarak adlandırılır ve kullanılan diyaliz membranı ilacı geçirirken, nanopartiküler sistemi geçirmez. Bu, örnek alma ve ayrıştırma yönteminden farklı olarak, nanopartiküler sistemlerin salım ortamından uzaklaştırılmasını gerektirmez (Amatya vd., 2013).

Membran difüzyon yöntemi, lipozomlar, PNP'ler ve lipid nanotaşıyıcılar için ilaç salım profillerini değerlendirmek amacıyla geniş çapta kullanılmaktadır. Bu metodun temel parametreleri arasında, karıştırma koşulları, donör ve reseptör hücrelerin hacim oranları ve kullanılan diyaliz membranının moleküler ağırlık kesme değeri (MWCO) yer alır (Zafar vd., 2022). Seçilen diyaliz membranının gözenek boyutu, ilacın serbestçe difüze olabileceği, fakat nanopartiküler sistemlerin geçemeyeceği büyüklükte olmalıdır (Moreno-Bautista ve Tam, 2011). Membran difüzyon yöntemi ile yürütülen *in vitro* salım çalışmalarında, çok yüksek MWCO değerlerine sahip membranların kullanılması hem ilacın hem de nanopartiküler sistemlerin membranlardan geçişine olanak sağlar. Bu sebeple, membran MWCO değerinin seçimi kritik önem taşır. Tenofovir içeren lipozom formülasyonları üzerine yapılan bir çalışmada, 20 kDa, 25 kDa ve 50 kDa MWCO değerlerine sahip membranlar kullanılarak *in vitro* salım testleri yapılmıştır. 20 kDa'lık membran ilacın salımını kısıtlarken, 25 kDa'lık membran daha uygun salım sağlamış, 50 kDa ile ise 25 kDa'ya göre anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir, bu nedenle ilacın moleküler ağırlığının yaklaşık 100 katı kadar bir MWCO değerinin tercih edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Diyaliz membranının iç hacminin, dış ortamın hacminden

en az 6-10 kat daha az olması önerilerek, diyaliz membranı boyunca ilaç taşınmasında bir itici güç sağlanması önerilmektedir. İn vitro salım testine başlamadan önce, ilacın polimere veya diyaliz membranına bağlanma potansiyelinin kontrol edilmesi gerekmekte, gerekirse farklı bir membran seçilmelidir. İlaçların membrandan difüzyonunu sağlayacak, ancak in geçişine izin vermeyecek uygun bir gözenek boyutuna sahip membran kullanılması önemlidir.

Membran difüzyon yöntemi, diyaliz kesesi, ters diyaliz kesesi ve yan yana diyaliz şeklinde uygulanabilir (D'Souza ve De Luca, 2006). Diyaliz kesesi yönteminde, nanopartiküler sistemler bir diyaliz kesesi içine konularak (donör), daha geniş bir salım ortamı içeren kaba (reseptör) yerleştirilir. Bu teknikte, nanopartiküler sistemden salınan ilaç, diyaliz membranı yoluyla reseptör bölme difüze olur. Karıştırma işlemi yalnızca dış ortamda gerçekleştirilir. Diyaliz keseleri, USP aparat 1 ve USP aparat 2 ile birleştirilerek kullanılabilir. İtici gücün sağlanması için diyaliz kesesinin iç hacmi, dış ortamın hacminden önemli ölçüde daha küçük olmalıdır. Buna göre, diyaliz kesesinin yerleştirildiği kabın boyutu, gereken toplam salım ortamı hacmi dikkate alınarak seçilmelidir (Bhagav vd., 2011).

#### **2.3.1.1.3. Ters Diyaliz Kesesi Yöntemi**

Ters diyaliz kesesi yöntemi, standart diyaliz kesesi yönteminin bir varyasyonudur ve bu uygulamada nanopartiküler sistemler diyaliz kesesinin dışında (donör) konumlandırılır, örnekler ise kesenin içinden (reseptör) alınır. Bu yöntemin avantajı, donör bölgesinde yapılan karıştırma işlemi sayesinde nanopartiküler sistemlerin agregasyonunun engellenmesidir. Ancak, bu metodun bir dezavantajı olarak, dış ortamın hacminin iç ortamdaki daha büyük olması, analiz sonuçlarının ayırt ediciliğini düşürür. Yan yana diyaliz yöntemi, iki eşit hacimli bölme arasına yerleştirilmiş bir diyaliz membranıyla ayırır ve her iki taraf da karıştırılır. Belirli zamanlarda alınan örnekler, alınan hacim kadar taze salım ortamı ilavesiyle sink koşullarının sağlanması ile analiz edilir. Bazı durumlarda, yan yana diyaliz metodunun bir modifikasyonu olan cam sepet diyaliz yöntemi kullanılır. Bu yöntemde, USP aparat 1'in sepeti camla çevrili olup, diyaliz membranı ile kapatılmıştır. Genellikle lipid bazlı nanosistemlerin (örneğin lipit nanokapsüller ve lipozomlar) *in vitro* salım testi için kullanılan bu methoda sink koşulu sağlanamaz (Abdel-Mottaleb vd., 2010).

#### **2.3.1.1.4. Sürekli Akış Yöntemi**

Sürekli akış yöntemi (USP aparat 4), Nanopartiküler sistem içeren küçük bir hücre, bir salım ortamı rezervuarı, bir pompa ve bu pompa ile salım ortamının hücre içinden geçtiği bir akış hücresinden oluşan bir sistemle donatılmıştır. Bu USP aparatı, modifiye salım sağlayan oral dozaj şekillerinin *in vitro* salım testleri için tasarlanmış olup, çeşitli dozaj şekilleri için de uygulanabilir, çünkü akış hızı, hücre tipleri ve salım ortamı hacmi gibi parametrelerin esnekliği nedeniyle adapte edilebilir. Bu yöntemde, ilaç salımı, Nanopartiküler sistem içeren hücreden sürekli dolaşan salım ortamında gerçekleşir ve elüent periyodik olarak toplanıp analiz edilir (Kim vd., 2021).

Sürekli akış yöntemi, nanopartiküler sistemlerde ilaç salımını değerlendirmek için örnek alma ve ayırma ile membran difüzyon yöntemlerine kıyasla daha az tercih edilir. Bu yöntemde, salım ortamının sirkülasyon hızı, pompa tipine (şırınga veya peristaltik gibi) ve kullanılan filtre türüne bağlı olarak düzenlenir. Nano partiküler sistemlerden ilacın yavaş veya eksik salımı, düşük akış hızlarından kaynaklanan bir problem olarak rapor edilmiştir. İki ana akış sistemi olan kapalı ve açık sistemler tercih edilebilir. Kapalı sistemde, ilaç yüklü Nanopartiküler sistem içeren hücreden sürekli olarak geçen salım ortamında, belirli zaman dilimleri boyunca ilaç salımı izlenir. Açık sistemde ise, örnek toplayıcı kullanılır ve belirli zamanlarda salım ortamı, bir kez Nanopartiküler sistem içeren hücreden geçerek toplanır (Rawat vd., 2012). Açık sistemde, belirli aralıklarla alınan örnekler kümülatif olmayan ilaç miktarını, kapalı sistem ise kümülatif ilaç miktarını verir. Her iki sistemde de ekipmanın otomasyonu, sürekli akış yöntemini kullanarak rutin örnek alma ve ortam değişimini kolaylaştırır. Ancak, sürekli akış yöntemi, cihaz maliyetlerinin yüksekliği, kurulum zorlukları, hücrelerdeki filtrelerin tıkanması, ilacın filtre veya cam boncuklara adsorpsiyonu ve akış hızını sabit tutma güçlükleri gibi dezavantajlara sahiptir (D'Souza, 2014).

#### **2.3.1.2. Nanopartiküler Sistemlerde *İn Vitro* Salım Yöntem Üstünlükleri ve Sakıncaları**

Nanopartiküler sistemlerin *in vitro* salım testleri için yöntem ve koşulların doğru seçilmesi, sağlıklı sonuçlar elde etmek açısından büyük önem taşır. Çeşitli çalışmalar, kullanılan yöntemlerin avantajları ve dezavantajlarını değerlendirerek en uygun ve güvenilir yöntemi belirlemeyi amaçlamıştır. Örnek alma ve ayırma yöntemlerinde, örnekleme ve karıştırma tipinin seçimi, ilaç salımının doğru şekilde analiz edilmesi için

kritik basamakları oluşturur. Örnek ayırma yöntemi (örneğin, santrifüj veya ultrasantrifüj), Nanopartiküler İTS'lerin zarar görmemesi ve salımın etkilenmemesi için dikkatle seçilmelidir. Yüksek enerjili ayırma tekniklerinin, özellikle lipozom veya emülsiyon gibi İTS'lerin stabilitesini bozabileceği ve salım profilini değiştirebileceği dikkate alınmalıdır.

Membran difüzyon yönteminde ise, seçilen membranın MWCO değeri, Nanopartiküler sistem ve ilaç maddesi ile uyumlu olmalı ve etkin madde difüzyonunu engellememelidir. Ayrıca, diyaliz kesesinin iç hacmi, dış ortamın hacminden önemli ölçüde daha küçük olmalıdır, bu, membran boyunca ilacın difüzyonu için gerekli itici gücü sağlar (Farooq vd., 2019).

Sürekli akış hücresi yönteminin uygulanmasında, filtrelerin tıkanmaması ve akış hızının düzenlenmesi hayati önem taşır. Bu yöntemde, Nanopartiküler İTS'lerin 1 mm çapında cam boncuklarla birlikte sürekli akış hücresine eklenmesi ve akış hızının çeşitli hızlarda test edilerek optimizasyonun yapılması önerilmektedir.

Örnek alma ve ayırma yöntemi, kullanım kolaylığı açısından en basit yöntemdir. Bu yöntem, özellikle ani salımın (burst-out) tespiti için idealdir, fakat örnekleme işlemi zahmetli olabilir ve NP'lerin istenmeyen şekilde ortamdan uzaklaştırılma riski taşır. Membran difüzyon yönteminde, ilaç salımını Nanopartiküler sistemden ayırma işlemi için zaman alıcı bir sürece ihtiyaç duyulmaz çünkü nanopartiküler sistemler ve salınan ilaç zaten fiziksel olarak bir membranla ayrılmıştır, bu da örnekleme sırasında NP kaybını minimize eder. Ancak, bu yöntemin dezavantajı, diyaliz kesesinin doğal bariyer özellikleri nedeniyle, iç ve dış ortam arasındaki dengenin yavaş sağlanmasıdır, bu da özellikle ani salımlı formülasyonlarda başlangıç ilaç seviyelerinin doğru analizini sınırlayabilir (Wallenwein vd., 2019). Eğer ilaç ve Nanopartiküler sistem membran ile uyumlu değilse, bu yöntem uygulanamaz. Sürekli akış yöntemi ise, USP aparat 4 kullanılarak otomatik bir süreç olarak gerçekleştirilir, bu da önemli avantajlar sunar. Örnek alma ve ayırma ile membran difüzyon yöntemlerinde ise örnek alma işlemi otomatik olmayıp, emek gerektirir. Sürekli akış yöntemi ile ilacın salımı saniyeler veya dakikalar içinde otomatik olarak sürekli olarak örneklenip analiz edilebilir. Sürekli akış yönteminin dezavantajları arasında maliyetin yüksek olması ve filtrelerin arızalanma riski bulunur (Kin vd., 2021).

Gite ve arkadaşları, atorvastatin içeren nanopartiküler sistemlerden *in vitro* ilaç salımını incelemek için sürekli akış ve diyaliz kesesi yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Diyaliz

kesesi yönteminde, USP aparat 1 (sepet) kullanılarak, %1,5 SLS içeren pH 6,8 fosfat tamponunda NP'ler  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de süspande edilmiş ve farklı karıştırma hızlarında (75 rpm, 100 rpm, 125 rpm) *in vitro* salımı incelenmiştir. Farklı karıştırma hızlarının salım profiline anlamlı bir etki yapmadığı görülmüş ve ilacın %68'inden fazlasının salınmaması, diyaliz membranının salımı engellediği düşüncesiyle, ilacın tam salınımını sağlamak için sürekli akış yöntemine geçilmiştir. Sürekli akış yönteminde ise, aynı tampon farklı akış hızlarında (8 mL/dak., 16 mL/dak.) pompalanmış; kapalı tip sürekli akış hücresinde 60 dakika boyunca örnekler alınıp analiz edilmiş ve 60 dakika sonunda ilacın %65'inden fazlasının salınmadığı görülmüştür. Akış hızının salım profiline anlamlı bir etki yapmadığı anlaşılmıştır. Bu sebeple, sürekli akış hücresi yönteminde yapılan modifikasyonla, Nanopartiküler sistemin sürekli akış hücresine 1 mm'lik cam boncuklarla eklenmesi ile ilacın %100'ünün salınması sağlanmıştır (Gite vd., 2016).

Bir araştırmada, E vitamini içeren nanoemülsiyonların ilaç salımı, diyaliz kesesi, ters diyaliz kesesi ve sürekli akış hücresi yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Seçilen salım ortamı, derinin fizikokimyasal özelliklerine uygun %2 Labrasol içeren asetat tamponu (pH 5.5) olup, sıcaklık  $32 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  olarak ayarlanmıştır. Diyaliz kesesi yöntemiyle, 50 kDa ve 100 kDa MWCO değerleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmediği için, çalışmalarda 50 kDa MWCO membran kullanılmıştır. Diyaliz kesesi yönteminde E vitamini nanoemülsiyonları, 24 saat boyunca salım ortamında bekletildikten sonra 200 mL'lik diyaliz kesesine konulmuş ve 100 rpm'de su banyosunda karıştırılmıştır. Ters diyaliz kesesi yönteminde ise, aynı koşullar altında, nanoemülsiyonlar kesenin dışına yerleştirilmiş ve sink koşul sağlanmıştır. Sürekli akış hücresi yöntemi de benzer sıcaklık, tampon ve sink koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmalar, diyaliz kesesi yöntemiyle elde edilen E vitamini salımının, diğer iki yönteme kıyasla daha yavaş olduğunu; ters diyaliz kesesi ve sürekli akış yöntemleriyle elde edilen salım profillerinin ise benzer olduğunu ortaya koymuştur (Morais ve Burgess, 2014).

Manna vd., bupivakain içeren çok tabakalı lipozomların salımını değerlendirmek üzere uygun *in vitro* salım yöntemini geliştirmeyi amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, diyaliz kesesi yöntemi, ters diyaliz kesesi yöntemi ve çalkalayıcı kullanılarak örnek alma ve ayırma yöntemi karşılaştırılmıştır. Diyaliz kesesi yöntemi, 10 kDa'dan 100 kDa'ya kadar farklı MWCO değerlerine sahip membranlarla test edilmiş, her membran %0.5 Sodyum dodesil sülfat (SDS) içinde bekletilmiş ve ardından su ile yıkanmıştır. Bupivakain içeren lipozomlar, 200 mL fosfat tamponu içeren ve USP 2 (palet) ile

karıştırılan ortama diyaliz keseleri içinde eklenmiş ve belirli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. MWCO değerinin artışıyla difüzyon hızının arttığı görülmüş ve difüzyonun kısıtlanmaması için en yüksek MWCO değerine sahip (100 kDa) membranla devam edilmiştir. Ters diyaliz kesesi yönteminde, lipozomlar salım ortamına eklenmiş ve 100 kDa MWCO membrana sahip diyaliz kesesi içinden belirli zamanlarda örnekler alınmıştır. Örnek alma ve ayırma yönteminde ise, lipozomlar farklı açılarda (yatay, dikey, 45 derece) 12 rpm hızında karıştırılarak, belirli zamanlarda alınan örnekler, santrifüj edildikten sonra süpernatantlarda salınan etkin madde miktarı tayin edilmiştir. Çalışmada dikey karıştırmanın, yatay ve 45 derece pozisyonlarına göre daha hızlı salım sağladığı belirlenmiş ve en uygun karıştırma pozisyonu olarak dikey karıştırma seçilmiştir (Manna vd., 2019).

## **2.4. Polimerik NP'ler (PNP)**

### **2.4.1. Polimerik NP hazırlama yöntemleri**

#### **2.4.1.1. Nanoçöktürme yöntemi**

Nanoçöktürme yöntemi, bir polimerin çözücü olmayan bir fazda doğal olarak çökmesi esasına dayanarak küçük boyutlu ve homojen dağılıma sahip NP'ler üretmek için kullanılan basit, etkili ve güvenilir bir tekniktir. Bu yaklaşım, organik bir fazın su bazlı ortamda kendiliğinden emülsifiye olmasına bağlıdır (Hickey vd., 2015). Bir organik çözücü içerisinde çözünen polimer, su içerikli bir faza yavaşça eklenir ve bu, iki faz arasındaki yüzey geriliminin azalmasıyla organik çözücünün su fazına hızlı geçişini sağlar, böylece polimerin NP olarak çökmesine yol açar. Bu süreç, polimerin konsantrasyonu, karıştırma hızı, fazların enjeksiyon hızı ve çözücülerin özellikleri gibi faktörlere duyarlıdır. Uygun polimer, çözücü ve çözücü olmayan faz kombinasyonunun seçimi bu yöntemde kritik öneme sahiptir (Nasir vd., 2015)

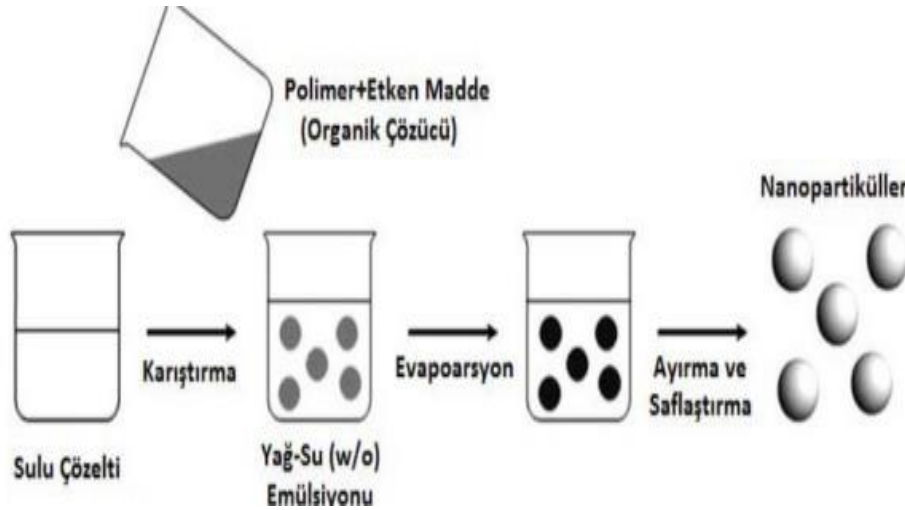
#### **2.4.1.2. Emülsifikasyon – çözücü uçurma yöntemi**

Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi, NP üretimi için ilk geliştirilen yöntemlerden biridir ve Çomoğlu (2010) tarafından açıklanmıştır. Bu yöntem, bir emülsiyonun oluşumu ardından içerisindeki çözücünün buharlaştırılması esasına dayanır. Hidrofobik ya da hidrofilik etkin maddelerin özelliklerine bağlı olarak farklı uygulamalar mevcuttur (Benita, 2005). Örneğin, hidrofobik etkin maddeler için tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği tercih edilir. İlk adımda, polimerler bir organik çözücüde çözülür ve bu çözelti, yağ fazı olarak bilinen organik faza dönüşür. Daha sonra, bu organik faz

sulu bir çözelti içerisinde emülsifiye edilir (Derman vd., 2013). Polimer çözeltisi, bir dispersiyon ajanı ve yüksek enerjili bir homojenizatör yardımıyla nanometre boyutunda damlacıklar halinde dağıtılır. Polimer çözeltisinin sulu faza emülsifiye edilmesi sonrasında, polimer solventi yüksek sıcaklıkta veya sürekli karıştırarak uygulanan basınç altında buharlaştırılır, sonuçta kalan katı nanoküreler polimerin çökmesine neden olur. Bu NP'ler daha sonra ultrasantrifüj kullanılarak toplanır, safsızlıkları gidermek için distile su ile yıkanır ve liyofilize edilerek saklanır. Tekli emülsiyon ile NP elde etme süreci, partikül boyutunun ayarlanmasında karıştırma hızı, dispersiyon maddenin cinsi ve miktarı, organik ve sulu fazların viskoziteleri ve sıcaklık gibi faktörler önemlidir (Reis vd., 2006).

### Şekil 2.11

*Tekli Emülsiyon S/Y Çözücü Buharlaştırma Yöntemi İle NP'lerin Üretimi*



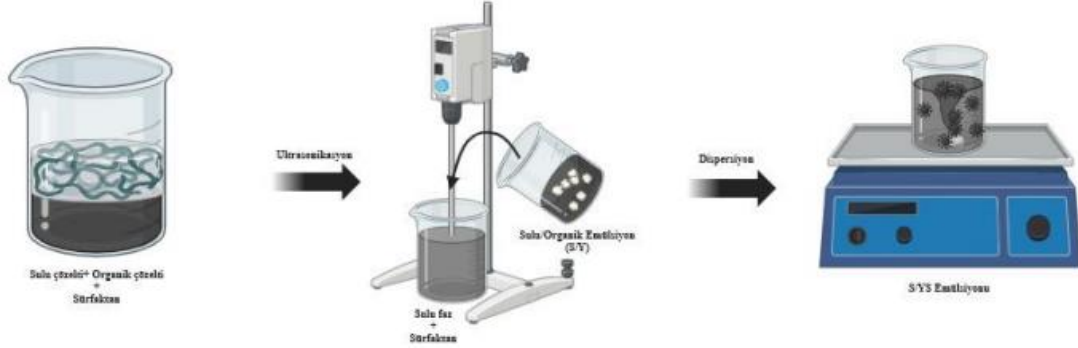
*Kaynak: Derman vd., 2013*

#### 2.4.1.3. Emülsifikasyon – çözücü difüzyonu yöntemi

Hidrofilik etkin maddeler için tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin uygulanabilir olmaması, çift emülsiyon tekniğinin gelişimini tetiklemiştir. Bu teknikte, hidrofilik aktif maddelerin mikro ve NP'leri üretilebilmektedir. Bu yöntem, sulu aktif madde fazının bir organik polimer çözeltisi ile yoğun bir şekilde çalkalanarak su/yağ emülsiyonu oluşturulması prensibine dayanır. Oluşturulan bu emülsiyon, karıştırılarak bir ikinci sulu faza ilave edilir ve bu şekilde su/yağ/su tipinde bir çoklu emülsiyon meydana getirilir. İkili emülsiyondan çözücünün buharlaştırılmasıyla polimerler çöker ve NP'ler yüksek hızda santrifüjle ayrıştırılır. Sonrasında, bu NP'lerin yıkama işlemleri yapılarak liyofilizasyon ile kurutulur (Couvreur vd., 2002; Vandervoort vd., 2002; Pal vd., 2011).

## Şekil 2.12

### Çift Emülsiyon S/Y/S Yöntemi ile NP'lerin Üretimi



#### 2.4.1.4. Tuz ile çöktürme (salting out) yöntemi

Tuz çöktürme yöntemi, protein çözünürlüğünü azaltarak protein elde etme sürecine dayanır ve yüksek tuz konsantrasyonlarının iyonik şiddeti artırarak proteinlerin çökmesini sağlar (Bonner, 2007). Bu süreçte, protein çözeltilerine düşük miktarda nötr tuz eklenmesiyle protein çözünürlüğü artabilir; bu durum 'salting in' olarak adlandırılır. Ancak, artan tuz miktarı, proteinlerin iç yapılarında bulunan hidrofobik grupların çevresindeki su moleküllerinin tuz iyonları tarafından uzaklaştırılmasına neden olur, bu da hidrofobik gruplar arasındaki etkileşimleri güçlendirir ve sonuçta proteinlerin çökmesine, yani 'salting out' sürecine yol açar (Righetti vd., 2013). Bu işlemde sıklıkla kullanılan amonyum sülfat, yüksek çözünürlüğü, protein yapısını stabilize etme özelliği, nispeten düşük yoğunluğa sahip olması, uygun maliyetli ve kolay bulunabilir olması gibi avantajlar sunar (Nelson ve Cox, 2005; Burgess, 2009).

Genel olarak, tuz çöktürme yöntemi, proteinleri çözeltilerden çıkarma ve çöktürme olmak üzere iki ana adımdan oluşur. Ekstraksiyon fazında, düşük konsantrasyonlu tuz ilavesiyle proteinlerin çözünürlüğü artırılarak çözeltilere geçirilir. Ardından yüksek konsantrasyonlu tuz eklenerek proteinlerin çözünürlüğü düşürülür ve çöktürme işlemi tamamlanır (Park vd., 2015). Bu yöntemde bir diğer önemli adım, diyaliz ile proteinlerin arındırılmasıdır. Diyaliz, tuz ve diğer istenmeyen bileşikler yarı geçirgen bir zar kullanarak difüzyon yoluyla ayırmaya yarayan bir saflaştırma tekniğidir (Scopes, 2013). Bu süreç, sıklıkla tuz çöktürme sonrasında tuzların giderilmesi ve izoelektrik çöktürme sonrası safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla kullanılır (Hadnadev vd., 2018; Stone vd., 2015; Adebisi vd., 2009).

Amonyum sülfat çöktürme yöntemi, özellikle enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Adetuyi vd., 2018; Li vd., 2018; Zhang vd., 2017; Purwanto, 2016; Mariam vd., 2015; Zhao vd., 2015). Bu yöntem, izoelektrik ve aseton çöktürmesine kıyasla enzim aktivitesinde daha az kayba yol açması nedeniyle, kromatografik yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır (Palmer ve Bonner, 2007).

#### **2.4.1.5. SKA teknolojisi**

Charles Cagniard de la Tour'un 1822'deki deneyleri, sıvı ve gaz fazları arasındaki yoğunluk farkının belirli bir sıcaklıkta ortadan kalktığını ve SKA fazının oluştuğunu göstermiştir. Thomas Andrews, 1869'da kritik noktayı tanımlamış; 1879'da Hannay ve Hogarth, katıların SKA içindeki çözünürlüğünün basınçla arttığını kanıtlamış; Villard ise 1895'te CO<sub>2</sub> ortamında iyotun çözünürlüğünü incelemiştir (Kajimoto, 1999). Bu çalışmalar, SKA'ların ticari uygulamalarını mümkün hale getirmiştir. İlk kullanım alanları ekstraksiyon ve kromatografi gibi ayırma yöntemleri olmuştur (Perrut, 1999).

SKA'lar gıda, ilaç, çevre ve tekstil gibi sektörlerde ekstraksiyon, bileşen ayrıştırma, tablet kaplama ve su arıtma gibi işlemlerde kullanılmaktadır. Ayrıca, SKA'lar çevre dostu nitelikleri nedeniyle yeşil kimya kapsamında değerlendirilmektedir. skCO<sub>2</sub>, düşük toksisite, alev almama ve yeniden kullanılabilirlik gibi avantajlarıyla polimerizasyon reaksiyonlarında çözücü olarak sıkça kullanılmaktadır. Özellikle, floropolimerler ve silikonlar gibi polimerlerin sentezi için uygun bir ortam sağlamaktadır (Bertucco, 1999). SkCO<sub>2</sub>'nin düşük viskozitesi, plastikleştirme kabiliyeti ve monomer uzaklaştırmadaki etkinliği, polimerizasyon süreçlerinde önemli avantajlar sunar. Bunun yanı sıra, emülsiyon ve dispersiyon polimerizasyonunda biyouyumlu yüzey aktif maddeler kullanımı, çevresel etkileri azaltmada kritik bir rol oynamaktadır. SkCO<sub>2</sub> ile yapılan polimerizasyonlar, geleneksel çözücülere göre daha güvenilir ve sürdürülebilir bir seçenek sunmaktadır (Kendall vd., 1999).

#### **2.4.1.6. Koaservasyon yöntemi**

Koaservasyon yöntemi, Green ve Scheicer tarafından 1955 yılında basınca duyarlı karbonsuz kopya kağıdı üretimi için geliştirilen ilk mikrokapsülleme metodudur (Koç vd., 2010). Yöntem, yüksek verimlilik, basit uygulama, çevresel dostuluk gibi avantajlar sunar ve çözücü, sıcaklık, pH gibi faktörlerle kapsül özelliklerinin kolayca ayarlanabilir olması nedeniyle tercih edilir (Oliveira vd., 2007).

Koaservasyon sürecinde, bir polimer çözeltisi içerisinde çekirdek malzeme dağıtılır ve sonrasında çeşitli yöntemlerle faz ayrıştırılır. Bu yöntemler arasında sıcaklık veya pH

değişikliği, uyumlu olmayan bir polimerin eklenmesi veya tuz gibi non-solventlerin kullanılması yer alır. Faz ayrışması sırasında, polimer çözeltisi polimerce zengin (koaservat) ve polimerce fakir (süpernatant) fazlara ayrılır ve bu iki faz dengede kalır (Singh vd., 2007).

Koaservasyon iki ana kategoride incelenir: sulu ve organik çözücülerde gerçekleşen faz ayrımı (Karataş, 1989; Bozkır vd., 1983). Sulu çözücü koaservasyonunda, polimerler sulu çözeltilerde çözünür ve hidrofobik çekirdek maddesi bu çözeltide dağıtılır. Organik çözücü koaservasyonunda ise, polimerler organik çözücülerde çözünür ve faz ayrımı genellikle organik çözücü ile su arasındaki arayüzde gerçekleşir, bu durumda çeper maddesi hidrofobik, çekirdek maddesi ise hidrofilik özelliktedir.

Sulu çözücü koaservasyon, basit ve kompleks koaservasyon olmak üzere iki yönetime ayrılır. Basit koaservasyonda tek bir polimer türü kullanılır ve faz ayrışması için anti çözündürücüler eklenir. Kompleks koaservasyonda ise zıt yüklü polimerler kullanılır ve bu polimerler arasındaki elektrostatik çekim faz ayrışmasını tetikler (Ghosh, 2006). Kompleks koaservasyon ile üretilen mikrokapsüller, morfoloji ve kararlılık açısından üstün olduğundan bu yöntem daha yaygındır.

Basit koaservasyon yönteminde, jelatin veya kitosan gibi kolloidal çözücüler kullanılır. Çekirdek malzeme, polimer çözeltisi içinde küçük damlacıklar halinde dağıtılmak üzere emülsiyon oluşturulur. Çevresel koşulların (pH, sıcaklık, konsantrasyon, iyonik güç) değiştirilmesiyle çekirdeğin etrafında kapsül oluşumu teşvik edilir. Bu aşamada anti çözündürücü maddeler eklenerek polimer damlacıklarının yoğun ve seyreltik fazlara ayrılması sağlanır. Koaservat fazı çekirdek damlacıkların üzerinde birikerek mikrokapsül formunu oluşturur. Oluşan mikrokapsüllerin kabuk kısmının stabilitesi artırılmak için çapraz bağlayıcılar eklenir ve sonrasında soğutma ile kapsüller katılaştırılır. Bu süreçte, çekirdek malzemenin su veya alkolde çözünmemesi esastır (Kaş, 2002). Basit koaservasyon, maliyeti düşük ve yüksek sıcaklık gerektirmeyen bir yöntem olup, aroma yağlarının mikrokapsüllenmesinde sıkça kullanılmaktadır (Se, 2004).

Kompleks koaservasyon yöntemi, fizikokimyasal mikrokapsülleme teknikleri arasında en köklü ve yaygın olarak kullanılan bir metottur. Bu teknik, özellikle suya karışmayan yağların kapsülleştirilmesinde sıkça tercih edilir. Zıt yüklü polielektrolitlerin etkileşime girerek kompleks bir yapı oluşturması esasına dayanan bu yöntem, ortam koşullarının değiştirilmesi ile faz ayrışması sağlar (Favaro-Trindade vd., 2011). Bu süreçte, iki polimerin zıt yüklü olabileceği pH aralığında çalışmak önemlidir. Kullanılan anyonik ve

katyonik polimerler, suda çözünme kapasitesine sahiptir ve bir araya geldiklerinde kabuk malzemesini oluştururlar. Bu polimerlerin etkileşimi, polimerce zengin ve seyreltik olmak üzere iki ayrı fazın oluşumuna yol açar. Zengin faz kompleks koaservat, seyreltik faz ise dengeli bir ortam olarak işlev görür (Övez ve Yüksel, 2002).

Kompleks koaservasyon metodu, suda çözünmeyen çekirdek maddelerin kapsülleştirilmesinde kullanılır. Kullanılan kabuk materyalleri, çekirdek maddesiyle uyumlu olmalı ve çözücü içinde çözünebilmeli, ayrıca uygun iyon durumlarına ve reaksiyon potansiyeline sahip olmalıdır. Kabuk materyali olarak sıklıkla polivinilalkol-kitosan, jelatin-arap zankı, jelatin-sodyum aljinat ve polivinilalkol-sodyum aljinat gibi zıt yüklü polimerler tercih edilir (Saravanan ve Rao, 2010). Etkileşimler, kovalent bağlar, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi elektrostatik olmayan etkileşimlerle gerçekleşir (Karagönlü 2011; Giro-Paloma vd., 2016).

Kompleks koaservasyon süreci, çekirdek malzemesinin küçük damlacıklar halinde dağıtıldığı bir emülsiyon oluşturma aşaması ile başlar. Bu, karıştırıcı ve yüzey aktif madde yardımıyla elektrolit özellikli polimer çözeltisi içinde gerçekleştirilir. Sonra, karşıt yüklü bir elektrolit polimer çözeltisi eklenerek karıştırma devam eder ve iki polimer arasında elektrostatik çekimle kompleks oluşumu sağlanır. Bu oluşum, pH veya sıcaklık değişikliği, seyreltme veya tuz ilavesi gibi etkenlerle teşvik edilir. Böylece polimerce yoğun koaservat fazı ve daha seyreltik denge fazı oluşur ve koaservat, çekirdek damlacıklar üzerinde birikerek mikrokapsül formunu oluşturur. Mikrokapsüllerin kabuk kısmının stabilitesi artırılmak için çapraz bağlayıcılar eklenir ve sonrasında soğutularak kapsüller katılaştırılır (Giro-Paloma vd., 2016).

Mikrokapsülleme işlemi tamamlandıktan sonra, mikrokapsüller filtre yardımıyla süzülür, yıkanır ve kurutulur, böylece nihai ürün elde edilir. Kompleks koaservasyon yöntemi, çeşitli malzemeleri işleme yeteneği, düşük sıcaklıkta etkili olması ve iyonik etkileşimleri kullanmasıyla dikkat çekerken, yüksek maliyeti ve çapraz bağlayıcıların potansiyel toksisitesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Çimen, 2007).

#### **2.4.1.7. Diyaliz yöntemi**

Diyaliz, küçük ve homojen dağılımlı NP'ler üretmek için kullanılan basit ve etkili bir tekniktir. Bu metotta, bir polimer bir organik çözücü içinde çözülür ve daha sonra seçilen molekül ağırlığına uygun bir diyaliz tüpüne konur. Çözücünün diyaliz işlemi sırasında yer değiştirmesi sonucunda polimer çözünürlüğünü yitirir, bu da polimerin yavaşça agregasyon yapmasına ve sonuç olarak homojen bir NP süspansiyonunun oluşmasına yol açar (Rao ve Geckeler, 2011).

#### **2.4.2. PNP karakterizasyonu**

##### **2.4.2.1. Partikül boyut ve morfolojisi**

Nanotaşıyıcıların boyutu, biyolojik ortamlarla olan etkileşim süreçlerini belirleyen yüzey alanının büyüklüğünü etkiler. Küçük boyutlu NP'ler, büyüklere kıyasla daha uzun süre kan dolaşımında kalabilmekte, 6 nm altındaki NP'ler hızla böbrekler tarafından filtre edilirken, 200 nm üstündekiler KC ve dalakta yoğunlaşma eğilimi gösterir. Özellikle tümör tedavisinde, NP'lerin boyutu, hastalıklı bölgelere penetrasyon ve birikiminde belirleyici bir faktördür ve büyük boyutlar damar geçirgenliğini negatif yönde etkileyebilir. NP'ler genellikle 30-200 nm boyut aralığındaki parçacıkların ERP (geliştirilmiş geçirgenlik ve alıkonma) etkisi sayesinde tümör bölgelerinde birikir (Zhao vd., 2019; Hickey vd., 2015).

##### **2.4.2.2. Zeta potansiyel**

Zeta potansiyeli, NP yüzeylerindeki etkin elektrik yükünü ifade eden bir parametredir. Bu potansiyel, NP'ler etrafında oluşan ve onlarla birlikte hareket eden, zıt yüklü iyonlardan oluşan elektriksel çift katmanın varlığı ile karakterize edilir. Zeta potansiyeli, NP yüzeyindeki sabit katman ile çevresindeki hareketli dispersiyon ortamı arasındaki elektriksel potansiyel farkını ölçer ve bu potansiyel, kesilme/kayma düzlemi potansiyeli olarak bilinir. Zeta potansiyelini etkileyen ana faktörler pH değeri, iyonik kuvvet, çözeltiliye eklenen katkı maddelerinin konsantrasyonu ve çevre sıcaklığıdır (Selvamani, 2019). NP'lerde yüksek negatif veya pozitif zeta potansiyeli değerleri, nanosüspansiyonların elektrostatik itme nedeniyle iyi fiziksel stabiliteye sahip olduğunu gösterir. Genel olarak, -30 mV'dan +30 mV'ye kadar olan zeta potansiyel değerleri, iyi fiziksel koloidal stabilite için yeterli itme kuvvetine sahip olarak kabul edilir. Düşük zeta potansiyel değerleri, Van der Waals kuvvetleri nedeniyle partikül agregasyonuna, koagülasyona ve flokülasyona yol açarak stabiliteyi azaltabilir. Zeta potansiyeli

değerlerine göre nanosüspansiyonlar  $\pm 0-10\text{mV}$ ,  $\pm 10-20\text{mV}$ ,  $\pm 20-30\text{ mV}$  ve  $>\pm 30\text{mV}$  olarak dört gruba ayrılır, bu gruplar sırasıyla yüksek kararsızlık, nispeten kararlılık, orta derecede kararlılık ve yüksek kararlılık durumlarını ifade eder. Ayrıca, bir nanosüspansiyonun elektrostatik olarak kararlı olması için zeta potansiyelinin en az  $\pm 30\text{ mV}$ , sterik kararlık için ise en az  $\pm 20\text{ mV}$  olması gerektiği belirtilmiştir (Agrawal ve Patel, 2011). Zeta potansiyeli dışında, malzeme özellikleri, yüzey aktif maddelerin varlığı ve çözelti bileşimi gibi faktörler de nanosüspansiyonların fiziksel kararlılığını etkileyebilir (Joseph ve Singhvi, 2019).

#### **2.4.2.3. Etkin madde yüklenmesi ve enkapsülasyon**

İlaç yüklü NP'lerin içerdiği etken madde miktarının belirlenmesi, *in vitro* ortamda bu maddenin salım profilini anlamak için zorunludur. Bu miktar, sulu çözeltide serbest kalan ilaç miktarının, santrifüj veya ultrasantrifüj kullanılarak NP'lerin ayrıştırılması sonucu tespit edilebilir. Sulu çözeltide bulunan ilaç miktarı, başlangıçta eklenen toplam ilaç miktarından çıkarılarak, NP'lere enkapsüle edilmiş ilaç miktarı dolaylı olarak analiz edilebilir. Santrifüjle ayrılan NP peletleri, uygun bir çözücüde çözüldüğünde, içerisindeki ilaç miktarı doğrudan hesaplanabilir (Kaur vd., 2008).

#### **2.5. Polimerler**

Kontrollü ilaç salım sistemleri, uygun polimerlerin kullanımıyla ilaç salım dinamiklerini optimize ederek tedavi etkinliğini artırmayı amaçlar. Bu sistemler, dozaj yetersizliği ve fazlalığını minimize ederek istenen ilaç konsantrasyonunu korur, doz sıklığını azaltır ve hasta uyumunu destekler. Polimer seçimi biyolojik uyumsuzluk, biyoparçalanamama ve yüksek maliyet gibi zorluklar içerse de, alternatif polimerlerle bu sorunlar çözülebilir (Öztürk vd., 2019b).

### 2.5.1. Eudragit

1950'lere kadar oral ilaçlarda aktif maddelerin salım yeri ve zamanı kontrol edilemiyordu. Almanya'daki Röhm & Haas GmbH tarafından geliştirilen Eudragit (EUD), bu soruna çözüm sunarak ilaç endüstrisinde yeni bir dönemi başlatmış oldu. 1953'te üretilen ilk EUD kaplamalar, mide asidine direnç göstererek aktif maddelerin bağırsakta salınmasını sağlamıştır (Jain vd., 2020). EUD polimerleri, tablet, kapsül ve granül formundaki ilaçların kaplanması için kullanılmış ve zamanla farklı salım profilleri sunan çeşitleri geliştirilmiştir. Günümüzde EUD üretimi, Evonik Industries AG tarafından yürütülmektedir ve USPNF, BP, PhEur gibi farmasötik standartlarda tanımlanmıştır. Bu polimerler, akrilik ve metakrilik asitlerin polimerizasyonu ile elde edilir ve geniş bir kullanım geçmişine sahiptir (Barzegar-Jalali, M.vd., 2012).

**Tablo 2.4**

*EUD Türleri*

Yıl	EUD Türü
1954	EUD L 12.5, EUD S 12.5
1959	EUD E 12.5
1961	EUD E 100
1968	EUD RL 100, EUD RS 100
1972	EUD NE 30 D (önceden EUD E 30 D), EUD L 30 D-55 (önceden EUD L 30 D), EUD RS PO, EUD RL PO
1977	EUD L 100
1983	EUD NE 40 D
1985	EUD L 100-55
1986	EUD RL 30 D, EUD RS 30 D
1986	EUD E PO, EUD FS 30 D
1999	EUD E PO, EUD FS 30 D

EUD, poli(met)akrilat bazlı polimerlerden oluşan farmasötik uygulamalara yönelik bir markadır. Bu polimerler, aktif farmasötik bileşenlerin vücutta doğru yerde, zamanda ve süre boyunca salınmasını sağlayarak istenen ilaç salım profillerini sunar. Ayrıca, dış etkenlere karşı koruma, tat/koku maskeleyme ve hasta uyumunu artırma gibi işlevler sunar. Enterik, koruyucu ve sürekli salım için optimize edilmiş çeşitleri mevcuttur. EUD, akrilik ve metakrilik asit esterlerinden üretilmiş kopolimerlerdir ve fiziksel formları sulu dispersiyon, organik çözelti içinde granül veya toz şeklinde olabilir. L, S, FS ve E türleri, aktif bileşenin pH'a duyarlı salımını sağlamaktadır.

**Tablo 2.5***EUD polimerinin özellikleri*

<b>EUD Polimer</b>	<b>Kullanılabilirlik</b>	<b>Çözünme Özellikleri</b>
L 30 D-55	%30 Sulu Dağıtım	pH 5.5 üstü çözünme
L 100-55	Toz	pH 6.0 üstü çözünme
L 100	Toz	pH 6.0 üstü çözünme
L 12,5	% 12.5 Organik Çözelti	pH 6.0 üstü çözünme
S 100	Toz	pH 7.0 üstü çözünme
S 12,5	% 12.5 Organik Çözelti	pH 7.0 üstü çözünme
FS 30 D	%30 Sulu Dağıtım	pH 7.0 üstü çözünme

**2.5.1.1. EUD S100**

EUD S100, özellikle ilaç salınımı pH'ya duyarlı bir şekilde kontrol etmek için tasarlanmış bir polimerdir. Bu polimer, pH'ya duyarlı metakrilat kopolimerlerinin bir grubuna aittir ve asidik ortamlarda (pH 7'nin altında) çözünmez, ancak daha alkali bağırsak ortamında (pH 7 ve üzeri) çözünerek ilacın burada salınmasını sağlar. Bu özellik, EUD S100'ü oral yolla alınan ilaçların bağırsakta hedeflenen bölgelerde serbest bırakılması için ideal bir materyal yapmaktadır (Öztürk vd., 2019a).

Küçük boyutlara sahip PNP'leri, aktif farmasötik bileşenlerin (API) hücre içi alımını artırabilir ve biyoyararlanımı iyileştirebilir. EUD S100 PNP formülasyonları, etkin maddenin bağırsakta spesifik bölgelere ulaşmasını sağlamak ve API'nin istenmeyen erken salınımını önlemek için kullanılır (Guven, U. M. Vd. , 2020)

### 3. GEREÇLER

#### 3.1 Kullanılan maddeler

<b>Madde</b>	<b>Firma</b>
Karvedilol	Deva, Türkiye
Asetonitril	Carlo Erba, Almanya
EUD® S100	Röhm, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat (monobazik)	Sigma Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit	Tekkim, Türkiye
Span® 40	Sigma Aldrich, Almanya
Tween® 80	Merck, Almanya
Mikropipet uçları	Eppendorf, Almanya
Santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
2 mL'lik Eppendorf tüp	Eppendorf, Almanya
Steril enjektör	Hayat, Türkiye
Pluronic F127	Sigma Aldrich, Almanya
Etanol	Carlo Erba, Almanya
Aseton	Carlo Erba, Almanya
Metanol	Carlo Erba, Almanya

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

<b>Madde</b>	<b>Firma</b>
Buzdolabı	Arçelik No Frost, Türkiye
Çeker Şubat	Hedlab, Türkiye
Diferansiyel taramalı kalorimetri	Shimadzu DSC-60, Japonya
Distile su cihazı	Agilent, Almanya
Etüv	Nüve FN500, Türkiye
Elektroğırme cihazı	İnovenso, Amerika
Fouriyer dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FT-IR)	Shimadzu IR Prestige-21, Japonya
Hassas terazi	Mettler Toledo, Çin
Liyofilizatör	Operon, Güney Kore
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Nükleer manyetik rezonans (NMR)	Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Almanya
Otoklav	Eryiğit A.Ş., Türkiye
UV Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Ultrasonik Banyo	Wisd Laboratory Instruments, Güney Kore
Ultratoraks	Heidolph, Almanya
Vorteks	Scilogex, Almanya
Zeta Potansiyel Analiz Cihazı	Malvern-Zetasizer NanoSeries, İngiltere

## **4. YÖNTEMLER**

### **4.1 KRV Çalışmaları**

#### **4.1.1.KRV morfolojisi**

KRV'nin morfolojik özelliklerinin analiz edilmesi ve partikül şeklinin belirlenmesi için SEM cihazı (Hitachi TM 3030 Plus model, Japonya) kullanılmıştır.

#### **4.1.2. Termal özellikler**

KRV'nin (3~ mg) termal özellikleri, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) yöntemi ile incelenmiştir. Bu analizler, Shimadzu Scientific Instruments'in DSC-60 model cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler, basınç altında tamamen kapatılan alüminyum numune kabında yapılmış olup, 10°C/dakika hızında sıcaklık artırılmış ve 50 mL/dakika azot gazı akışı sağlanmıştır. Termal analiz, 30°C ile 300°C arasındaki sıcaklık aralığında, alüminyum referansına karşı yapılmıştır. Cihazdan elde edilen termogram, KRV'nin formülasyon aşamalarının bu termal özellikler üzerinde bir etkisi olup olmadığının belirlenmesi amacıyla ileriye dönük yapılacak termal analizlerde referans olarak kullanılmıştır. Bu sayede, KRV'nin termal davranışları hakkında daha kapsamlı bir değerlendirme yapılabilmektedir (Kipriye vd., 2017; Güven vd., 2020).

#### **4.1.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizi**

KRV'nin formülasyon aşamalarından etkilenip etkilenmediğini belirlemek amacıyla, FT-IR (IR Prestige – 21 Shimadzu, Tokyo, Japonya) analizi yapılmıştır. Bu analiz, 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında yapılmış ve elde edilen veriler, ilerleyen analizlerde karşılaştırma yapmak amacıyla referans olarak kullanılmıştır (Kipriye vd., 2017; Güven vd., 2020; Jagannathan vd., 2010).

#### **4.1.4. KRV'nin UV Spektrofotometri Çalışmaları**

##### **4.1.4.1. Doğrusallık**

Doğrusallık, bir analiz yönteminin belirli bir konsantrasyon aralığında, numunede bulunan etkin madde konsantrasyonu ile doğru orantılı sonuçlar verebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Doğrusallık çalışmalarında, uluslararası standartlara göre (ICH, 2005b), en az beş farklı konsantrasyon seviyesinin test edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, UV spektroskopi yönteminde kullanılan KRV'ün doğrusallığının belirlenmesi amacıyla 0.1 µg/mL konsantrasyonunda olan stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stok çözeltisinden yararlanılarak 0.2 µg/mL-2 µg/mL arasında değişen yedi farklı konsantrasyonda numuneler oluşturulmuştur. Her bir konsantrasyon seviyesi üçer kez test edilmiş ve elde edilen sonuçlarla eğri altındaki alan değerleri hesaplanmıştır (Kipriye vd., 2017; Güven vd., 2020; Ieggli vd., 2005).

#### **4.1.4.2. Doğruluk**

Analitik yöntemlerde doğruluk, analiz edilen numunedeki etkin madde miktarının kabul edilmiş referans değere veya gerçek değere ne derece yakın olduğunu ifade eder. Analitik validasyonun bir parametresi olan doğruluk, yöntemin belirlenmiş çalışma aralığı boyunca değerlendirilmelidir. Bu değerlendirme genellikle aralık içinde seçilen üç farklı konsantrasyon düzeyinde gerçekleştirilir ve her bir konsantrasyon için en az üçer numune üzerinde ölçüm yapılır (ICH, 2005b).

Yapılan çalışmada doğruluğun belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 20 µg/mL konsantrasyonlarında KRV içeren numuneler hazırlanmış, her bir konsantrasyon için üçer kez ölçüm gerçekleştirilerek sonuçlar analiz edilmiştir. Bu yöntem, doğruluğun güvenilir bir şekilde değerlendirilmesini sağlamakta ve yöntemin referans değerlere yakınlığını ortaya koymaktadır (Güven vd., 2020; Ieggli vd., 2005).

#### **4.1.4.3. Kesinlik**

Kesinlik, aynı örneğin belirli koşullar altında birçok kez ölçülmesiyle elde edilen sonuçlar arasındaki tutarlılığı ifade eder. Kesinlik, üç farklı düzeyde değerlendirilir: tekrarlanabilirlik, ara hassasiyet ve tekrar elde edilebilirlik (ICH,2005b).

Yapılan çalışmada üç farklı konsantrasyonda KRV çözeltileri hazırlanmış olup (0.5-1-2 µg/mL) üç farklı günde üç örnekle tekrar edilmiştir.

#### **4.1.4.4. Duyarlılık**

Analitik yöntemlerde duyarlılık, bir yöntemin numunede bulunan en düşük analit konsantrasyonunu tespit etme ve nicel olarak belirleyebilme kapasitesini gösterir. Bu parametreler, saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) olarak tanımlanır. Saptama sınırı (LOD), bir analitin varlığının ölçüm sistemindeki sinyal-gürültü oranı dikkate alınarak belirlenebilen en düşük konsantrasyondur. LOD değeri, yöntemin

duyarlılığına ve kullanılan cihazın performansına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. ICH kılavuzuna göre, LOD değeri aşağıdaki denklem yardımı ile hesaplanmaktadır:

$$LOD = 3.3 \times \sigma / m$$

Bu denklemde SS, sinyalin standart sapmasını (genellikle kalibrasyon eğrisinin y-ekseni kesim değerinin standart sapması) ve m, kalibrasyon eğrisinin eğimini temsil eder. Miktar tayini sınırı (LOQ) ise, analitin doğruluk ve kesinlik kriterlerini karşılayarak güvenilir şekilde nicel olarak belirlenebildiği en düşük konsantrasyonu ifade eder. LOQ değeri, aynı şekilde ICH kılavuzuna göre şu denklemle hesaplanır:

$$LOQ = 10 \times \sigma / m$$

Burada SS sinyalin standart sapmasını, m ise kalibrasyon eğrisinin eğimini göstermektedir. Özetle, LOD, analitin algılanabilir en düşük sınırını belirlerken; LOQ, bu analitin ölçüm sisteminde doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından güvenilir şekilde belirlenebildiği alt sınırı tanımlar. Her iki parametre de analitik yöntemlerin performansının değerlendirilmesinde ve yöntem duyarlılığının tespit edilmesinde önemli rol oynar (ICH, 2005b).

#### **4.2. PNP Formülasyon Çalışmaları**

PNP formülasyonlarının geliştirme sürecinde kapsamlı bir literatür taraması yapılmış ve çalışmaya en uygun polimerin EUD S100 olduğuna karar verilmiştir. Tez kapsamında PNP formülasyonları nanoçöktürme (mono emülsiyon ve çift emülsiyon) ve püskürterek kurutma teknikleri kullanılarak hazırlanmıştır. Optimum PNP formülasyonunun belirlenebilmesi için, tüm formülasyonlar EUD S100 polimeri kullanılarak hazırlanmıştır. Sulu fazda distile su ve Tween<sup>®</sup> 80 , Span 40<sup>®</sup> ve Pluronic<sup>®</sup>F127 kullanılmış, organik fazın çözücüleri olarak ise etanol ve aseton tercih edilmiştir. Etkin maddeli formülasyonlardan önce etkin maddesiz (plasebo) formülasyonlar hazırlanmıştır (F1-P, F2-P, F3-P). Formülasyon içerikleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1***PNP Formülasyon İçerikleri*

Formülasyon kodu	KRV	EUD® S100	Sulu Faz
F1	10mL Aseton: 10 mg KRV	200 mg	20 mL bidistile su: 200 mg Pluronic® F127
F2	10 mL Etanol: 10 mg KRV	500 mg	1,5 mLbidistile su: %3 Span®40 + 30 mL bidistile su: %1 Tween® 80
F3	200 mg KRV	1g	50 mL Aseton + 50 mL Etanol

Tasarlanan formülasyonlarının hazırlanmasında, F1 ve F2 formülasyonları için nanoçöktürme yöntemi kullanılmış olup F1 için mono emülsiyon tekniği, F2 formülasyonu için ise çift emülsiyon tekniği uygulanmıştır. Plasebo formülasyonlarının hazırlanmasında, EUD S100 F1 formülasyonu için 10 mL aseton içerisinde, F2 formülasyonu için ise 10 mL etanol içerisinde çözülmüştür. Elde edilen karışımlar, enjektör pompası yardımıyla kontrollü bir akış hızında, 10.000 rpm'de sürekli karıştırılan sulu faza damla damla ilave edilmiştir. Hazırlanan emülsiyonlar, çeker ocak altında 400 rpm hızla çalışan manyetik karıştırıcıda 4 saat boyunca karıştırılarak organik fazın buharlaşması sağlanmıştır. Daha sonra, formülasyonlar 11.000 rpm'de santrifüj edilerek sıvı faz ayrılmış ve geriye kalan çökelti halindeki NP'lere 20 mL bidistile su ilave edilerek çökelti homojenize edilmiştir. Bu işlem, NP'lerin yıkanması amacıyla toplamda üç kez tekrarlanmıştır. Yıkama işleminin ardından, NP'ler 20 mL distile suda yeniden dağıtılmış, -20°C'de dondurulmuş ve -65°C'de çalışan bir liyofilizatörde kurutularak katı halde NP'ler elde edilmiştir. Etkin madde içeren F1 ve F2 formülasyonlarında ise KRV, organik faza ilave edilmiş ve aynı prosedür uygulanmıştır. F-3 formülasyonunda ise polimer 1:1 oranında aseton ve etanol içeren 100 mL hacimli bir çözeltide 1 gün boyunca 500 rpm hızında çalışan manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca karıştırılarak çözündürülmüş olup püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır. Etkin madde içeren F-3 formülasyonunda ise aynı işlem polimer ile birlikte KRV, çözündürülmüş olup aynı prosedürler uygulanmıştır.

### 4.3. PNP Karakterizasyonu

#### 4.3.1. Parçacık büyüklük ve dağılımı

Hazırlanan PNP formülasyonlarının parçacık boyutu ve dağılımı, lazer kırınım yöntemi ile incelenmiştir (Selvamani, 2019).

#### 4.3.2. Zeta potansiyel

Formüle edilen PNP'lerin zeta potansiyel değerleri, 25°C'de zeta hücreleri kullanılarak ve formülasyonlar distile su ile seyreltikten sonra Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Joseph ve Singhvi, 2019).

#### 4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (%EE)

Hazırlanan formülasyonun %EE değerinin belirlenmesinde UV spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla, formülasyondan 1 mg hassas tartım yapılarak alınmış ve üzerine 5 mL 1:4 oranında hazırlanmış asetonitril:etanol çözeltisi eklenmiştir. Karışım, 2 dakika boyunca vorteks cihazında karıştırılarak formülasyonda enkapsüle edilmemiş olan KRV'un çözeltide tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Ardından karışım santrifüj edilerek süzüntü elde edilmiş ve bu süzüntüdeki KRV miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enkapsüle edilmeyen KRV miktarının belirlenmesi ve dolayısıyla formülasyonun %EE değerinin tayini için kullanılmıştır (Başaran, E., vd., 2014)

$$\%EE = 100 - \left( \frac{\text{Pratik bulunan KRV miktarı}}{\text{Teoride olması gereken KRV miktarı}} \times 100 \right)$$

#### 4.3.4. Termal analiz

PNP formülasyonlarının termal analizi yapılırken yaklaşık 3 mg formülasyonun basınçla kapatılmış alüminyum numune kaplarında incelenmesiyle DSC cihazı kullanılmıştır. Analiz sırasında azot akış hızı 50 mL/dk, sıcaklık artış hızı 10°C/dk, sıcaklık aralığı 30-300°C olarak ayarlanmış ve referans olarak boş bir alüminyum kap kullanılmıştır (Liu vd., 2015; Kirpiye vd., 2017).

#### 4.3.5. FT-IR analizi

Formüle edilen PNP'lerin tüm bileşenlerinin analizi, 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında yapılmıştır (Jagannathan vd., 2010).

#### 4.3.6. *In vitro* salım

PNP'lerden KRV salımı, gastrointestinal sistem (GİS) bölgelerinin pH koşullarını simüle eden salım ortamlarında, diyaliz membran yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Yenilmez vd.,2020). Çalışma koşulları, %30 PEG 400 içeren pH 6.8 bağırsak ortamında,  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda, 1 mg KRV içeren PNP formülasyonları selüloz asetat diyaliz membranına (molekül ağırlığı 12-14 kDa) yerleştirilmiş ve üzerine 1 mL dissolüsyon ortamı eklenerek sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (5 dk, 10 dk, 15 dk, 30 dk, 45 dk, 1 saat, 1.5 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 8 saat, 12 saat, 18 saat, 24 saat, 48 saat, 72 saat), membran dışında kalan çözünme ortamından 1 mL örnekler alınmış ve yerlerine aynı hacimde taze salım ortamı eklenmiştir.

Numunelerdeki KRV miktarı, daha önce tanımlanan analiz koşulları doğrultusunda UV spektrofotometre ile belirlenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında salınan KRV miktarına dayanarak % kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve bu değerler zamana karşı grafikleştirilmiştir. Çalışma, altı tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

## 5. BULGULAR ve TARTIŞMA

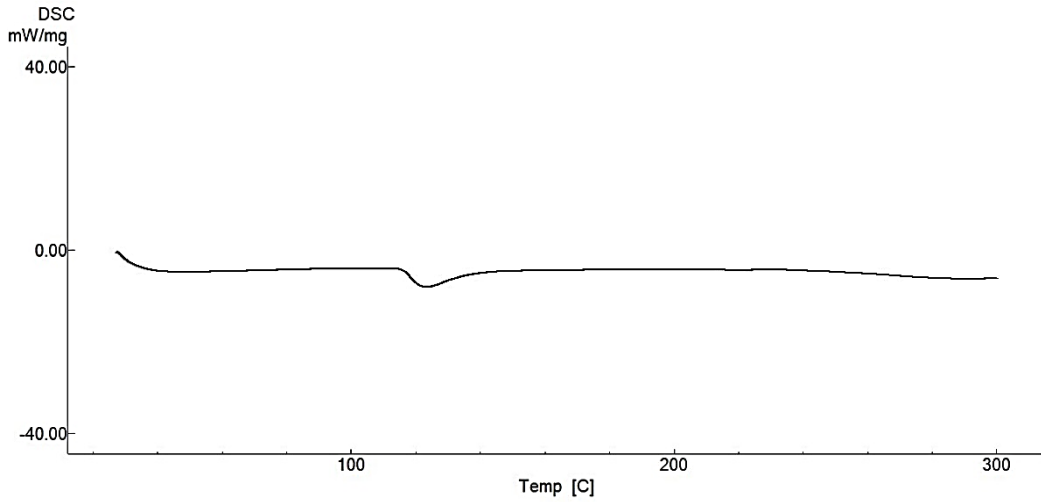
### 5.1. KRV ile Yapılan Çalışmalar

#### 5.1.1. Termal analiz

KRV'nin, DSC analiz cihazı ile 30-300°C aralığında incelenen termal analizinde, erime sıcaklığının 117,82°C olduğu tespit edilmiştir. Bu incelemenin sonucunda ulaşılan değerler literatür araştırması yapıldığında farklı araştırmacıların yaptığı analizler ile de uygunluk göstermektedir (Ahmed, K. vd 2016). KRV'e ait DSC analizi Şekil 5.1'de verilmiştir.

Şekil 5.1

*KRV'e ait termogram.*

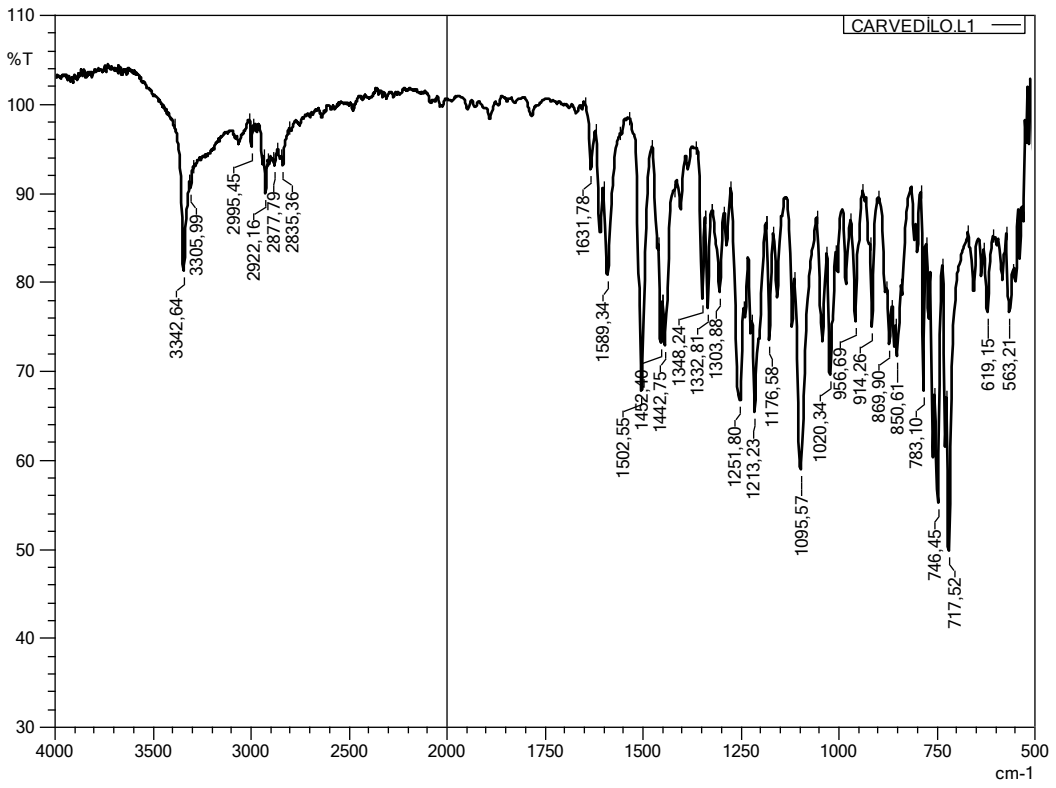


### 5.1.2. FT-IR analizi

FT-IR spektroskopisi moleküler yapı ve etkileşimlerin analiz edilmesinde en önemli karakterizasyon analizlerindedir (Duygu vd., 2009). Yapılan bu çalışmada kullanılan etkin maddenin formülasyona hazırlık aşamasındaki basamaklarda olası kimyasal etkileşimlere maruz kalmadığını belirlemek amacı ile FT-IR analizi yapılmış olup KRV'ye ait FT-IR spektrumu Şekil 5.2'de verilmiştir.

Şekil 5.2

KRV'e ait FT-IR spektrumu



KRV'ün spektrumları incelendiğinde 3000-3500 cm<sup>-1</sup>' de –OH ve –NH gruplarına ait pikler gözlenir, 3342 cm<sup>-1</sup>'de görülen pik de –OH ve –NH gruplarına ait olduğu gözlenmiştir. 3000 cm<sup>-1</sup> in altında ise alifatik –CH gruplarının pikleri gözlenir. 2995-2836 cm<sup>-1</sup> arasında gözlenen pikler bu gruplara aittir. 1500-1650 cm<sup>-1</sup> aralığında aromatik yapıya ait C=C rezonans çifte bağ gerilim bantları beklenir. 1502-1631 cm<sup>-1</sup> görülen pikler bu gruplara aittir. 1100-1200 cm<sup>-1</sup> aralığında C-O pikleri gözlenir. KRV e ait FT-IR spektrumunda 1095 cm<sup>-1</sup>'de belirlenen kesin pik bu gruba aittir. 650-1300 cm<sup>-1</sup> aralığı parmak izi bölgesi olarak ifade edilmektedir. Bölgede yoğun piklerin olması aromatik bir yapının varlığını ifade eder. Analiz sonucunda KRV'e ait FT-IR spektrumunda bu aralıktaki piklerin yoğunluğu da bu yapıda aromatik halkanın olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışmada incelenen piklerin literatürde daha önce yapılan çalışmalar ile uyum gösterdiği anlaşılmıştır (Ahmed, K. vd., 2016; Jagannathan vd., 2010).

### 5.1.3. KRV'nin UV spektroskopisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları

#### 5.1.3.1. Doğrusallık

KRV'e ait standart eğrinin belirlenebilmesi amacıyla 1:1 oranında etanol ve asetonitril çözeltisi içinde 10 µg/mL konsantrasyonunda bir stok çözeltisi kullanılmış ve daha sonra bu stok çözülden konsantrasyonları 2-20µg/mL arasında değişen 7 farklı seri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin her biri için altı tekrarlı ölçüm yapılmış ve UV spektrofotometresi ile absorbans değerleri kaydedilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin ortalama absorbans değerleri Tablo 5.1'de sunulmuştur. Elde edilen kalibrasyon grafiği ise Şekil 5.3'te gösterilmiştir.

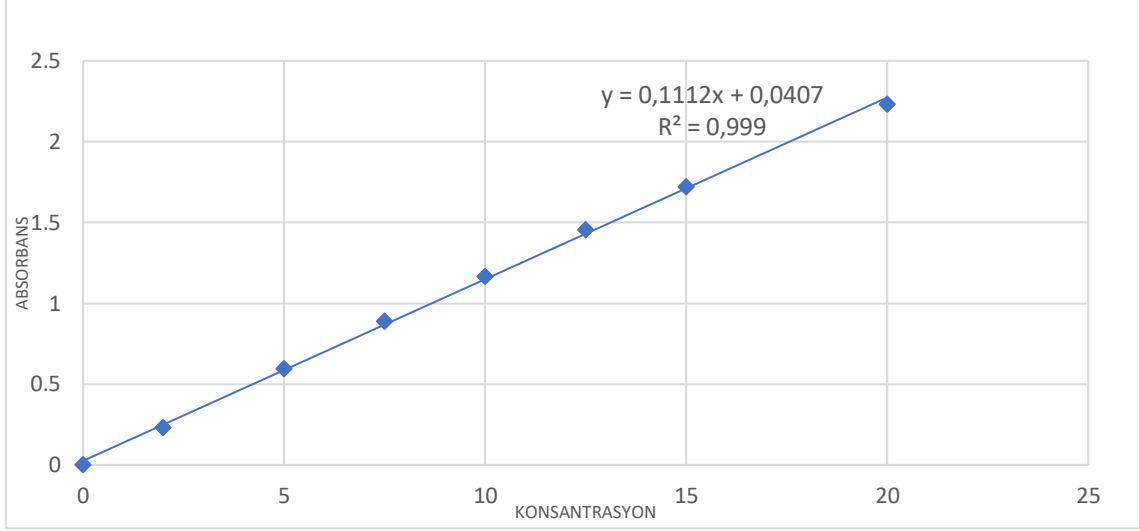
**Tablo 5.1**

*KRV'ye Ait Doğrusallık Verileri*

Seri	Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans (ort ± SS) (N=6)
1	2	0,233 ± 0,003
2	5	0,598 ± 0,013
3	7,5	0,888 ± 0,009
4	10	1,168 ± 0,004
5	12,5	1,454 ± 0,015
6	15	1,720 ± 0,009
7	20	2,234 ± 0,083

### Şekil 5.3

#### Doğrusal Kalibrasyon Grafiği



Elde edilen veriler sonucunda yöntemin 2-20  $\mu\text{g/mL}$  aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. Grafiğin regresyon katsayısı  $R^2=0,999$  doğrusallığın oldukça yüksek olduğunun kanıtıdır (Kipriye vd., 2017).

#### 5.1.3.2. Doğruluk

Çalışmanın doğruluğunun belirlenebilmesi amacıyla veri seti içerisindeki üç farklı konsantrasyonda (5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 15  $\mu\text{g/mL}$ ) geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen doğruluk verileri Tablo 5.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.2***KRV'ye Ait Doğruluk Verileri*

Numune	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbans	% Geri Kazanım
5 $\mu\text{g/mL}$	1	5,039	0,601
	2	4,985	0,595
	3	4,967	0,593
	% Ort. G.K $\pm$ SS		99,934 $\pm$ 0,037
	% BSS		0,038
	SH		0,022
10 $\mu\text{g/mL}$	1	9,976	1,150
	2	10,003	1,153
	3	10,012	1,154
	% Ort. G.K $\pm$ SS		99,967 $\pm$ 0,019
	% BSS		0,019
	SH		0,011
15 $\mu\text{g/mL}$	1	14,958	1,704
	2	15,084	1,718
	3	14,958	1,704
	% Ort. G.K $\pm$ SS		99,998 $\pm$ 0,073
	% BSS		0,073
	SH		0,042

(ORT: Ortalama, G.K: Geri kazanım, SH: Standart hata, BSS: Bağıl standart sapma)

Üç farklı konsantrasyon seviyesinde elde edilen ortalama geri kazanım değerleri sırasıyla %99,934, %99,967 ve %99,998 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, yöntemin yüksek doğruluğa sahip olduğunu kanıtlar. Elde edilen yüksek geri kazanım değerleri ve düşük standart sapmalar, yöntemin güvenilirliğini desteklemektedir. Bu sonuçlar, yöntemin farklı matrislerde ve daha geniş bir konsantrasyon aralığında da uygulanabilirliğini göstermektedir (Kipriye vd., 2017).

### 5.1.3.3. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin belirlenebilmesi amacıyla gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği ölçülmüştür. Gün içi ve günler arası çalışmalar 5, 10 ve 15  $\mu\text{g/mL}$  olmak üzere üç farklı konsantrasyonda üç tekrarlı olacak şekilde ve üç farklı günde analiz edilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 5.3'te sunulmuştur.

**Tablo 5.3***KRV Gün İçi ve Günler Arası Kesinlik Çalışması Sonuçları*

	1. GÜN	2. GÜN	3. GÜN	GÜNLER ARASI
<b>5 µg/mL</b>				
ORT	4,781	4,826	4,790	4,799
SS	0,067	0,050	0,053	0,024
% BSS	1,412	1,026	1,100	0,496
<b>10 µg/mL</b>				
ORT	9,997	10,012	10,009	10,006
SS	0,021	0,018	0,010	0,008
% BSS	0,208	0,180	0,104	0,079
<b>15 µg/mL</b>				
ORT	15,156	15,159	15,147	15,154
SS	0,032	0,042	0,036	0,005
% BSS	0,214	0,280	0,237	0,034

(ORT: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma)

Hem gün içi hem de günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları incelendiğinde, genel olarak düşük standart sapma (SS) ve bağlı standart sapma (BSS) değerleri elde edilmiştir. Bu durum, yöntemin hem kısa sürede hem de uzun vadede yüksek bir kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir. Farklı konsantrasyon seviyelerinde elde edilen BSS değerleri incelendiğinde, genel olarak daha düşük konsantrasyonlarda BSS değerlerinin biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Geri kazanım deneylerinin yanı sıra, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları da yöntemin güvenilirliğini desteklemektedir (Kipriye vd., 2017).

#### 5.1.3.4. Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri, bir analiz yönteminin duyarlılığını ve güvenilirliğini belirlemek için kullanılan önemli parametrelerdir. Yöntemin duyarlılığını belirlemek amacıyla Yöntem bölümünde (4.1.3.4) verilen denklemler kullanılmış ve çalışmanın LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,509 µg/mL ve 4,575 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri yöntemin duyarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir (Liu vd., 2015).

## 5.2. PNP Formülasyon Çalışmaları

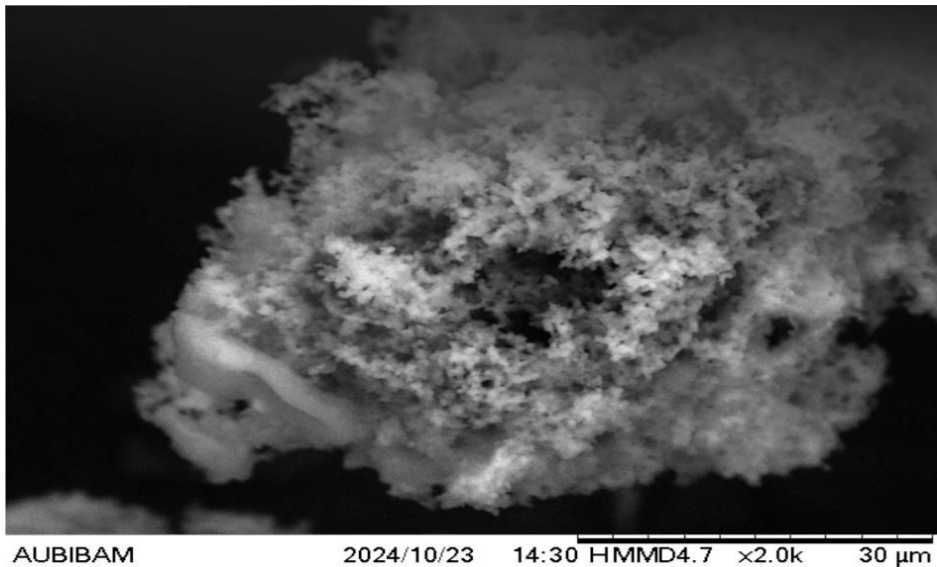
PNP formülasyonlarında polimer olarak EUD S100 polimeri kullanılmıştır. F1 formülasyonu mono emülsiyon yöntemi ile hazırlanmış olup %2 Tween 80, EUD S100, KRV ve aseton bileşenlerini içermektedir. F2 formülasyonu çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmış olup %1 Tween 80, %3 Span 80, aseton, metanol ve KRV bileşenlerini içermektedir. F3 formülasyonu ise spreyci kurutma yöntemi ile hazırlanmış olup EUD S100, KRV, metanol, aseton, saf su ve Tween 80 bileşenlerini içermektedir. Formülasyon bileşenleri, "4.2. PNP Formülasyon Çalışmaları" bölümünde Tablo 4.1'de detaylı olarak sunulmuştur. Tüm formülasyon denemelerinde başarılı bir şekilde NP'ler elde edilmiştir.

### 5.2.1. PNP formülasyonlarının morfolojik özellikleri

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda PB belirlenmesi önemli role sahiptir. ve bu boyut, kullanılan eksipiyanlar, polimer yapısı ve kullanılan üretim yöntemi gibi faktörlerden büyük ölçüde etkilenmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde PB ve morfolojisinin belirlenmesinde genellikle foton korelasyon spektroskopisi ve elektron mikroskobu gibi tekniklerden yararlanılmaktadır (Sur vd., 2019b).Formülasyonların yüzey özelliklerine ait SEM görüntüleri Şekil5.4-Şekil5.9'de gösterilmiştir.

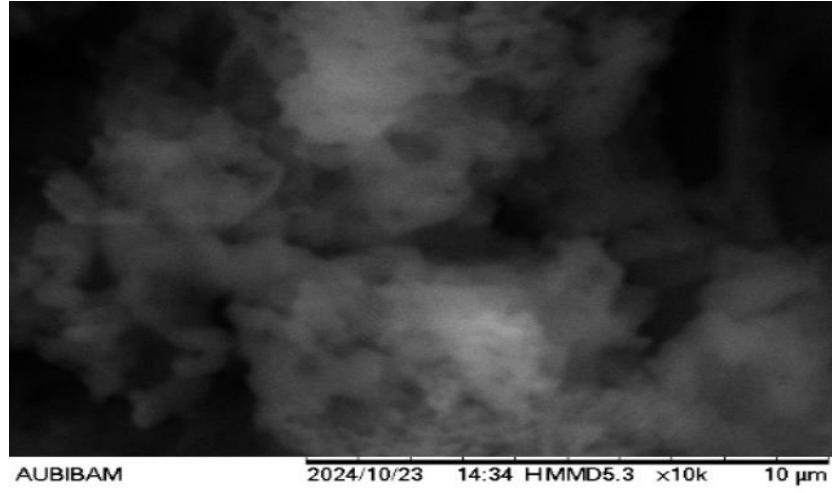
#### Şekil 5.4

*F1 formülasyonuna ait SEM görüntüsü*



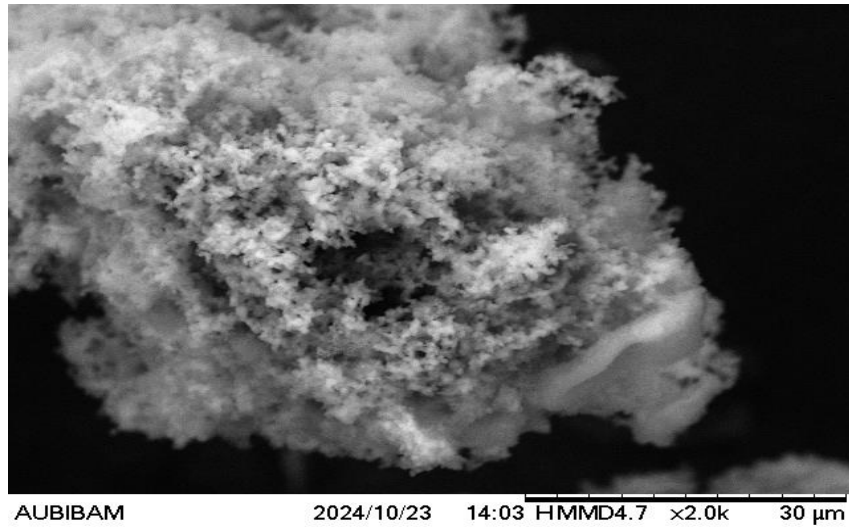
**Şekil 5.5**

*F1-placebo formülasyonuna ait SEM görüntüsü*



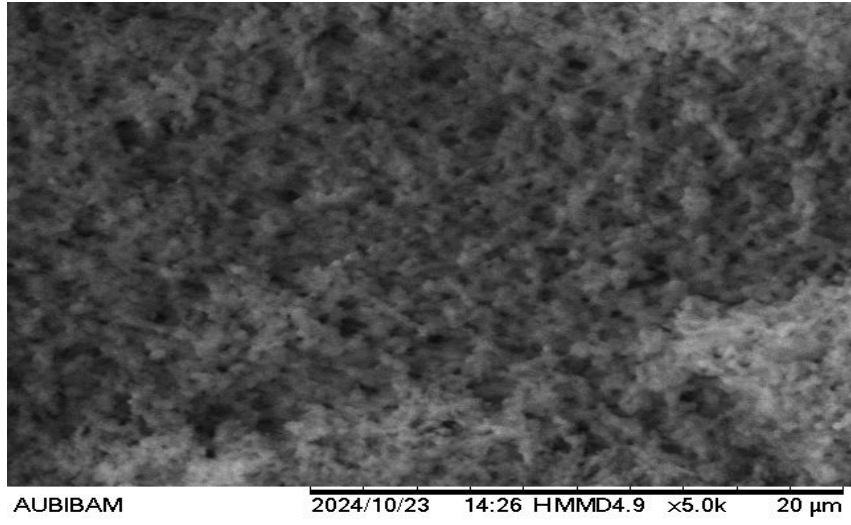
**Şekil 5.6**

*F2 formülasyonuna ait SEM görüntüsü*



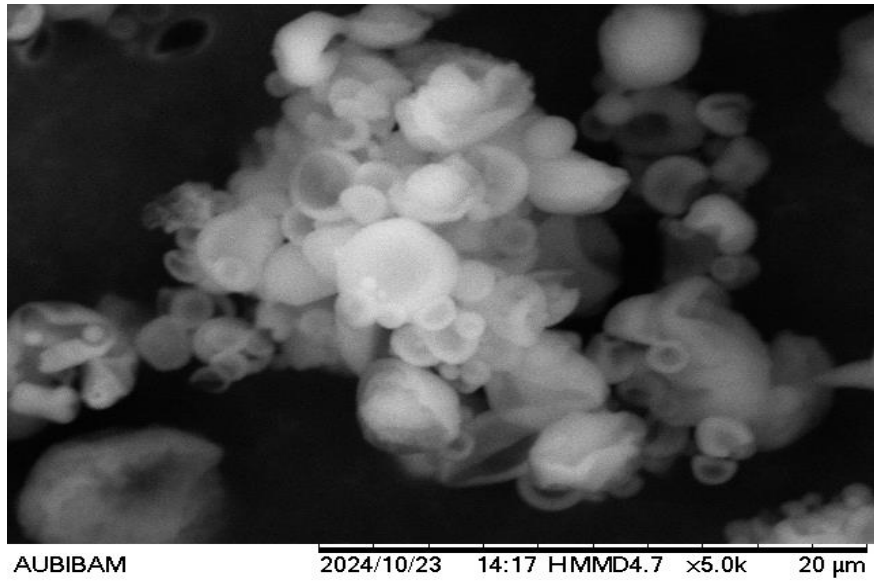
**Şekil 5.7**

*F2-placebo formülasyonuna ait SEM görüntüsü*



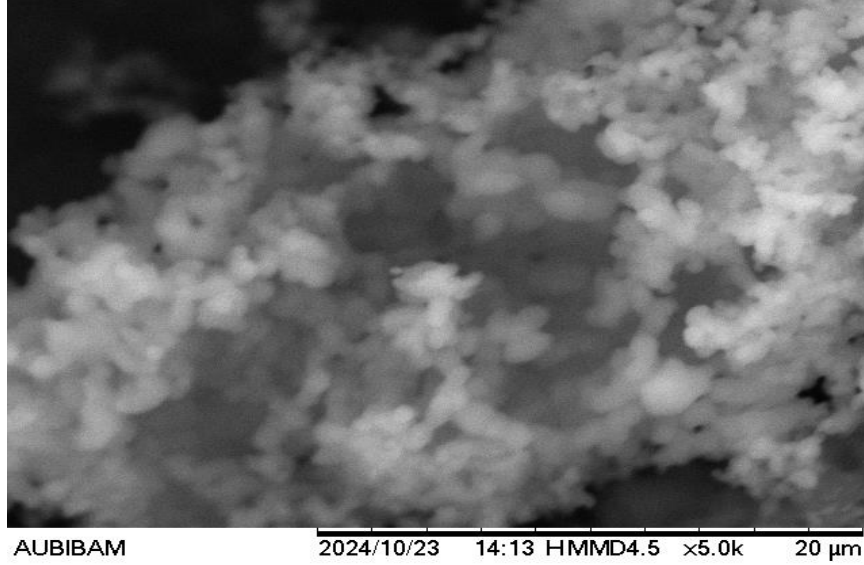
**Şekil 5.8**

*F3 formülasyonuna ait SEM görüntüsü*



## Şekil 5.9

F3-placebo formülasyonuna ait SEM görüntüsü



### 5.2.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan formülasyonların PB ve PDI değerleri Tablo 5.4'te verilmiştir.

**Tablo 5.4**

*Hazırlanan Formülasyonların PB ve PDI Değerleri*

	Formülasyon (N=3)			Parçacık büyüklüğü ORT (nm) ± SH	PDI ± SH
<b>F1</b>	540 ± 9,3	550 ± 9,7	551 ± 10,1	547 ± 9,7	0,484 ± 0,06
<b>F2</b>	520 ± 17	540 ± 17,6	558 ± 17,9	536 ± 17,5	0,352 ± 0,01
<b>F3</b>	500 ± 12	510 ± 12,5	511 ± 13,0	507 ± 12,5	0,474 ± 0,03
<b>F1-P</b>	340 ± 10,3	355 ± 10,5	361 ± 10,7	352 ± 10,5	0,462 ± 0,04
<b>F2-P</b>	450 ± 20,7	463 ± 21,5	476 ± 22,0	463 ± 21,4	0,306 ± 0,03
<b>F3-P</b>	400 ± 12,3	419 ± 12,7	420 ± 13,1	413 ± 12,7	0,573 ± 0,02

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata, PDI: Polidispersite indeksi)

Tablo 5.4, farklı formülasyonlardaki partiküllerin PB ve PDI sonuçlarını göstermektedir. PDI değerleri,  $0,306 \pm 0,03$  ile  $0,573 \pm 0,02$  aralığında bulunmuştur bu da partikül boyut dağılımının nispeten dar olduğunu göstermektedir. Ayrıca tablodaki verilere dayanarak mono emülsiyon yöntemiyle hazırlanan partiküllerin PDI değerlerinin diğerlerine oranla daha yüksek olduğu yorumu yapılabilir. Tüm formülasyonlarda genel olarak 350-550 nm arasında değişen partikül boyutları elde edilmiş ve etkin madde içeren formülasyonlarda partikül boyutlarında artışlar gözlemlenmiştir. Bu artış, aktif maddenin partikül yüzeyine adsorpsiyonu veya matriks içerisine dahil olması gibi nedenlerle açıklanabilir (Güven vd., 2020).

### 5.2.2. Zeta potansiyeli

Hazırlanan formülasyonların elde edilen zeta potansiyel değerleri (mV) Tablo 5.5'te verilmiştir.

**Tablo 5.5**

*Hazırlanan Formülasyonların Zeta Potansiyel Değerleri*

Formülasyon	ZP1 ± SH (mV)	ZP2 ± SH (mV)	ZP3 ± SH (mV)	Zeta potansiyel ORT ± SH (mV)
<b>F1</b>	30,9 ± 1,4	31,1 ± 1,8	31,3 ± 2,0	+31.1±1.7
<b>F2</b>	22,8 ± 1,9	23,6 ± 2,1	24,1 ± 2,3	+23.5±2.1
<b>F3</b>	27,2 ± 1,1	27,6 ± 1,5	28,0 ± 1,6	+27.6±1.4
<b>F1-P</b>	28,8 ± 1,2	29,2 ± 1,6	29,3 ± 1,7	+29.1±1.5
<b>F2-P</b>	21,8 ± 0,85	21,6 ± 0,6	22,03 ± 0,95	+21.9±0.8
<b>F3-P</b>	18,4 ± 1,0	18,6 ± 1,4	18,8 ± 1,5	+18.6±1.3

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata, ZP: Zeta potansiyel)

Tablo 5.5'te de görüldüğü üzere tüm formülasyonlarda pozitif zeta potansiyelleri elde edilmiştir. Formülasyonlardaki ZP değerleri 18,6 ± 1,3 mV ve 31,1 ± 1,7 mV arasında bulunmuştur. NP'lerde yüksek negatif veya pozitif zeta potansiyeli, elektrostatik itme sayesinde fiziksel stabilitenin korunmasına yol açar. -30 mV ile +30 mV arasındaki zeta potansiyeli, yeterli koloidal stabilite için gerekli kabul edilirken, daha düşük değerler partikül agregasyonu ve stabilite kaybına yol açabilir. Zeta potansiyeline bağlı olarak nanosüspansiyonlar dört gruba ayrılır: yüksek kararsız ( $\pm 0-10$  mV), nispeten kararlı ( $\pm 10-20$  mV), orta derecede kararlı ( $\pm 20-30$  mV) ve yüksek kararlı ( $> \pm 30$  mV). Elektrostatik stabilite için en az  $\pm 30$  mV, sterik stabilite için ise en az  $\pm 20$  mV zeta potansiyeli gerektiği belirtilmiştir (Agrawal ve Patel, 2011). Zeta potansiyelinin yüksek olması, partiküller arasında elektrostatik itme kuvvetlerinin olduğunu ve dolayısıyla sistemin stabilitesini artırdığını gösterdiğinden etkin madde içeren formülasyonlarda zeta potansiyelinin biraz daha yüksek olması, formülasyonun stabilitesine olumlu katkı sağlayabileceği şeklinde yorumlanabilir (Selvamani, 2019).

### 5.3.3. Enkapsülasyon etkinliği

Çalışmada, üç farklı formülasyon için enkapsülasyon etkinliği (%EE) hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Her formülasyon için farklı seyreltmelerde hazırlanan örnekler üzerinde analizler yapılmış ve elde edilen veriler kullanılarak %EE değerleri

hesaplanmıştır. Formülasyonlardan elde edilen %EE değerleri F1, F2 ve F3 formülasyonları için sırasıyla %84,840; %82,126 ve %51,492 olarak bulunmuştur. Bu değerler, aktif maddenin partiküller içerisine ne kadar etkin bir şekilde dahil olduğunu gösterir. %50'nin üzerindeki yüksek enkapsülasyon verimleri, formülasyonların başarılı olduğunu ve KRV'nin büyük bir kısmının partiküller içerisinde tutulduğunu göstermektedir. Elde edilen verilere göre, nanoçöktürme yöntemi ile üretilen F1 formülasyonu en yüksek enkapsülasyon verimine sahipken, püskürterek kurutma yöntemi ile üretilen F3 formülasyonu en düşük verimi göstermiştir. Bu durum, formülasyonların hazırlanışındaki yöntem farklılıklarının enkapsülasyon verimliliği üzerindeki önemli etkisini göstermektedir (Kirpiye vd., 2017).

#### **5.3.4. Termal analiz sonuçları**

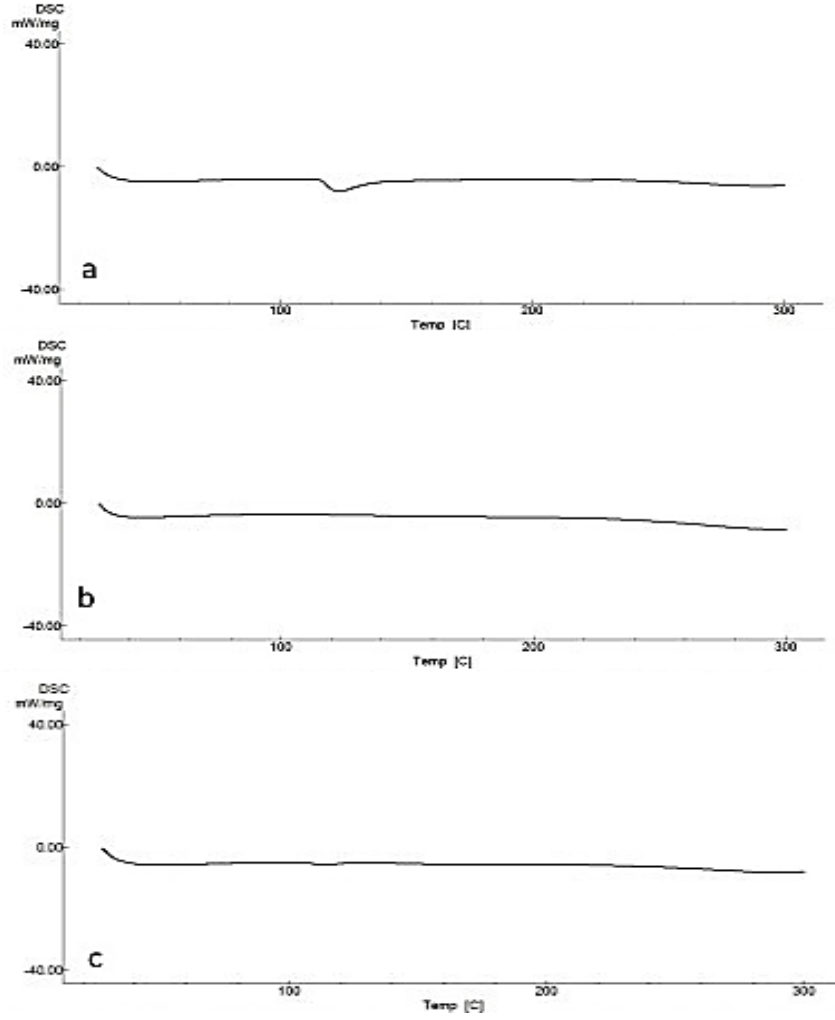
Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), ilaç formülasyonlarında etkin madde ve polimerik taşıyıcılar arasındaki etkileşimleri ortaya koyarak, formülasyonun stabilitesi ve etkinliği hakkında önemli bilgiler sağlar. Bu teknik, formülasyon sürecinde meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri takip ederek, polimerik matriks içindeki etkin maddenin durumunu ve olası etkileşimleri hakkında bilgi verir. DSC, maddelerin termal özelliklerini karakterize etmek için kullanılan etkili bir araçtır. Bu yöntemle elde edilen termogramlar, maddelerin yapısı, stabiliteleri ve işlevsellikleri hakkında önemli bilgiler sağlar (Smith ve Jones, 2023; Yurtdaş-Kırımlioğlu, G vd., 2018).

Termogram analizleri incelendiğinde, fiziksel karışımda ve formülasyonlarda KRV'ye ait piklerin kaybolduğu görülmektedir. Etkin maddeye özgü piklerin kaybolması, homojen bir polimer matriks oluşumunu veya amorf bir yapının varlığını işaret etmektedir (Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2019).

KRV, EUD S100 ve fiziksel karışım termogramları Şekil 5.10'da, PNP formülasyonlarına ait DSC termogramları ise Şekil 5.11'de verilmiştir.

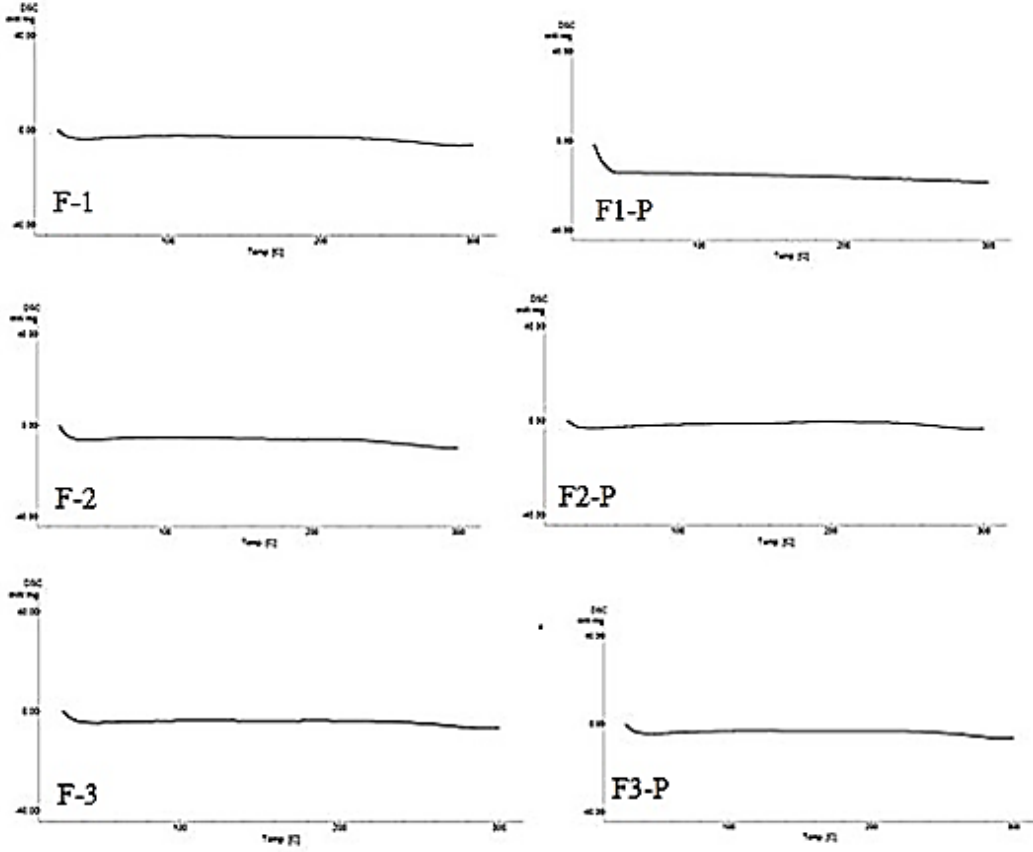
**Şekil 5.10**

*KRV (a), EUD S100 (b), Fiziksel Karışım (c) Termogramları*



## Şekil 5.11

Hazırlanan PNP Formülasyonlarına Ait Termogramlar



Şekil 5.11’te elde edilen DSC termogramlarına bakıldığında çalışmanın KRV’nin erime sıcaklığının 117,82°C olduğu tespit edilmiştir. Ye vd. tarafından 2024 yılında yapılan çalışmada da karvedilol etkin maddesine ait DSC analizi sonucunda 118°C’de erime noktası piki elde edilmiştir. KRV’ye ait pikin kaybolması, amorf yapının varlığı ya da homojen matriks oluşumu ile açıklanabilir. Ayrıca bu durum, incelenen numunenin analiz edilen sıcaklık aralığında önemli bir fiziksel veya kimyasal değişime uğramadığı şeklinde yorumlanabilir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G vd., 2018).

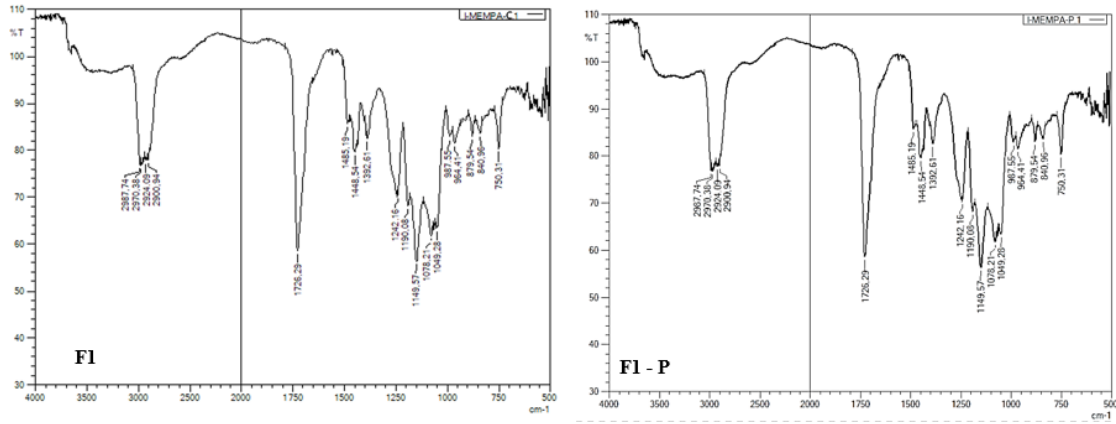
### 5.3.5. FT-IR analizi sonuçları

FT-IR spektroskopisi, polimerik sistemlerde bileşenler arasındaki etkileşimleri ve bağ düzenlemelerini aydınlatmada etkili bir araçtır. İlaç formülasyonlarında, etkin madde ile eksipiyenler arasındaki olası etkileşimleri ve polimerik matriksteki yapısal değişiklikleri incelemek için sıklıkla kullanılır (Yurtdaş-Kırımlioğlu ve Görgülü, 2021). Bu bağlamda, KRV içeren PNP formülasyonlarında gerçekleştirilen FT-IR analizleri, saf KRV'un spektral karakteristiklerinin formülasyonda nasıl değiştiğini ve diğer bileşenlerle olası etkileşimlerin olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Bu sayede, formülasyonların fiziksel karışımlar mı yoksa kimyasal etkileşimler içeren sistemler mi olduğu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (Güven ve Başaran, 2021).

Hazırlanan plasebo ve etkin maddeli formülasyonların FT-IR spektrumları, F1 için Şekil 5.12'da, F2 için Şekil 5.13'da, F3 için Şekil 5.14'de, EUD S100 için ise Şekil 5.15'da verilmiştir.

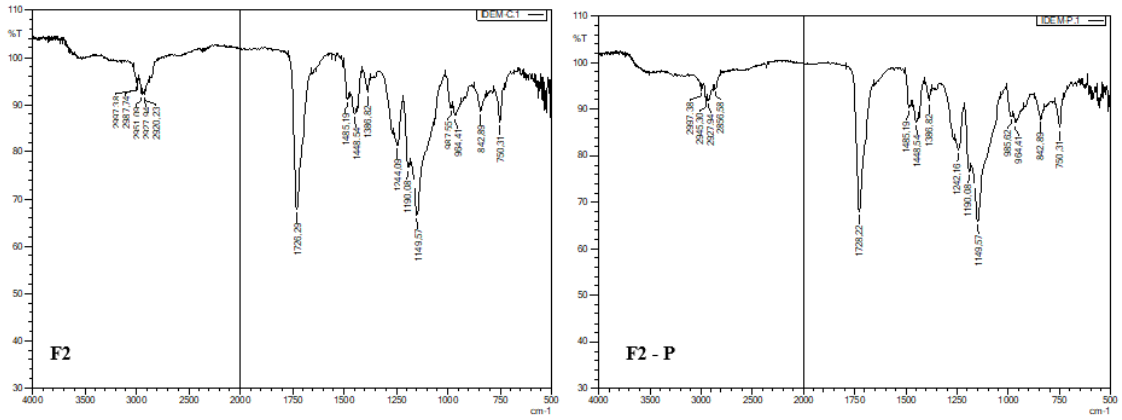
**Şekil 5.12**

*F1 Formülasyonuna Ait FT-IR Spektrumları*



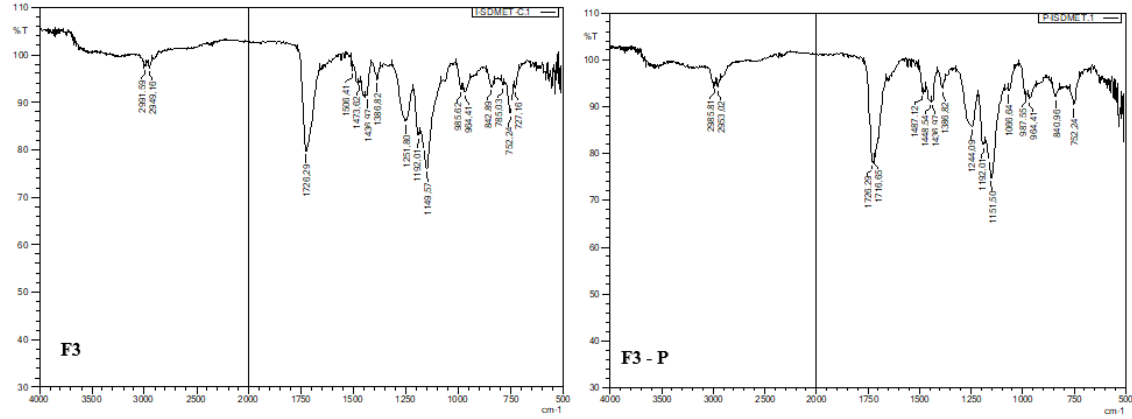
**Şekil 5.13**

*F2 Formülasyonuna Ait FT-IR Spektrumları*



**Şekil 5.14**

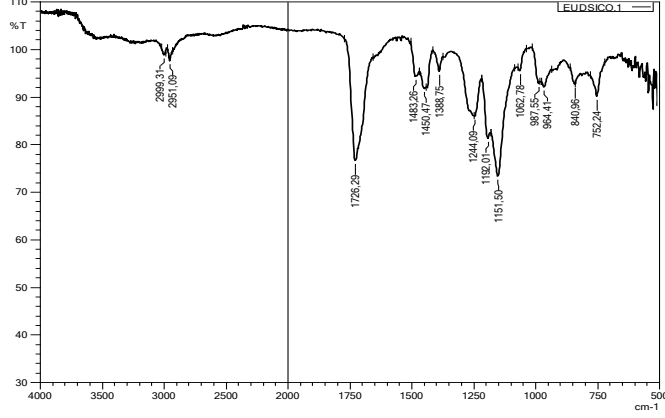
*F3 Formülasyonuna Ait FT-IR Spektrumları*



Verilen spektrumlar incelendiğinde hem etkin madde içeren hem de plasebo içeren formülasyon spektrumlarında benzer genel bir yapı gözlemlenmektedir. Özellikle 3000 cm<sup>-1</sup> civarındaki C-H gerinim titreşimleri ve 1700 cm<sup>-1</sup> civarındaki karbonil (C=O) gerinim titreşimleri her iki spektrumda da belirgindir. 1200-800 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki parmak izi bölgesi, iki numune arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Etkin madde içeren spektrumlar incelendiğinde 3000 cm<sup>-1</sup> civarı görülen C-H gerinim titreşimleri, aromatik veya alifatik hidrokarbonların varlığını belirtirken 1700 cm<sup>-1</sup> civarı karbonil (C=O) gerinim titreşimi, ester, keton veya asit gibi karbonil çeren grupların varlığını olarak nitelendirilebilir (Duygu, 2009).

**Şekil 5.15**

*EUD S100'e ait FT-IR spektrumu*



FTIR spektroskopisi, formülasyonlardaki moleküler etkileşimleri anlamak için sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Formülasyonlara ait FTIR spektrumlarında saf aktif maddenin karakteristik piklerinin gözlenmemesi, aktif maddenin polimerik matris içerisinde moleküler düzeyde homojen bir dağılım gösterdiğine işaret etmektedir. Bu durum, aktif madde ile polimer arasında yeni bir sinyalin oluşmamasıyla da desteklenerek, ikisi arasında kimyasal bir etkileşim olmadığını göstermektedir (Gomathi vd., 2017). FTIR sonuçları, bu bulgularla uyumlu olarak DSC analizleri tarafından da desteklenmektedir. Aktif maddenin homojen dağılımı, formülasyonun etkinliği ve stabilitesi için önemli bir faktördür.

### 5.3.6. *In vitro* salım çalışma sonuçları

*In vitro* salım çalışmalarına ait veriler Tablo 5.6'da % kümülatif salım sonuçlarının zamana karşı grafiği ise Şekil 5.10'da verilmiştir.

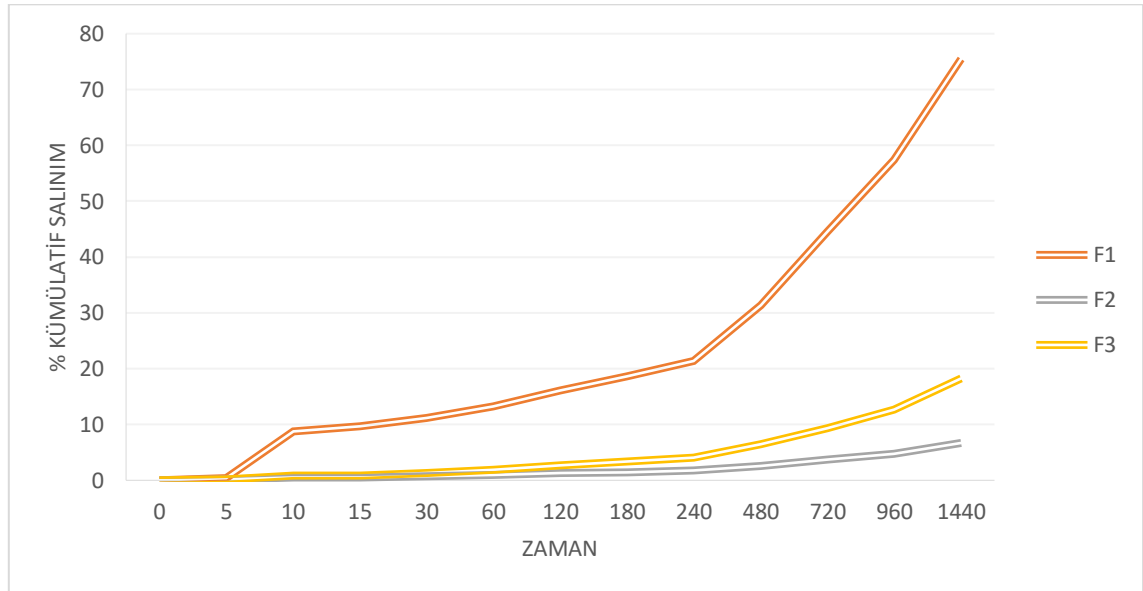
**Tablo 5.6**

*KRV'nin In vitro Salım Çalışmasına Ait % Kümülatif Değerler*

Zaman	F1	F2	F3
5 dk	0,387	0,102	0,186
10 dk	8,777	0,557	0,852
15 dk	9,654	0,474	0,853
30 dk	11,123	0,686	1,253
60 dk	13,267	0,968	1,929
2 sa	16,107	1,285	2,732
3 sa	18,590	1,437	3,333
4 sa	21,340	1,716	4,019
8 sa	31,342	2,574	6,499
12 sa	44,565	3,725	9,344
18 sa	57,330	4,690	12,707
24 sa	75,473	6,689	18,248

**Şekil 5.16**

*KRV'ye Ait Kümülatif Salım Grafikleri*



Tablo 5.6 ve Şekil 5.16 incelendiğinde, F1, F2 ve F3 formülasyonlarında KRV'nin *in vitro* salım profilinin zaman içindeki değişimi görülmektedir. % kümülatif salım değerleri, belirli bir zaman noktasında toplam aktif maddenin ne kadarının ortam içerisine geçtiğini ifade eder. Verilerden elde edilen ilk genel gözlemlere göre; kolon pH'sında F1

formülasyonu en yüksek kümülatif salım değerlerine ulaşan formülasyon olup, etkin maddenin ortam içerisine hızlı ve yüksek oranda salındığını göstermektedir. F2 ve F3 formülasyonları ise F1'e göre daha düşük kümülatif salım değerlerine sahip olup, etkin maddenin salınım hızının daha yavaş olduğunu göstermektedir. KRV kısa yarı ömürlü bir etkin madde olduğundan doz aralığı kısa olup salımın 24 saatten uzun sürmesi bu aralığı uzatmaktadır. (Ongun Özdemir ve Ertaş, 2005). F1 formülasyonunda 5-10 dakika arasında hızlı bir salım artışı görülmektedir (Kipriye, 2017; Yalçınkaya vd., 2024). Bu durum, formülasyonun yüzeyindeki aktif maddenin kolon pH'sında hızlı bir şekilde çözünmesi veya matrisin ilk bariyerinin kolayca aşılmasıyla açıklanabilir. Özellikle F2 formülasyonunun salım hızı diğer geliştirilen formülasyonlara göre oldukça yavaştır. % kümülatif salım değerlerine bakıldığında F1 formülasyonunda etkin maddenin yüzeyden hızlı bir şekilde çözünerek salındığı, F2 ve F3 formülasyonlarında ise polimer içerisinden daha yavaş bir difüzyonla salındığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum, formülasyonların fizikokimyasal özellikleriyle ve formülasyonların üretim yöntemleriyle doğrudan ilişkilidir (Güven vd., 2020). F1 formülasyonu mono emülsiyon yöntemiyle üretilmiş olup hem çift emülsiyon hem de püskürterek kurutma yöntemiyle üretilen diğer formülasyonlardan daha hızlı etkin madde salımı yapmıştır. *In vitro* salım çalışmaları, *in vivo* durumun bir simülasyonu olsa da bazı sınırlamaları vardır. Örneğin kullanılan ortamın pH'ı, iyonik şiddeti ve viskozitesi gibi faktörlerin, *in vivo* sindirim sistemindeki koşullardan farklı olabileceği göz önünde bulundurulmalı ve salım sonuçları buna göre değerlendirilmelidir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2018). Özellikle F1 formülasyonunda 24 saat sonunda oldukça yüksek bir kümülatif salım değeri elde edilmiş olması, formülasyonun etkin bir ilaç salımı sağladığını göstermektedir. Bu çalışmada, karvedilolün farklı formülasyonlardaki *in vitro* salım özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, karvedilolün kontrollü salımı için uygun formülasyonların tasarlanmasında önemli bir adım teşkil etmektedir.

## 6. SONUÇ

Bu tez kapsamında, KY ve kardiyak aritmilerin tedavisinde kullanılan KRV etkin maddesinin PNP formülasyonlarının geliştirilmesi ve *in vitro* karakterizasyonu amaçlanmıştır. Çalışmada öncelikle KRV etkin maddesinin termal ve spektral analizleri (DSC, FT-IR) detaylı bir şekilde gerçekleştirilmiş, ardından geliştirilen formülasyonların PB, PDI, ZP, %EE gibi karakterizasyon parametreleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, UV spektrofotometrik analiz yöntemi kullanılarak doğrusal çalışma aralığı, geri kazanım, kesinlik, LOD ve LOQ değerleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

KRV'nin DSC analizi 30-300°C aralığında gerçekleştirilmiş ve erime noktasının 117,82°C olduğu belirlenmiştir. Bu değer, literatürdeki benzer çalışmalarla uyumluluk göstermekte olup (Ahmed, K. vd. 2016), KRV'ün termal davranışının çalışma koşullarında stabil olduğunu düşündürmektedir.

FT-IR analizleri ile KRV'ün yapısal özellikleri ve fonksiyonel gruplara ait pikler incelenmiştir. 3000-3500 cm<sup>-1</sup> aralığındaki –OH ve –NH gruplarına ait karakteristik piklerin yanı sıra 2995-2836 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki alifatik –CH pikleri ve 1500-1650 cm<sup>-1</sup> aralığındaki aromatik C=C gerilim bantlarının varlığı, ilacın aromatik halka içeren yapısını doğrulamıştır. 1095 cm<sup>-1</sup>'de belirlenen C-O pikleri ve 650-1300 cm<sup>-1</sup> aralığındaki yoğun pikler de KRV'ün tipik karakteristiklerini yansıtmaktadır. Bu bulgular daha önceki literatür verileriyle (Ahmed, K. vd., 2016) uyum içindedir.

KRV'e ait standart eğri 1:1 oranında etanol ve asetonyril içeren çözücü sistemi ile hazırlanmış ve 2-20 µg/mL aralığında yüksek bir doğrusallık (R<sup>2</sup>=0,999) elde edilmiştir. Yöntemin doğruluğu, geri kazanım deneyleri sonucunda 5, 10 ve 15 µg/mL konsantrasyon seviyelerinde sırasıyla %99,934; %99,967 ve %99,998 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler yöntemin çok yüksek bir doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir.

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları düşük SSve BSS değerleri ile yöntemin kesinliğinin oldukça yüksek olduğunu kanıtlamıştır.

Duyarlılık belirteçleri olarak LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,509 µg/mL ve 4,575 µg/mL olarak hesaplanmış, yönteminin düşük konsantrasyonlarda da güvenilir ölçüm yapabildiği görülmüştür.

KRV yüklü KLN'ler üç farklı yöntemle üretilmiştir:

- **F1 Formülasyonu:** Mono emülsiyon yöntemi (%2 Tween 80, EUD S100, KRV, aseton).
- **F2 Formülasyonu:** Çift emülsiyon yöntemi (%1 Tween 80, %3 Span 80, aseton, metanol, KRV).
- **F3 Formülasyonu:** Sprey kurutma yöntemi (EUD S100, KRV, metanol, aseton, saf su, Tween 80).

Tüm formülasyon denemelerinde başarılı şekilde NP'ler elde edilmiş, her yöntemin farklı süreç koşulları nedeniyle partikül özelliklerinin değiştiği gözlemlenmiştir.

- **Partikül Boyutu (PB) ve Polidispersite İndeksi (PDI):**
  - Yapılan ölçümlerde PB değerleri yaklaşık 350-550 nm arasında tespit edilmiştir. Etkin maddenin varlığı, partikül boyutlarında artışa neden olmuştur.
  - PDI değerleri  $0,306 \pm 0,03$  ile  $0,573 \pm 0,02$  aralığında bulunmuş ve genel olarak dar bir boyut dağılımına işaret etmiştir. F1 formülasyonunda PDI değerinin diğerlerine göre biraz daha yüksek olduğu görülmüştür.
- **Zeta Potansiyeli (ZP):**
  - Formülasyonların ZP değerleri  $18,6 \pm 1,3$  mV ile  $31,1 \pm 1,7$  mV arasında değişmiş, tüm formülasyonlarda pozitif yüzey yükleri tespit edilmiştir.
  - Etkin madde içeren sistemlerin ZP değerlerinin plasebo formülasyonlara oranla biraz daha yüksek olması, partiküller arası elektrostatik itme kuvvetinin artmasına ve böylece sistem stabilitesinin yükselmesine katkı sağlamaktadır.
- **Enkapsülasyon Etkinliği (%EE):**
  - Farklı seyreltmelerle hazırlanan örnekler üzerinden yapılan analizler sonucu, F1, F2 ve F3 formülasyonlarının %EE değerleri sırasıyla %84,840; %82,126 ve %51,492 olarak hesaplanmıştır.
  - F1 formülasyonu en yüksek, F3 ise en düşük enkapsülasyon verimini göstermiştir. Bu sonuçlar, ilacın partikül matrisi içerisine dahil olma mekanizmasının kullanılan yöntem ve formülasyon bileşenlerine göre değiştiğini göstermektedir.

**DSC Analizi:** Çalışmada elde edilen termogramlar, incelenen sıcaklık aralığında formülasyonların belirgin bir termal olaya maruz kalmadığını göstermiştir. Bu durum, formülasyon bileşenleri ile etkin madde arasında önemli bir fiziksel veya kimyasal değişimin olmadığına işaret etmektedir.

**FT-IR Analizi:** Hem etkin madde içeren hem de plasebo formülasyonların FT-IR spektrumlarında genel bant bölgelerinin benzer olduğu, ancak parmak izi bölgesinde kısmi farklılıklar bulunduğu gözlenmiştir. Saf KRV'nin karakteristik piklerinin formülasyonlarda doğrudan gözlenmemesi, etkin maddenin polimerik matriks içinde homojen bir dağılım gösterdiğini ve kimyasal etkileşim yerine fiziksel bir birliktelik sergilediğini düşündürmektedir (Gomathi vd., 2017; Güven ve Başaran, 2021). DSC sonuçları da bu bulgularla uyumlu olup, olası yeni piklerin ortaya çıkmaması kimyasal etkileşimlerin minimal olduğuna işaret etmektedir.

**İn Vitro Salım Çalışması:** Yapılan analizde kolon pH'sında etkin madde salım performansı en iyi olan formülasyon F1 formülasyonu olup, 24 saat sonunda oldukça yüksek bir kümülatif salım değeri elde edilmiştir. F2 ve F3 formülasyonlarında ise daha yavaş etkin madde salımı gözlenmiştir. KRV'nin kısa yarı ömürlü bir etkin madde olması ve piyasada mevcut olan geleneksel tablet formülasyonundan hızlı salınması, hastanın doz aralığını azaltmaktadır. Yapılan *İn vitro* salım çalışmaları, geliştirilen tüm PNP'lerden KRV'nin salım süresinin 24 saatten fazla olduğunu ortaya koymuş olup doz aralığının artmasında ve kontrollü salımın sağlanmasında umut vaad edicidir.

Bu tez çalışmasında, öncelikle KRV'nin termal ve spektral özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiş ve literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Böylelikle hem etkin maddenin saflığı hem de formülasyon süreçlerinde yapısal bütünlüğünü koruduğu doğrulanmıştır. Geliştirilen UV spektrofotometrik analiz yöntemi; doğruluk, kesinlik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri bakımından başarılı bulunmuş, KRV tayininde güvenilir bir yöntem olduğu ortaya konmuştur.

Farklı hazırlanma yöntemleri (mono emülsiyon, çift emülsiyon ve sprey kurutma) ile elde edilen NP formülasyonlarında partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği gibi kritik parametreler başarılı sonuçlar vermiştir. Özellikle F1 formülasyonunun diğer formülasyonlara kıyasla daha yüksek enkapsülasyon verimi sağlaması, bu yöntemin ilaç yüklemesi açısından avantajlı olduğunu düşündürmektedir.

DSC ve FT-IR analizleri, etkin maddenin formülasyon bileşenleriyle kimyasal bir etkileşim yerine fiziksel bir bütünleşme sergilediğini göstermiştir. Bu da uzun vadede formülasyonun kararlılığı için olumlu bir göstergedir.

Elde edilen düşük PDI değerleri, sistemlerin homojen ve dar boyut dağılımına sahip partiküller üretebildiğini kanıtlamaktadır. Pozitif yüklü partiküllerdeki yüksek zeta potansiyeli değerleri de taşıyıcı sistemlerin kararlı ve uzun raf ömrüne uygun olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında geliştirilen KRV yüklü PNP formülasyonlarının, etkin maddenin polimerik matris içerisinde yüksek oranda enkapsüle edilmesi, dar partikül boyut dağılımı, uygun zeta potansiyeli ve kimyasal uyumluluğu ile ilaç taşıma ve salım uygulamaları için umut vaat ettiği görülmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu formülasyonların *in vivo* farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin incelenmesini içerebilir. Böylelikle daha iyi etkinlik, daha az yan etki ve kontrollü salım avantajlarıyla KRV'ün terapötik kullanımı geliştirilerek, hasta uyuncu ve tedavi başarısı artırılacaktır.

## KAYNAKÇA

- Abdel-Mottaleb, M. M. A., Neumann, D., & Lamprecht, A. (2010). *In vitro* drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). *International Journal of Pharmaceutics*, 390(2), 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.001>
- ACD Labs. (2008). *Release 11.00, Product Version 11.02, Build 25941*.
- Adebiyi, A. P., Adebiyi, A. O., Hasegawa, Y., Ogawa, T., & Muramoto, K. (2009). Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. *European Food Research and Technology*, 228(3), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0950-3>
- Agrawal, U., Sharma, R., Gupta, M., & Vyas, S. P. (2014). Is nanotechnology a boon for oral drug delivery? *Drug Discovery Today*, 19(10), 1530–1546. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.011>
- Agrawal, Y., & Patel, V. (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 2(2), 81–87. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82950>
- Ahmed, K., Masum, Md., Sultana, S., Bhuiyan, M., & Reza, Md. (2016). Impact analysis of inclusion complexation on micromeritic properties and dissolution behavior of carvedilol. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (ss. 106-114). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/japs.2016.60716>.
- Amatya, S., Park, E. J., Park, J. H., Kim, J. S., Seol, E., Lee, H., Choi, H., & Shin, D. H. (2013). Drug release testing methods of polymeric particulate drug formulations. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 43(4), 259–266. <https://doi.org/10.1007/s40005-013-0072-5>
- Aronhime, J., et al. (2007). Pharmaceutical composition for controlled release. *AU 2007200344 A1*.
- Arzani, G., Haeri, A., Daeihamed, M., Bakhtiari-Kaboutaraki, H., & Dadashzadeh, S. (2015). Niosomal carriers enhance oral bioavailability of Karvedilol: Effects of bile salt-enriched vesicles and carrier surface charge. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4797–4813. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84703>
- Barzegar-Jalali, M., Alaei-Beirami, M., Javadzadeh, Y., Mohammadi, G., Hamidi, A., Andalib, S., & Adibkia, K. (2012). Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium-EUD RS100 nanoparticles

- and solid dispersions. *Powder Technology*, 219, 211–216.  
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.12.046>
- Başaran, E., Yenilmez, E., Berkman, M. S., Büyükköroğlu, G., & Yazan, Y. (2014). Chitosan nanoparticles for ocular delivery of cyclosporine A. *Journal of microencapsulation*, 31(1), 49-57.
- Beattie, K., Phadke, G., & Novakovic, J. (2013). Carvedilol. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, 38, 113-157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407691-4.00002-5>
- Benita, S. (2005). *Microencapsulation: Methods and industrial applications*. CRC Press.
- Bhagav, P., Upadhyay, H., & Chandran, S. (2011). Brimonidine tartrate-EUD long-acting nanoparticles: Formulation, optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), 1087–1101. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9675-1>
- Bonner, P. L. R. (2007). *Protein purification*. Taylor & Francis.
- British Pharmacopoeia Commission. (2013). *British Pharmacopoeia* (Vol. 2). London, UK: The Stationery Office.
- British Pharmacopoeia. (2013). *Karvedilol monograph* (Vol. 2).
- Brown, C. K., Friedel, H. D., Barker, A. R., Buhse, L. F., Keitel, S., Cecil, T. L., Kraemer, J., Morris, J. M., Reppas, C., Stickelmeyer, M. P., Yomota, C., & Shah, V. P. (2011). FIP/AAPS joint workshop report: Dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *Pharmaceutical Research*, 65(2), 129–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.001>
- Brunton, L. L., & Hilal-Dandan, R. (2017). *Goodman ve Gilman'in farmakoloji ve tedavi el kitabı* (R. Erdem, Çev.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
- Brunton, L. L., & Hilal-Dandan, R. (2017). *Goodman ve Gilman'in farmakoloji ve tedavi el kitabı* (R. Erdem, Çev.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
- Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., (2017). *Goodman Ve Gilman'in Farmakoloji Ve Tedavi El Kitabı*. (Çev: R. Erdem). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
- Bubendorf, A. G., et al. (2006). Composition for treatment of disease. *US 2006/0148878 A1*.
- Cardosa, S. G., Pereira, D. R., & Barth, T. (2001). Spectrophotometric determination of Karvedilol in pharmaceutical formulations through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. *Pharmazie*, 56(1), 34–37.

- Çomoglu, T. (2010). An overview of polymeric particulate drug delivery system formulations. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 39(4), 343–368.
- D’Souza, S. (2014). A review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/304757>
- D’Souza, S. (2014). A review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/304757>
- D’Souza, S. S., & DeLuca, P. P. (2006). Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharmaceutical Research*, 23(3), 460–474. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9397-8>
- Derman, S., Kızılbey, K., & Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31(1), 107-120.
- Desai, J., et al. (2011). Modified release formulation for pharmaceutical use. *WO2011/119477 A2*.
- Dulin, B., & Abraham, W. T. (2004). Pharmacology of carvedilol. *The American Journal of Cardiology*, 93(9), 3-6. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.09.049>
- Duygu, D., Baykal, T., Açıkgöz, İ., & Yıldız, K. (2009). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. *Gazi University Journal of Science*, 22(3), 117-121.
- European Pharmacopoeia. (2019). *European Pharmacopoeia* (10th ed.). Strasbourg, France: Council of Europe.
- Faisant, N., Akiki, J., Siepmann, F., Benoit, J. P., & Siepmann, J. (2006). Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(2), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.07.030>
- Fan, Y., Marioli, M., & Zhang, K. (2021). Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>
- Fan, Y., Marioli, M., & Zhang, K. (2021). Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>

- FDA. (1997). *Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms; extended release solid oral dosage forms: Development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations.*
- FDA. (1997). *Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms; extended release solid oral dosage forms: Development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations.*
- Fernandes, G. J., Kumar, L., Sharma, K., Tunge, R., & Rathnanand, M. (2018). A review on solubility enhancement of carvedilol—a BCS class II drug. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 13, 197-212. <https://doi.org/10.1007/s12247-018-9328-8>
- Feuerstein, G., Yue, T. L., Ma, X., & Ruffolo, R. R. (1998). Novel mechanisms in the treatment of heart failure: Inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvedilol. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 41(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(98\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(98)80004-5)
- Frishman, W. H. (1998). Carvedilol. *New England Journal of Medicine*, 339(24), 1759-1765. <https://doi.org/10.1056/NEJM199812103392407>
- Gannu, R., Yamsani, V. V., & Rao, Y. M. (2007). New RP-HPLC method with UV-detection for the determination of carvedilol in human serum. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 30(11), 1677-1685. *related technologies*, 30(11), 1677-168
- Gite, S., Chogale, M., & Patravale, V. (2016). Development and validation of a discriminating dissolution method for atorvastatin delayed-release nanoparticles using a flow-through cell: A comparative study using USP apparatus 4 and 1. *Dissolution Technologies*, 23(2), 14–20. <https://doi.org/10.14227/DT230216P14>
- Giro-Paloma, J., Martínez, M., Cabeza, L. F., & Fernández, A. I. (2016). Types, methods, techniques, and applications for microencapsulated phase change materials (MPCM): A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 1059-1075.
- Fabrication of letrozole formulation using chitosan nanoparticles through ionic gelation method. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1820-1832.
- Gregoriadis, G., & Perrie, Y. (2010). “Liposomes.” In *Encyclopedia of Life Sciences* (Chichester: John Wiley & Sons). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002656.pub2>

- Guo, W., Quan, P., Fang, L., Cun, D., & Yang, M. (2015). Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, *in vitro* and *in vivo* study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(5), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.06.001>
- Gupta, R., Chen, Y., & Xie, H. (2021). *In vitro* dissolution considerations associated with nano drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(6), 1–34. <https://doi.org/10.1002/wnan.1732>
- Güven, U. M., Öztürk, A. A., & Yenilmez, E. (2020). Evaluation of carvedilol-loaded EUD nanoparticles. *Içinde Journal of Research in Pharmacy (C. 24, Issue 1, ss. 1-11)*. ASOS Yayınevi. <https://doi.org/10.35333/jrp.2020.116>
- Güven, U. M., Başaran, E. (2021). "In vitro-in vivo evaluation of olopatadine incorporated chitosan nanoparticles for the treatment of ocular allergy". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 64.
- Hami, Z. (2021). A brief review on advantages of nano-based drug delivery systems. *Annals of Military and Health Sciences Research*, 19(1), 1–6. <https://doi.org/10.5812/amh.112274>
- Heng, D., Cutler, D. J., Chan, H. K., Yun, J., & Raper, J. A. (2008). What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? *Pharmaceutical Research*, 25(7), 1696–1701. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9560-0>
- Hickey, J. W., Santos, J. L., Williford, J. M., & Mao, H. Q. (2015). Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *Journal of Controlled Release*, 219, 536-547.
- Hildesheim, J., et al. (2006). European Patent for drug delivery system. *EP 1,655,285 A1*.
- Hildesheim, J., et al. (2009). U.S. Patent for pharmaceutical composition. *US 2009/0326033 A1*.
- Ieggli, C. V. S., Cardoso, S. G., & Belle, L. P. (2005). Validation of UV spectrophotometric and nonaqueous titration methods for the determination of carvedilol in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1299-1303.
- Jain, S. K., Jain, A. K., & Rajpoot, K. (2020). Expedition of Eudragit® polymers in the development of novel drug delivery systems. *Current drug delivery*, 17(6), 448-469.

- Jagannathan, L., Meenakshi, R., Gunasekaran, S., & Srinivasan, S. (2010). FT-IR, FT-Raman and UV-vis spectra and quantum chemical investigation of carvedilol. *Molecular Simulation*, 36(4), 283-290.
- Joseph, E., & Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* (pp. 91–116).
- Joseph, E., & Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* (pp. 91–116). Elsevier.
- Joshi, M., Pathak, S., Sharma, S., & Patravale, V. (2008). Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.032>
- Joshi, M., Pathak, S., Sharma, S., & Patravale, V. (2008). Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.032>
- Kammari, R., Das, N. G., & Das, S. K. (2017). Nanoparticulate systems for therapeutic and diagnostic applications. In *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00006-1>
- Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S., & Kakkar, V. (2008). Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled release*, 127(2), 97-109.
- Kayaalp, O. S. (2012). *Akılci tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (13. baskı). Ankara: Pelikan Yayıncılık, 80-89.
- Kipriye, Z., Şenel, B., & Yenilmez, E. (2017). Preparation and evaluation of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for targeted drug delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(9), 2057-2068.
- Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., Kim, J. T., Kim, H., Cho, J. M., Yun, G., & Lee, J. (2014). Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution, and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005>

- Kor, I., & Wizel, S. (2009). *Method for preparing sustained release dosage forms* (US Patent No. 2009/0163721 A1).
- Liu, D., Pan, H., He, F., Wang, X., Li, J., Yang, X., & Pan, W. (2015). Effect of particle size on oral absorption of carvedilol nanosuspensions: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, *10*, 6425-6436. <https://doi.org/10.2147/IJN.S90996>
- Loftsson, T., Brewster, M. E., & Másson, M. (2008). Karvedilol: solubilization and cyclodextrin complexation: A technical note. *AAPS PharmSciTech*, *9*(2), 425–430. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9057-7>
- Loftsson, T., et al. (2008). Karvedilol: Solubilization and cyclodextrin complexation: A technical note. *AAPS PharmSciTech*, *9*(2), 425–430. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9057-7>
- Manohar, S. D., Shridhar, D. A., & Mallikarjuna, S. C. (2014). Solubility and dissolution enhancement of Karvedilol by solid dispersion technique using Gelucire 50/13. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *29*(2), 161–165.
- McTavish, D., Campoli-Richards, D., & Sorkin, E. M. (1993). Carvedilol: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, *45*(2), 232-258. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345020-00007>
- Menon, S. K., et al. (2012). Evaluation and solubility improvement of Karvedilol: PSC[n]arene inclusion complexes with acute oral toxicity studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, *73*(1-2), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0017-3>
- Menon, S. K., et al. (2012). Evaluation and solubility improvement of Karvedilol: PSC[n]arene inclusion complexes with acute oral toxicity studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, *73*(1–2), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0017-3>
- Moreno-Bautista, G., & Tam, K. C. (2011). Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the *in vitro* drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *389*(1–3), 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.07.032>
- Morgan, T. (1994). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clinical Pharmacokinetics*, *26*(5), 335-346. <https://doi.org/10.2165/00003088>

- Nasir, A., Kausar, A., & Younus, A. (2015). A review on preparation, properties and applications of polymeric nanoparticle-based materials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(4), 325–341.
- Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). W.H. Freeman.
- Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). W.H. Freeman and Company.
- Ogrodowczyk, M., Dettlaff, K., & Jelinska, A. (2016). Beta-blockers: current state of knowledge and perspectives. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(1), 40-54.
- Ongun Özdemir, A., & Ertaş, F. S. (2005). Karvedilol: Klinik kullanımı. *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*, 12(4), 183-189.
- Öztürk, A. A., Çınar, N. İ., Yenilmez, E. 2019. "Development of nano-sized ketoprofen lysine incorporated Eudragit® S100 nanomedicine by double emulsion solvent evaporation and in vitro characterization". *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 7(1), 47-58. Geliş tarihi gönderen <http://jppres.com/jppres> (a)
- Öztürk, A. A., Yenilmez, E., & Özarda, M. G. (2019). Clarithromycin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and surface modification with chitosan on formulation, nanoparticle characterization and antibacterial effects. *Polymers*, 11(10), 1632.(b)
- Özyıldız, A. G. (2014). Esansiyel hipertansiyon hastalarında yeni başlanan karvedilol ve nebivolol tedavisinin insülin direnci ve lipid profiline etkisi (Tıpta uzmanlık tezi).
- Packer, M., Fowler, M. B., Roecker, E. B., Coats, A. J., Katus, H. A., Krum, H., ... & DeMets, D. L. (2002). Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: Results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation*, 106(17), 2194-2199. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000035653.72855.BF>
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: Biochemistry, biotechnology, clinical chemistry* (2nd ed.). Woodhead Publishing.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: Biochemistry, biotechnology, clinical chemistry* (2nd ed.). Woodhead Publishing.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: Biochemistry, biotechnology, clinical chemistry* (2nd ed.). Woodhead Publishing.

- Patel, L. J., Solanki, R. V., & Shah, V. P. (2006). RP-HPTLC and HPTLC methods for the estimation of Karvedilol in bulk drug and pharmaceutical formulations. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(6), 790–792.
- Patil, A. V., et al. (2008). Drug delivery system. *WO2008/083130 A2*.
- Patwekar, S. L., & Baramade, M. K. (2012). Controlled release approach to novel multiparticulate drug delivery system. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 757–763.
- PharmGKB. (2024). *Carvedilol pathway: Overview*. Erişim adresi: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA166179270/overview>
- Pires, C. K., Nunes, E. J., & Costa, R. F. (2005). Chemiluminometric determination of Karvedilol in a multi-pumping flow system. *Talanta*, 68(1), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.01.010>
- Prabha, S., & Labhasetwar, V. (2004). Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 354–364. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016250.56402.99>
- Prabha, S., Zhou, W. Z., Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2002). Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1–2), 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00315-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00315-0)
- Radi, A., & Elmogy, T. (2005). Differential pulse voltammetric determination of carvedilol in tablets dosage form using glassy carbon electrode. *Il Farmaco*, 60(1), 43-46.
- Ramanjaneyulu, G. S., et al. (2009). Method for drug formulation. *US 2009/0286991 A1*.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.
- Raut, D. M., et al. (2011). Determination of traces of amorphous Karvedilol content in Karvedilol drug substance and drug product using modulated differential scanning calorimetry. *Pharmaceutical Letters*, 3(1), 1–12.
- Raut, D. M., Shah, V. P., Brown, C. K., Dressman, J., & Siewert, M. (2011). Determination of traces of amorphous Karvedilol content in Karvedilol drug substance and drug product using modulated differential scanning calorimetry. *Pharmaceutical Letters*, 3(1), 1–12.

- Rawat, A., Bhardwaj, U., & Burgess, D. J. (2012). Comparison of *in vitro-in vivo* release of Risperdal® Consta® microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1–2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.006>
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8–21.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I: Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Righetti, P. G., & Boschetti, E. (2013). *Detailed methodologies and protocols: Low-abundance proteome discovery: State of the art and protocols*. Newnes.
- Ruffolo, R. R., Jr., Boyle, D. A., Venuti, R. P., & Lukas, M. A. (1993). Preclinical and clinical pharmacology of carvedilol. *Journal of Human Hypertension*, 7(Suppl. 2), S2-S15.
- Selvamani, V. (2019). Stability studies on nanomaterials used in drugs. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery* (pp. 425–444).
- Sharma, A., & Jain, C. P. (2010). Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with PVP K30. *Research in pharmaceutical sciences*, 5(1), 49.
- Shen, J., & Burgess, D. J. (2013). *In vitro* dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: Recent developments and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(5), 409–415. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0129-z>
- Shen, J., & Burgess, D. J. (2013). *In vitro* dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: Recent developments and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(5), 409–415. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0129-z>
- Siewert, M., Dressman, J., Brown, C. K., & Shah, V. P. (2003). FIP/AAPS guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *Pharmazeutische Industrie*, 65(2), 129–134.
- Singh, S., & Preuss, C. V. (2022). Carvedilol. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.statpearls.com>

- Smith, J. A., & Jones, B. (2023). Thermal characterization of a novel biodegradable polymer using differential scanning calorimetry. *Journal of Polymer Science*, 50(2), 123-130.
- Sürer, S. Ç. (2014). Deneysel artrit modelinde irbesartan, karvedilol ve kombine tedavinin etkisi (Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Tomic, I., Vidis-Millward, A., Mueller-Zsigmondy, M., & Cardot, J. M. (2016). Setting accelerated dissolution test for PLGA microspheres containing peptide, investigation of critical parameters affecting drug release rate and mechanism. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.048>
- Tomic, I., Vidis-Millward, A., Mueller-Zsigmondy, M., & Cardot, J. M. (2016). Setting accelerated dissolution test for PLGA microspheres containing peptide, investigation of critical parameters affecting drug release rate and mechanism. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.048>
- Türk Farmakopesi (TFA). (2017). Analiz yöntemleri/malzemeleri. *Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu*.
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. (2023). *Karvedilol Kullanım Bilgisi*. Erişim adresi: <https://titck.gov.tr/storage/kubKtAttachments/9cc5e61c28884.pdf>
- USP 43: United States Pharmacopeia and the National Formulary (USP 43 NF 38). (2019). Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention.
- Vandervoort, J., & Ludwig, A. (2002). Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: A factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics*, 238(1–2), 77–92. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00076-2)
- Ventola, C. L. (2017). Progress in nanomedicine: Approved and investigational nanodrugs. *Pharmacy and Therapeutics*, 42(12), 742–755.
- Verma, J. K., & Syed, H. A. (2007). Extractive spectrophotometric method for determination of Karvedilol in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(2), 303–304. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.33156>
- Wallace, S. J., Li, J., Nation, R. L., & Boyd, B. J. (2012). Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology.

- Drug Delivery and Translational Research*, 2(4), 284–292.  
<https://doi.org/10.1007/s13346-012-0064-4>
- Wallenwein, C. M., Nova, M. V., Janas, C., Jablonka, L., Gao, G. F., Thurn, M., Albrecht, V., Wiehe, A., & Wacker, M. G. (2019). A dialysis-based *in vitro* drug release assay to study dynamics of the drug-protein transfer of temoporfin liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 143, 44–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.010>
- Wang, X.-Q., & Zhang, Q. (2012). pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2), 219–229.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.07.014>
- Wang, Y., Li, C., Sun, B., Wang, Y., Wang, S., & Gao, C. (2014). A novel three-dimensional large-pore mesoporous carbon matrix as a potential nanovehicle for the fast release of the poorly water-soluble drug, celecoxib. *Pharmaceutical Research*, 31(4), 1059–1070. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1227-9>
- Wells, B. G., DiPiro, J. T., Schwinghammer, T. L., & DiPiro, C. V. (2019). *Farmakoterapi el kitabı* (T. Çelik, Çev.). İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri.
- Yalçınkaya K, Şenel B, Akyıl E. Formulation, Characterization, and Cytotoxic Effect of Indomethacin-Loaded Nanoparticles. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2024 Dec 27. Epub ahead of print. PMID: 39757603.  
<https://doi.org/10.2174/0118715230348349241126053733>
- Ye, L., Furuishi, T., Yamashita, T., & Yonemochi, E. (2024). Characterization and Crystal Structural Analysis of Novel Carvedilol Adipate and Succinate Ethanol-Solvated Salts. *Molecules*, 29(19), 4704.
- Yen, S. Y., Sung, K. C., Wang, J. J., & Yoa-Pu Hu, O. (2001). Controlled release of nalbuphine propionate from biodegradable microspheres: *In vitro* and *in vivo* studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 220(1–2), 91–99.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00649-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00649-4)
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Görgülü Ş. (2021). Surface Modification of PLGA Nanoparticles with Chitosan or EUD RS 100: Characterization, Prolonged Release, Cytotoxicity, and Enhanced Antimicrobial Activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 61:102145.

- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Özer, S., Büyükköroğlu, G., & Yazan, Y. (2018). Formulation and *in vitro* evaluation of moxifloxacin hydrochloride-loaded polymeric nanoparticles for ocular application. *Latin American Journal of Pharmacy*, 37(9), 1850-62 62
- Zafar, A., Yasir, M., Alruwaili, N. K., Imam, S. S., Alsaidan, O. A., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Alquraini, A., Rawaf, A., Ansari, M. J., & Sara, U. (2022). Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery system of cephalexin: Physiochemical characterization and antibacterial evaluation. *Polymers*, 14(5), 1055. <https://doi.org/10.3390/polym14051055>
- Zafar, A., Yasir, M., Alruwaili, N. K., Imam, S. S., Alsaidan, O. A., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Alquraini, A., Rawaf, A., Ansari, M. J., & Sara, U. (2022). Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery system of cephalexin: Physiochemical characterization and antibacterial evaluation. *Polymers*, 14(5), 1055. <https://doi.org/10.3390/polym14051055>
- Zafar, A., Yasir, M., Alruwaili, N. K., Imam, S. S., Alsaidan, O. A., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Alquraini, A., Rawaf, A., Ansari, M. J., & Sara, U. (2022). Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery system of cephalexin: Physiochemical characterization and antibacterial evaluation. *Polymers*, 14(5), 1055. <https://doi.org/10.3390/polym14051055>
- Zhang, Y., Wang, H., Li, C., Sun, B., Wang, Y., Wang, S., & Gao, C. (2014). A novel three-dimensional large-pore mesoporous carbon matrix as a potential nanovehicle for the fast release of the poorly water-soluble drug, celecoxib. *Pharmaceutical Research*, 31(4), 1059–1070. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1227-9>
- Zhao, Z., Ukidve, A., Krishnan, V., & Mitragotri, S. (2019). Effect of physicochemical and surface properties on *in vivo* fate of drug nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 142, 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.012>
- Zhao, Z., Ukidve, A., Krishnan, V., & Mitragotri, S. (2019). Effect of physicochemical and surface properties on *in vivo* fate of drug nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 142, 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.012>
- Zoroddu, M. A., Arca, M., & Sanna, D. (2003). Karvedilol, a  $\beta$ -adrenoceptor blocker with chelating properties: A copper “superdimer” based on dimetal units. *Journal of*

*Inorganic Biochemistry*, 95(4), 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00046-7)

Zoroddu, M. A., Arca, M., & Sanna, D. (2009). Metal-chelating properties of Karvedilol: An antihypertensive drug with antioxidant activity. *Journal of Coordination Chemistry*, 62(23), 3828–3836. <https://doi.org/10.1080/00958970903227066>

Zoroddu, M. A., et al. (2009). Metal-chelating properties of Karvedilol: An antihypertensive drug with antioxidant activity. *Journal of Coordination Chemistry*, 62(23), 3828–3836. <https://doi.org/10.1080/00958970903227066>

Zupet, R., et al. (2005). Method and composition for topical treatment of skin conditions. *WO 2005/021504 A2*.

Zupet, R., et al. (2005). Patent application for pharmaceutical compound, *WO 2005/021504 A2*.

<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA166179270/pathway>

<https://titck.gov.tr/storage/kubKtAttachments/9cc5e61c28884.pdf>

<https://www.vademecumonline.com.tr/substance/343#ilaclar>

## **EKLER**

EK-1

POSTER BİLDİRİ



# ISOP S 14<sup>th</sup> International SYMPOSIUM ON PHARMACEUTICAL SCIENCES



**TÜBİTAK**

ISOPS14 is supported within the scope of  
TÜBİTAK BİDEP 2223-B Grant Program



REPUBLIC OF TÜRKİYE  
MINISTRY OF CULTURE AND TOURISM

**TIKA**

**JUNE 25-28, 2024  
ANKARA, TÜRKİYE**

**BOOK OF  
ABSTRACT**



ANKARA UNIVERSITY  
FACULTY OF PHARMACY



ISOP  
S 14<sup>th</sup> International  
SYMPOSIUM ON  
PHARMACEUTICAL  
SCIENCES



<b>P098 STIMULI-RESPONSIVE FIBERS FOR SKIN TISSUE ENGINEERING</b> POLLINI, M., RUGGERI, M., VIGANI, B., ROSSI, S., SANDRI, G. ....	299
<b>P099 CENTRIFUGAL SPUN MICROFIBERS FOR THE TREATMENT OF SKIN CHRONIC WOUNDS</b> <sup>1</sup> NOMICISIO, C., <sup>1</sup> RUGGERI, M., <sup>1</sup> VIGANI, B., <sup>2</sup> VISERAS, C., <sup>3</sup> TAVIOT-GUÉHO, C., <sup>1</sup> ROSSI, S., <sup>1</sup> SANDRI, G. ....	300
<b>P100 ANTIBACTERIAL POLYMERIC NANOPARTICLES EMBEDDED INTO ZEIN SURFACE COATINGS AS A PROMISING TOOL FOR IMPROVING IMPLANT BIOACTIVITY</b> AMEDEO UNGOLO, MARCO RUGGERI, BARBARA VIGANI, SILVIA ROSSI, GIUSEPPINA SANDRI .....	301
<b>P101 INORGANIC NANOPARTICLES-DOPED NANOFIBROUS SCAFFOLD FOR SKIN REGENERATION</b> MARSANI, S., RUGGERI, M., VIGANI, B., ROSSI, S., SANDRI, G. ....	302
<b>P102 PREPARATION AND IN VITRO EVALUATION OF POLYMERIC NANOPARTICLE FORMULATIONS CONTAINING CARVEDILOL</b> <sup>1</sup> ARAL, I., <sup>2</sup> AKYIL, E. ....	303
<b>P103 PREPARATION AND IN VITRO EVALUATION OF NORFLOXACIN-LOADED PLGA NANOPARTICLES FOR OCULAR APPLICATION</b> <sup>1,2</sup> BAŞARAN, N., <sup>3</sup> BAKOWSKY, U., <sup>4</sup> YURTDAS-KIRIMLIOĞLU, G., <sup>1,4,5</sup> AYKAÇ, K., <sup>6</sup> CANTÜRK, Z., <sup>4</sup> BAŞARAN, E. ....	304
<b>P104 CYTOKINE GENETIC VARIANTS LINKED TO THE DEVELOPMENT AND COMPLICATION OF TYPE 2 DIABETES AMONG A GROUP OF TURKISH PEOPLE</b> <sup>1</sup> ATES, I., <sup>1</sup> KOCATEPE-GUVENC, A., <sup>1</sup> SUZEN, S., <sup>2</sup> IRHAM, LM. ....	305
<b>P105 ASSESSMENT OF THE IMPACT OF POTASSIUM CYANIDE EXPOSURE AND THYROID HOMEOSTASIS ON JEWELRY WORKERS</b> <sup>1</sup> SAYGILI, I., <sup>2</sup> TUTKUN, E., <sup>3</sup> ERDOGMUS, E., <sup>3</sup> KOCER-GUMUSEL, B. ....	306
<b>P106 INVESTIGATION OF THE DNA DAMAGE-INDUCING PROPERTIES OF BPA, BPS, AND BPZ ON MCF-7 CELL LINE</b> <sup>1,2</sup> ERDOGMUS, E., <sup>1,3</sup> IPEK-TEKNECI, S., <sup>2</sup> KOCER-GUMUSEL, B., <sup>3</sup> DUYDU, Y., <sup>3</sup> USTUNDAG, A. ....	307
<b>P107 INVESTIGATING THE AMELIORATIVE EFFECT OF SITAGLIPTIN AGAINST TERT-BUTYL HYDROPEROXIDE INDUCED TOXICITY IN HEPG2 CELLS</b> BAYSAL, M. ....	308
<b>P108 MICROPLASTICS AND THE EMERGING CONCERNS ABOUT FOOD SAFETY: A BIBLIOMETRIC PERSPECTIVE</b> <sup>1</sup> YIGÜNDOĞDU, I., <sup>2</sup> GEDIK, K., <sup>1</sup> ÇAKMAK, G. ....	309
<b>P109 DNA REPAIR CAPACITY IN RESPONSE TO HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE DNA DAMAGE IN 3T3 CELL LINE</b> <sup>1,2</sup> IPEK TEKNECI, S., <sup>3</sup> IMER, A., <sup>1</sup> USTUNDAG, A., <sup>1</sup> DUYDU, Y. ....	310
<b>P110 THE SURVIVAL RATE OF ISOLATED LYMPHOCYTES UNDER DIFFERENT STORAGE CONDITIONS</b> <sup>1</sup> KERIMOĞLU, S., <sup>1,2</sup> IPEK-TEKNECI, S., <sup>2</sup> USTUNDAG, A., <sup>2</sup> DUYDU, Y. ....	311
<b>P111 COMPARATIVE HEAVY METAL ANALYSIS OF TAR PHASES ISOLATED FROM THE MAINSTREAM SMOKES OF CONVENTIONAL CIGARETTES AND HEATED TOBACCO PRODUCTS</b> <sup>1</sup> CETIN, M., <sup>2</sup> AZEVEDO, R., <sup>2</sup> ALMEIDA, A., <sup>1</sup> REIS, R. ....	312
<b>P112 INVESTIGATION OF THE HEPATOTOXIC EFFECTS OF SOME HERBAL PRODUCTS BY IN VITRO METHOD</b> <sup>1</sup> COŞKUN, N., <sup>1</sup> ÜLKER, Ö., <sup>2</sup> YURDAKÖK, B., <sup>2</sup> ERDOĞAN, G. ....	313
<b>P113 EVALUATION OF THE HEPATOTOXICITY OF HYDROXYCHLOROQUINE SULFATE IN RATS</b> <sup>1</sup> BAKIR, E., <sup>1</sup> ÖKÇESİZ-HACISEYİTOĞLU, A., <sup>2</sup> TOPAK, D., <sup>3</sup> GÜRBÜZ, K., <sup>4</sup> VAROL, S., <sup>1</sup> EKEN, A. ....	314
<b>P114 INVESTIGATION OF CYTOTOXICITY OF 2,4-D AND GLYPHOSATE BASED HERBICIDE USING ONCORHYNCHUS MYKISS (RAINBOW TROUT) LIVER CELLS (RTL-W1)</b> <sup>1</sup> ESEN, B., <sup>2</sup> ÜLKER, Ö. ....	315
<b>P115 PREDICTING ENDOCRINE DISTURPTING AND DEVELOPMENTAL EFFECTS OF SYNTHETIC CATHINONES VIA IN SILICO EVALUATION</b> <sup>1</sup> YILMAZ-SARIALTIN, S., <sup>2</sup> YALÇIN, CÖ. ....	316
<b>P116 A PRELIMINARY STUDY ON THE EFFECT OF CITRUS SPECIES ON HEPATIC CYP1A1 ACTIVITY</b> <sup>1,2</sup> GOKKAYA, I., <sup>2,3</sup> KOCYIGIT, A., <sup>2,3</sup> GUVEN, NM., <sup>1</sup> RENDA, G., <sup>2</sup> CAN-EKE, B. ....	317
<b>P117 PHARMACEUTICAL INDUSTRY AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS</b> <sup>1</sup> ÖZGÜN, K., <sup>2</sup> SÖZEN-ŞAHNE, B. ....	318
<b>P118 AN EVALUATION OF THE PHARMACIST COOPERATIVES WEBSITES</b> <sup>1</sup> EFE, E., <sup>2</sup> SÖZEN-ŞAHNE, B. ....	319



## P102

### PREPARATION AND IN VITRO EVALUATION OF POLYMERIC NANOPARTICLE FORMULATIONS CONTAINING CARVEDILOL

<sup>1</sup>Aral, İ., <sup>2</sup>Akyıl, E.

<sup>1</sup> Anadolu University, Graduate School, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey  
<sup>2</sup> Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey

**Introduction:** The aim of this study was to prepare an orally applicable polymeric nanoparticle (NP) delivery system containing carvedilol (CAR), which is a non-selective betablocker indicated after heart failure and myocardial infarction (1). Polymeric nanoparticles can be developed to target the drug to a specific area (2). In vitro dissolution tests were performed to evaluate release properties and improve the efficacy of the novel drug delivery platform.

**Materials and Methods:** CAR (gifted by DEVA Holding, Turkey), Eudragit S100 (Evonik, Germany). All other chemicals were in analytical grade. Ultraviolet (UV) Spectrophotometric method was used for the determination of CAR in validation experiments and pharmaceutical formulations (2). Carvedilol was analyzed at 242 nm wavelength. Eudragit S100 was used as the polymer in all formulations. CAR-loaded-NPs were prepared using Nano Spray-Dryer and nanoprecipitation method. 2 different formulations were prepared for the nanoprecipitation method; mono-emulsion and double

emulsion. Properties of NPs were evaluated by particle size (PS), zeta potential (ZP), SEM, encapsulation efficiency (EE%), dissolution, release kinetics, NMR, DSC and FT-IR (3).

**Results:** CAR containing nanoparticle formulations were successfully prepared using Eudragit S 100. Formulations were characterized to evaluate their properties.

**Conclusions:** CAR containing polymeric nanoparticle formulations were developed to provide solutions to overcome problems of treatment with carvedilol. In the studies, the UV-spectroscopy method validated for carvedilol showed to be a selective and accurate method for quantification. Physicochemical structure and release properties were explained by various analyses. It was concluded that the developed formulations are a hopeful transporter for oral carvedilol delivery.

This work has been supported by Anadolu University Scientific Research Projects Coordination Unit under grant number TYL-2023-1865

#### References:

1. Alves et al., 2016. Evaluation and correlation of the physicochemical properties of carvedilol. *Pharm Dev Technol.* 21(7): 856- 866.
2. Güven et al., 2020. Evaluation of carvedilol-loaded Eudragit\* nanoparticles. *Journal of Research in Pharmacy*, Vol. 24, Issue 1, pp. 1–11.
3. A. A. Öztürk Et Al., 2018. New Approach to Hypertension Treatment: Carvedilol-Loaded PLGA Nanoparticles, Preparation, In Vitro Characterization and Gastrointestinal Stability. *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 37, Issue 9, pp.1730-1741.