

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.org.tr/ejbc



Fitozom formülasyonundan berberin miktar tayini için HPLC yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonu

Ayça Güngör-Ak¹ , Ayşegül Karataş^{2*} 

¹Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*Corresponding author : akaratas@pharmacy.ankara.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-5157-5187>

Received : 09/05/2020
Accepted : 06/12/2020

Özet: Bitkilerden elde edilen aktif bileşenlerin önemli bir bölümü, uzun yan zincirlere ve yüksek polariteye sahiptir. Bu da gastrointestinal mukozadan veya deriden pasif difüzyonla emilime engel teşkil etmektedir. Bu noktada, 'fito-fosfolipid' veya 'fitozom' olarak adlandırılan yeni kompleksleştirme tekniği, absorpsiyonu kolaylaştırmak ve biyoyararlanımı artırmakta önemli bir rol oynamaktadır. Fitozomlar, bitkisel kaynaklı etkin maddelerin soya lesitini gibi doğal fosfolipidlerle uygun bir solvan/solvan sisteminde kompleks oluşturması sonucu oluşan yapılardır. Fitozom formülasyonlarının karakterizasyonlarının yapılması amacıyla partikül boyutu ölçümü, etken madde salım hızı tayini, erime noktası tayini gibi in vitro testler yapılır. Enkapsülasyon etkinliği de ölçümü yapılarak değerlendirilen bir diğer parametredir. Enkapsülasyon etkinliği formülasyon içinde tutulan etken maddenin %'de olarak ifadesidir. Formülasyonun enkapsülasyon etkinliğinin tayin edilebilmesi için etken maddenin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonunun yapılması gerekir. Çalışmada fitozom formülasyonlarındaki berberin miktarını tayin etmek amacıyla HPLC metodunun geliştirilmesi ve analitik validasyonunun yapılması amaçlanmıştır. HPLC analizleri Agilent 1260 Infinity II cihazında Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm) kolonda, 1 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Berberin fitozom formülasyonundan berberinin miktar tayininin yapılması amacıyla HPLC miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve ilgili ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir. Berberinin fitozom formülasyonlarında bulunan yardımcı maddelerden ayrılarak miktar tayinin yapılabilmesi önemlidir. Bu noktada analitik validasyon parametrelerinden özgünlük detaylı olarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntem özgünlük, doğrusalık ve aralığı, doğruluk, kesinlik, geri elde edilebilirlik parametreleri yönünden değerlendirilmiş ve berberinin miktar tayini için güvenilir olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Berberin, Fitozom, Fosfolipid kompleks, HPLC, Analitik validasyon

Development and Validation of HPLC Method for the Quantification of Berberine in Phytosome Formulations

Abstract: An important part of the active ingredients derived from plants has long side chains and high polarity. This prevents absorption through passive diffusion from the gastrointestinal mucosa or skin. At this point, the new complexing technique called "phyto-phospholipid" or "phytosome" plays an important role in facilitating absorption and increasing bioavailability. Phytosomes are structures formed as a result of the fact that active ingredients of plant origin form complexes with natural phospholipids such as soy lecithin in a suitable solvent / solvent system. In order to make the characterization of phytosome formulations, in vitro tests such as particle size measurement, active substance release rate determination, melting point determination are performed. Encapsulation efficiency is another parameter that is evaluated by measuring. Encapsulation efficiency is the expression of the active substance in the formulation in %. In order to determine the encapsulation efficiency of the formulation, the quantification method of the active ingredient should be developed and analytical validation should be done. In this study, it was aimed to develop HPLC method and analytical validation to determine the amount of berberine in phytosome formulations. HPLC analyzes were carried out in the Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm) column on Agilent 1260 Infinity II device at a flow rate of 1 mL / min. In order to determine the berberine from the phytosome formulation, the HPLC quantification method was developed and validated according to the relevant ICH guidelines. It is important to be able to determine the amount of berberine by separating the excipients in the phytosome formulations. Therefore, specificity from analytical validation parameters has been evaluated in detail. The developed method was evaluated in terms of specificity, linearity and range, accuracy and precision parameters. It has been determined that the developed method is reliable for quantification of berberine in phytosome formulations.

Keywords: Berberine, Phytosome, Phospholipid complex, HPLC, Analytical validation

1. Giriş

Bitkilerden elde edilen aktif bileşenler eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kidd 2009). Bitkisel kaynaklı etken maddelerin modern tedaviye aktarılması giderek yaygınlaşmaktadır. Fakat bu etken maddelerin önemli bir bölümü, uzun yan zincirlere ve yüksek polariteye sahiptir. Bu da gastrointestinal mukozadan veya deriden pasif difüzyonla emilime engel teşkil etmektedir (Karataş ve Turhan 2015). Bu noktada, 'fito-fosfolipid' veya "fitozom" olarak adlandırılan yeni kompleksleştirme tekniği, absorpsiyonu kolaylaştırmak ve biyoyararlanımı artırmakta önemli bir rol oynamaktadır. Fitozomlar, bitkisel kaynaklı etken maddelerin soya lesitini gibi doğal fosfolipidlerle uygun bir solvan/solvan sisteminde kompleksleştirilmesiyle oluşan yapılardır. Herbozom olarak da adlandırılabilirler. Temel olarak bitkisel aktif bileşen ve fosfolipid arasındaki etkileşim sonucu, su ve yağda çözünebilir bir kompleks meydana gelmektedir. Fitozomlar bitkisel etkin maddelerin akut ve kronik tedavide etkinliği belirleyen farmakokinetik ve farmakolojik parametrelerini iyileştirmek için uygun taşıyıcı sistemler olarak önerilmektedir. Berberin (BER); Berberin vulgaris, Berberis aquifolium, Hydrastis canadensis ve Coptis chinensis gibi birçok farklı bitkiden elde edilebilen kuaterner benzilzokinolin alkaloiddir. Çin tıbbında özellikle oral olarak diyare tedavisinde ve uzun zaman boyunca da antimikrobiyal olarak kullanılmıştır. Son yıllarda antihipertansif (Sut ve ark. 2017), hipoglisemik (Liang ve ark. 2019), antikanser (Wang ve ark. 2020), antidepresan (Kulkami ve Dhir 2010), antiinflamatuvar (Cicero ve ark. 2016) ve hepatoprotektif (Zhao ve ark. 2018) etkileri de çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Ancak berberinin oral biyoyararlanımı düşüktür. Berberinin zayıf oral biyoyararlanım göstermesinin sebepleri; karaciğerde ve bağırsakta ilk geçiş etkisine uğraması, kendi kendine birleşme göstermesi sonucu gastrointestinal alanda çözünürlüğünün azalması, barsak membranından geçişinin kısıtlı olması ve barsaktan geçişini sınırlandıran p-glikoprotein substratı olmasıdır. Bundan dolayı berberinin tedaviye aktarılabilmesi için ilaç taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi gerekliliği doğmuştur (Yu ve ark. 2017). Bitkisel aktif maddeler için ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilen fitozom formülasyonunun berberin için kullanılması uygun görülmüştür. Fitozom formülasyonlarının karakterizasyonlarının yapılması amacıyla partikül boyutu ölçümü, etken madde salım hızı tayini, erime noktası tayini gibi in vitro testler yapılır. Enkapsülasyon etkinliği de ölçümü yapılarak değerlendirilen bir diğer parametredir. Enkapsülasyon etkinliği formülasyon içinde tutulan etken maddenin %'de olarak ifadesidir. Fito-aktif bileşen ve fosfolipidin yapısal bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla kullanılır. Fitozom yapısında tutulamayan serbest aktif bileşenin uygun bir yöntemle ölçülmesi sonucu da elde edilebilir. Santrifüj ile süpernatant ayrılarak formülasyon içine yüklenmeyen etken maddenin ölçümü yapılır. Bu ölçüm spektrofotometrik (UV-Vis) olarak ya da kromatografik (HPLC gibi) olarak tayin edilebilir (Ghanbarzadeh ve ark.

2016). Bu çalışmada fitozom formülasyonu içindeki berberin miktarını HPLC cihazıyla tayin etmek amacıyla analitik yöntemin geliştirilmesi ve validasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Berberin hidroklorür (BER), Soya Fosfatidilkolin, Asetonitril, Amonyum asetat, Metanol Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar da analitik kalitededir.

2.2. Kromatografik Sistem ve Koşullar

HPLC analizleri Agilent 1260 Infinity II cihazında Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm) kolonda, 1 mL/dk akış hızında, mobil faz olarak 67:33 (h/h) oranında 30 mM amonyum asetat:asetonitril karışımında 30 °C'de yapılmıştır. Örnekler 10 µL olarak sisteme enjekte edilmiştir. Dalga boyu analizler boyunca 346 nm olarak ayarlanmıştır.

2.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Berberinin stok çözeltisi 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanarak standart çözeltilerin konsantrasyonları 1 – 20 µg/mL olacak şekilde distile su ile seyreltilerek ayarlanmıştır.

2.4. Analitik Yöntemin Validasyonu

Optimize edilen analitik yöntem, ICH Q2 (R1) (ICH 2005) kılavuzuna göre doğruluk ve aralığı, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), teşhis sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve özgünlük parametreleriyle doğrulanmıştır ve valide edilmiştir.

2.4.1. Doğrusallık ve Aralığı

Yöntemin belirli bir aralıktaki etken madde konsantrasyonu ile orantılı sonuçları verebilme yeteneğidir (Raposo ve Ibello-Bianco 2020). Doğrusallık verilen bir aralıktaki örnekte bulunan analitin bilinen konsantrasyonda ve enstrümental cevap arasındaki ilişkiyi belirtmek için lineer regresyon analizi kullanılarak belirlenir. Korelasyon katsayısı (r) ve determinasyon katsayısı (r²) doğrusallığı veren parametrelerdir. Doğrunun eğimi, analit konsantrasyonu ile test sonuçları arasındaki matematiksel ilişkiyi ifade eder. Analitik bir yöntemin aralığı ise kullanılan yöntemle göre etken maddenin yer aldığı alt ve üst limitler arasındaki oranın kesinlik, doğruluk ve doğrusallık açısından tayin edildiği aralıktır. Yöntemin doğrusallığı, doğrusal regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Buradan regresyon denklemi ve determinasyon katsayısı (R²) değeri elde edilmiştir. Analitik yöntemin doğrusallığının analizi için, etken maddenin farklı stok çözeltileri hazırlanmıştır ve bu stok çözeltilerden hareketle 1-20 µg/mL konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bilinen konsantrasyonlara (x) karşı elde edilen alanlar (y) grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Doğruluk ve geri elde edilebilirlik değeri elde edilen değerin, gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Aynı zamanda analitik yöntemin hatasızlığının bir ölçüsüdür. Analitik işlemin doğruluğu en az üç farklı konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numunedeki miktarların belirlenen konsantrasyonlardaki % geri elde değerlerinin ortalaması, bu dağılımın standart sapması ve % bağıl standart sapması hesaplanarak tayin edilmektedir. Yöntemin doğruluğunun tayini için bu şekilde belirlenen % bağıl standart sapma değerinin % 2'den küçük olması gerekir. Doğruluğu tayin etmek amacıyla etken maddenin miktar tayininde kullanılmak üzere hazırlanan kalibrasyonlarda düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak belirlenen 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 16 µg/ml konsantrasyonlarda BER çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir çözelti HPLC'de arka arkaya 6 kez analiz edilmiştir. Okunan alan değerleri kalibrasyon doğru denkleminde yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış buradan hareketle % geri elde ve % bağıl standart sapma (% BSS) değerleri bulunmuştur.

2.4.3. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği aynı homojen numunenin belirlenen şartlar altında çok sayıda analizlerinden elde edilen ölçüm sonuçlarının yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlik belirlenen işlem koşullarında yöntemin, tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak üç farklı seviyede incelenmektedir. Analitik yöntemin kesinliği ölçümlerin standart sapma ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri bulunarak test edilmiştir. Kesinliği tayin etmek amacıyla etken maddenin miktar tayininde kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve ara kesinliği değerlendirilmiştir.

2.4.3.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik aynı koşullar altında ve kısa bir zaman aralığında yöntemin kesinliğini göstermektedir. BER'in miktar tayininde kullanılmak üzere yapılan kalibrasyonlarda tekrarlanabilirlik tayini amacıyla düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak belirlenen 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 16 µg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri (n=3) hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir çözelti arka arkaya 6 kez HPLC'de analiz edilmiştir. Elde edilen alan değerleri kalibrasyon doğrusunda yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış, ortalama ve standart sapma değerleri elde edilmiş ve buradan % BSS değerleri bulunmuştur.

2.4.3.2. Ara kesinlik

Ara kesinlik farklı günler, farklı analistler ve farklı cihazlar gibi laboratuvar içi varyasyonların kesinliğini ifade eder. BER stok çözeltisinden hareketle hazırlanan 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 16 µg/ml konsantrasyonda numuneler (n=3) farklı günlerde HPLC'de 6 kez okutulmuştur. Elde edilen alan değerleri kalibrasyon doğrusunda yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış, ortalama ve standart

sapma değerleri elde edilmiş ve buradan % BSS değerleri bulunmuştur.

2.4.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

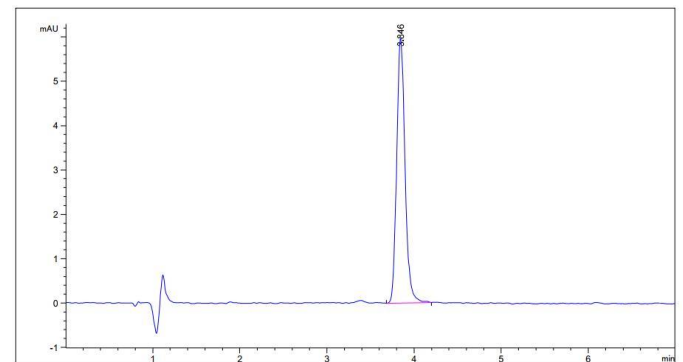
Bir analitik işlemin teşhis sınırı (Limit of Detection-LOD) analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt konsantrasyondur (ICH 2005). Bir kaç yolla bulunabilir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi doğrudan gözlemlenerek de bulunabilir. Tayin sınırı (Limit of Quantification-LOQ) ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğruluk aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan konsantrasyon düzeyidir (ICH 2005). Teşhis sınırı regresyon denklemlerinin kesim noktalarının standart sapmasının doğrunun eğimine bölünerek 3.3 ile çarpılması ile hesaplanmıştır; aynı değer 10 ile çarpılarak da tayin sınırı hesaplanmıştır.

2.4.5. Özgünlük

Özgünlük analiz esnasında numunede olması beklenen bileşikler varlığında da analiti kesin bir şekilde tayin edebilme özelliğidir (Raposo ve Ibelli-Bianco 2020). İn vitro deneylerde BER miktar tayini yapılırken fitozom formülasyonuna katılan yardımcı maddelerin BER'in HPLC analizinde elde edilen piki ile girişim yapıp yapmadığını gözlemek için etken madde, yardımcı madde ve etken madde – yardımcı madde karışımlarının ayrı ayrı çözeltileri hazırlanarak belirlenen koşullarda pikleri elde edilmiştir.

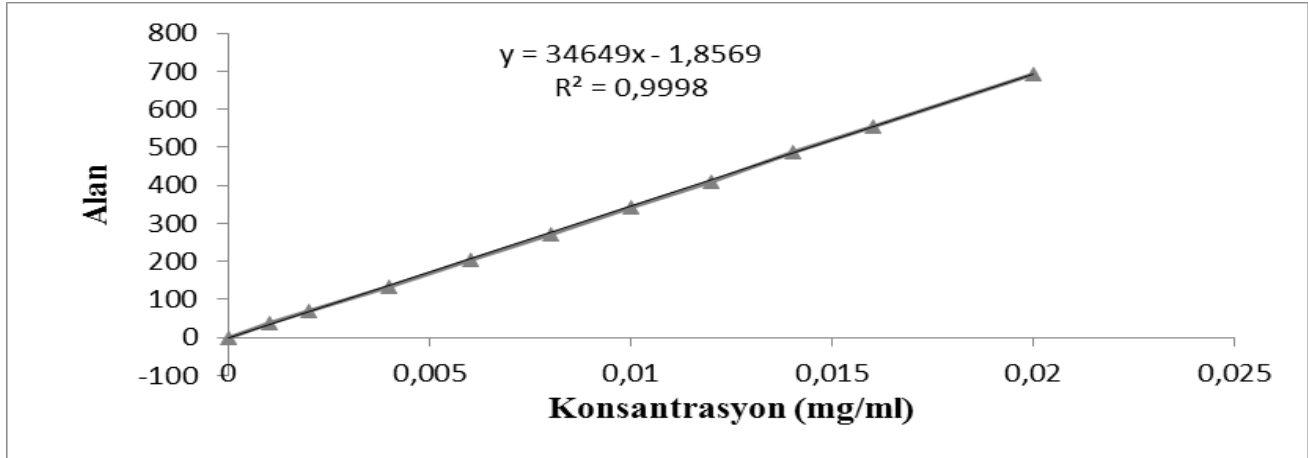
3. Bulgular ve Tartışma

Şekil 1'de gösterildiği gibi BER'in piki 3.846 dakikada elde edilmiştir.



Şekil 1. BER'in pikini gösteren HPLC kromatogramı

Kalibrasyon eğrisinin regresyon denklemi $y=34649x-1,8569$ (Şekil 2) olarak bulunmuştur. Determinasyon katsayısı 0,9998 olarak elde edilmiştir.



Şekil 2. BER'in miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen regresyon doğrusu

Doğruluk ve kesinlik sonuçları sırasıyla standart sapma ve bağıl standart sapma açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen standart sapma ($< \pm 2\%$) ve % bağıl standart sapma ($< 2\%$) değerleri, geliştirilen miktar tayini metodunun uygun olduğunu ve kesinliğini göstermiştir. Berberinin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde

edilen doğruluk ve geri elde edilebilirlik sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Teşhis ve tayin sınırı değerleri sırasıyla 0,3045 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,9227 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Enjeksiyonun tekrarlanabilirliği sonuçları ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Berberinin distile su ortamında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları

1. Konsantrasyon			2. Konsantrasyon			3. Konsantrasyon		
2 $\mu\text{g/ml}$			10 $\mu\text{g/ml}$			16 $\mu\text{g/ml}$		
Alan	C ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri elde	Alan	C ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri elde	Alan	C ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri elde
69,32	2,054	102,7	341,2	9,900	99,00	552,9	16,01	100,1
69,15	2,049	102,5	340,2	9,872	98,72	553,9	16,04	100,3
69,15	2,049	102,5	341,9	9,922	99,22	552,2	15,99	99,9
68,87	2,041	102,1	342,3	9,934	99,34	552,4	15,99	99,9
69,22	2,051	102,5	342,2	9,929	99,29	554,7	16,06	100,4
68,39	2,027	101,4	343,2	9,959	99,59	553,2	16,02	100,1
Ortalama		102,3	Ortalama		99,19	Ortalama		100,1
SS*		0,494	SS*		0,300	SS*		0,176
%BSS**		0,483	%BSS**		0,303	%BSS**		0,175

*SS Standart sapma, **BSS Bağıl standart sapma

Tablo 2. Berberinin distile su ortamında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları

Teorik C ($\mu\text{g/ml}$)	Bulunan C ($\mu\text{g/ml}$) ($X \pm SS^{**}$)	% BSS***
2	2,02 \pm 0,021	1,039
10	9,91 \pm 0,047	0,474
16	16,03 \pm 0,041	0,256

*X= Ortalama, **SS Standart sapma, ***BSS Bağıl standart sapma

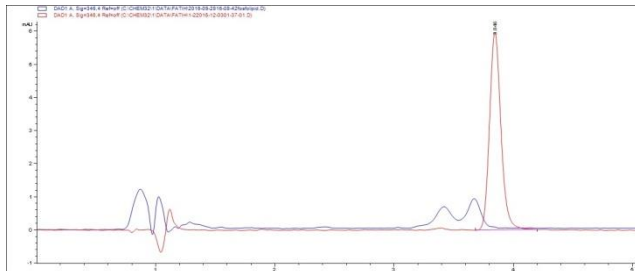
Tablo 3. Berberinin distile su ortamında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen ara kesinlik sonuçları

Konsantrasyon (µg/mL)	1. gün (X* ± SS)	2. gün (X ± SS)	3. gün (X ± SS)	SS**	% BSS***
2	2,045 ± 0,009	2,017 ± 0,021	2,020 ± 0,017	0,015	0,761
10	10,01 ± 0,015	10,00 ± 0,013	10,01 ± 0,014	0,005	0,045
16	16,01 ± 0,008	16,01 ± 0,011	16,00 ± 0,012	0,001	0,002

*X= Ortalama, **SS Standart sapma, ***BSS Bağıl standart sapma

Analitik validasyon parametrelerinden kesinlik için değerlendirilen ara kesinlik sonuçları Tablo 3'de verilmiştir.

Özgünlük parametresini değerlendirmek adına yapılan çalışmalarda fitozom formülasyonunda yardımcı madde olarak kullanılan fosfolipidin, berberinin temiz ve keskin bir pik verdiği 346 nm'de berberine yakın yerde bir piki görülmüştür. Piklerin bir girişim yapıp yapmadığının anlaşılması için kromatogramlar üst üste çakıştırılmış ve ufak bir girişim yaptıkları görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 3. BER ve fosfolipide ait kromatogramların üstüste çakıştırılması ile elde edilen kromatogram

Bu girişimin anlamlı olup olmadığını değerlendirmek adına R (ayırıcılık) değeri hesaplanmıştır. Kromatografide iki pikin nicel anlamda birbirinden ayrıldığını kabul etmek için R=1 olması gerekir. Ve bu ayırıcılık değeri iki bandın birbiri ile %2 oranında örtüştüğü anlamına gelirken, R=1.5 olması durumunda bu örtüşme % 1'e düşer ve iki pik birbirinden tamamen ayrılmış olur (Yılmaz ve ark. 1997). R (ayırıcılık) değeri Denklem 1'de verilen formül ile hesaplanmaktadır:

$$R = 2 \left[\frac{tr, A - tr, B}{Tw, A + Tw, B} \right] \quad (\text{Denklem 1.})$$

tr,A=A maddesinin alıkonma zamanı

tr,B=B maddesinin alıkonma zamanı

Tw,A=A maddesinin oluşan pik aralığının genişliği

Tw,B=B maddesinin oluşan pik aralığının genişliği

A maddesi BER için kromatogramından elde edilen veriler; tr,A 3.846 ve Tw,A 0.1017 ve B maddesi fosfolipid için kromatogramından elde edilen veriler; tr,B 3.672 ve Tw,B 0.1131 dir. Denklem 2'de yer alan formüle göre hesaplanan R değeri değerlendirilmiştir;

$$R = 2 \left[\frac{3.846 - 3.672}{0.1017 + 0.1131} \right] \quad (\text{Denklem 2.})$$

Maddelerin alıkonma zamanları ve pik aralıklarının genişliklerinden yararlanılarak hesaplanan R (ayırıcılık) değeri 1.616 çıkmıştır. Bu değer bize piklerin birbirinden tamamen ayrılmış olduğunu göstermektedir. Fitozom formülasyonunda berberin ve kullanılan fosfolipid arasında herhangi bir girişim bulunmamaktadır.

4. Sonuç

Berberin fitozom formülasyonundan berberinin miktar tayininin yapılması amacıyla HPLC miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve ilgili ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem özgünlük, doğruluk ve aralığı, doğruluk, kesinlik, geri elde edilebilirlik parametreleri yönünden değerlendirilmiş ve berberinin miktar tayini için güvenilir olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda berberinin formülasyon içinden tayin edilmesinde analitik validasyon parametrelerinden özgünlük parametresinin ön plana çıktığı görülmüştür. Saf berberinin miktar tayini yöntemi ve fitozom formülasyonundan berberinin tayini için geliştirilen yöntem karşılaştırıldığında bu yöntem için formülasyondaki diğer maddelerin de işin içine girmesiyle berberinin kesin bir şekilde tayin edilmesi önemli hale gelmiştir. Bu noktada çalışmamızda geliştirdiğimiz yöntemde ayırıcılık değeri de hesaplanmış ve güvenilir olarak maddemizin miktarının tayin edilebildiği görülmüştür.

Teşekkür Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 215S664).

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak;
Tasarım: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak;
Denetleme/Danışmanlık: Ayşegül Karataş; Analiz ve/veya Yorum: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak; Kaynak Taraması: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak; Makalenin Yazımı: Ayça Güngör Ak; Eleştirel İnceleme: Ayşegül Karataş.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Kaynaklar

- Cicero AFG, Baggioni A 2016. Berberine and its role in chronic disease. In: Gupta S, Prasad S, Aggarwal B. (eds) Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases vol 928:27-45. Springer, Cham
- Ghanbarzadeh B, Babazadeh A, Hamishehkar H 2016. Nano-phytosome as a potential food-grade delivery system. *Food Biosci.* 15:126-135.
- International Conference on Harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005. ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf. Accessed 10 May 2020.
- Karataş A, Turhan F 2015. Phyto-phospholipid complexes as drug delivery system for herbal extracts/molecules. *Turk J Pharm Sci* 12(1): 93-102.
- Kidd PM 2009. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev* 14(3): 226-46.
- Kulkarni SK, Dhir A 2010. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res* 24(3): 317-324.
- Liang Y, Xu X, Yin M, Zhang Y, Huang L, Chen R, Ni J 2019. Effects of berberine on blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic literature review and a meta-analysis. *Endocr J.* 66(1):51-63.
- Raposo F, Ibelli-Bianco C. 2020. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends Anal. Chem.* 115913. doi: 10.1016/j.trac.2020.115913.
- Sut S, Faggian M, Baldan V, Poloniato G, Castagliuolo I, Grabnar I, Peron G 2017. Natural deep eutectic solvents (NADES) to enhance berberine absorption: an in vivo pharmacokinetic study. *Molecules.* 22(11): 1921.
- Wang ZC, Wang J, Chen H, Tang J, Bian AW, Liu, T, Yang F 2020. Synthesis and anticancer activity of novel 9, 13-disubstituted berberine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 30(2): 126821.
- Yılmaz A, Genç Ö, Bektaş S 1997 *Enstrümantal Analiz Yöntemleri (ikinci baskı)*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Yu F, Ao M, Zheng X, Li N, Xia J, Li Y, Chen XD 2017. PEG-lipid-PLGA hybrid nanoparticles loaded with berberine-phospholipid complex to facilitate the oral delivery efficiency. *Drug Deliv.* 24(1): 825-833.
- Zhao Z, Wei Q, Hua W, Liu Y, Liu X, Zhu Y 2018. Hepatoprotective effects of berberine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Biomed Pharmacother.* 103: 1319-1326.