

Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerinin İncelenmesinde Kullanılan İn Vitro Salım Testi Yöntemlerine Genel Bir Bakış

An Overview of In Vitro Release Test Methods Used In The Study of Nanoparticulate Drug Delivery Systems

Ece ÇOBANOĞLU^{1,2}
ORCID: 0000-0002-4804-7495
Sevda ŞENEL^{2*}
ORCID: 0000-0002-1467-3471

¹Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı,
33169 - Mersin

²Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık
Fakültesi, Farmasötik Teknoloji
Anabilim Dalı, 06100 - Ankara

Corresponding author:

Sevda ŞENEL
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
E-mail: ssel@hacettepe.edu.tr
Tel.: +90 312 310 12 41

Received date : 28.09.2022

Accepted date : 28.01.2023

DOI: 10.52794/hujpharm.1181365

ÖZET

Bir ilacın dozaj şekline göre salım özelliklerinin incelenmesinde kullanılan in vitro salım testi sayesinde hem ilacın in vitro performansı hakkında bilgi edinilmesi hem de diğer ürünlerle eşdeğerliğinin karşılaştırması mümkün olmaktadır. Doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi için uygun salım testi yönteminin ve uygun salım koşullarının (sıcaklık, salım ortamı, pH, karıştırma /akış hızı vb.) seçilmesi esastır. Farmakopelerde birçok dozaj şekli için in vitro salım testi yöntemleri ve koşulları tanımlanmış olmasına karşın hâlihazırda nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için bir test yöntemi farmakopelerde mevcut değildir. Bu derlemede, nanopartiküler sistemlerden ilaç salımının incelenmesinde kullanılan test yöntemleri (örnek alma ve ayırma, membran difüzyon, sürekli akış vb.) ve güncel uygulamalarından bahsedilecek ve birbirlerine olan üstünlükleri ve sakıncaları tartışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: nanopartiküler sistemler, in vitro salım test yöntemleri, örnek alma ve ayırma yöntemi, membran difüzyon yöntemi, sürekli akış yöntemi

ABSTRACT

The in vitro release tests which examine the release properties of the drug from the dosage form provide the opportunity to investigate the in vitro availability of the drug product as well as to compare its equivalency to other products. In order to obtain accurate and reliable results from in vitro release tests, it is crucial to select the right release test method and suitable release conditions (such as temperature, release medium, pH, agitation/flow rate, etc.). Although there are compendial in vitro release test methods available for various dosage forms, up to date there are no tests described for nanoparticulate systems in any pharmacopeia. In this review, the methods (such as sampling and separation, membrane diffusion, continuous flow, etc.) applied to test the in vitro drug release from nanoparticulate systems will be reviewed. The recent applications of these methods in different particulate systems will be summarized and the advantages and limitations of these test methods will be discussed.

Keywords: nanoparticulate systems, in vitro release test methods, sample and separate method, membrane diffusion method, continuous flow method

1. Giriş

Nano boyuttaki taşıyıcı sistemlerin kimyasal, fiziksel veya biyolojik özellikleri nedeniyle hastalıklardan korunma, hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanımları giderek önem kazanmaktadır [1-8]. Nanopartikül sistemler sayesinde, ilacın spesifik organlara, hücrelere ve hatta hücresele organellere hedeflendirilmesi, istenilen düzeyde ve süre boyunca etkin madde salımı sağlanarak ilacın etkinliği artırılmakta ve aynı zamanda yan etkiler en aza indirilmektedir [9-12]. Bu amaçla kullanılan nanopartikül sistemler arasında, nanosüspansiyonlar, nanoemülsiyonlar, polimerik nanopartiküller, katı lipit nanopartiküller, lipozomlar sayılabilir [13-19]. Nanopartikül sistemlerden ilaç salımı, ilacın güvenliğinin, etkinliğinin ve kalitesinin değerlendirilmesinde kritik bir basamak olup; ilaç formülasyonlarının geliştirilmesinde, geliştirilen formülasyonların in vitro performansının belirlenmesinde, matematiksel modellerin de yardımıyla ilacın in vivo davranışının tahmin edilmesinde karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, bir nanopartikül ilaç sisteminin geliştirilmesinde, sistemden ilaç salımının uygun test yöntemi ve koşullarda incelenmesi önemlidir [2,20,21].

Bir ilacın salım profili, ilacın vücuttaki davranışı hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır, ayrıca ilaç sisteminin güvenilirliği ve etkinliğinin incelenmesinde kullanılmaktadır. İn vitro olarak belirlenen salım profili, ilacın in vivo davranışı hakkında tahmini mümkün kılmaktadır [22-24]. Amidon ve ark. tarafından 1995 yılında etkin maddenin çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BSS) oluşturulmuştur [25]. Bu sistemin amacı; BSS'ye göre in vitro salım çalışmalarından hareketle ilacın in vivo davranışını tahmin etmeye yardımcı olmaktır. Bu sayede in vivo çalışmalar azaltılarak, yapılan in vitro salım çalışmalardan in vitro - in vivo korelasyon sağlanarak, biyoeşdeğerlik çalışmalarından muafiyet durumunun belirlenmesi mümkün olmaktadır [20-24].

İlerleyen bölümlerde, öncelikle in vitro salım testleri hakkında genel bilgi verildikten sonra nanopartikül sistemlerden ilaç salımını incelemek için kullanılan in vitro salım test yöntemlerinden bahsedilecek ve literatür örnekleriyle birlikte üstünlükleri ve kısıtlamaları tartışılacaktır.

2. İn vitro salım testlerine genel bakış

Farmasötik alanda in vitro salım testi, dozaj şeklinin geliştirilmesinde ve kalite kontrolünde önemli bir araç olup, bir ilacın in vivo etkinliği hakkında da bilgi sağlamaktadır. 1971 yılında Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP)'de 6 adet monografya sepet yöntemi (USP aparat 1) resmi salım testi olarak kabul edilmiştir. Bu gelişmeyi, 1978 yılında palet yönteminin (USP aparat 2) kabul edilmesi, 1985 yılında USP 21'de "ilaç salımı" hakkında genel bir bölümün yayımlanması, 1990 yılında USP 22-NF 18'de modifiye salım sağlayan dozaj şekilleri için 23 adet monografin yer alması, 1991'de uzatılmış salım sağlayan ilaçlar için pistonlu silindirin (USP aparat 3) kabul edilmesi ve 1995 yılında uzatılmış salım sağlayan ilaçlar için sürekli akış hücresinin (USP aparat 4) kabul edilmesi takip etmiştir [26-30].

Güvenilir salım profilleri elde etmek için salım test yönteminin çok iyi seçilmesi/tasarlanması gerekmektedir. Bu doğrultuda, bir in vitro salım test yönteminde göz önünde bulundurulması gereken hususlar aşağıda özetlenmiştir [31-33].

- Uygun bir salım ortamının (içerik ve hacim) seçimi, etkin maddenin/maddelerin fizikokimyasal özelliklerine ve ilacın uygulanacak doz sıklığına ve test edilecek dozaj şekline göre olmalıdır.
- Sink koşulları sağlanmalıdır, ancak zorunlu değildir. Sink koşul, salım testinin sonunda, salım ortamındaki etkin madde miktarının, etkin maddenin doyumluk konsantrasyonunun %30'unu geçmediği durumun sağlanmasıdır [34].
- Genel olarak, sulu bir ortam kullanılmalı ve salım, ilk olarak fizyolojik pH aralığında incelenmelidir. Yüzey aktif maddelerin eklenmesinden kaçınılmalıdır. Yüzey aktif madde kullanıldığında, nedeni gerekebilir (örneğin, suda zayıf çözünürlüğe sahip etkin maddeler için yeterli çözünmeyi sağlamak için vb.). Yüzey aktif maddenin konsantrasyonu mümkün olduğunca düşük olmalı ve ilgili çözünürlük, çözünme verileri ve bilimsel kanıtlarla gerekebilir.
- İn vitro salım testi aparatının seçim nedeni gerekebilir. Palet aparatı kullanılan yöntemlerde, 50 rpm karıştırma hızı ile başlanması gerekirken, sepet aparatı kullanılan yöntemlerde 100 rpm karıştırma hızıyla başlanması gereklidir. Uygun bir gerekçe ile daha yüksek karıştırma hızları uygulanabilir veya farklı boyutta açıklıklara sahip sepet kullanılabilir.

- İn vitro salım testi prosedürünün geliştirilmesi sırasında, yöntem parametrelerinin sonuçların değişkenliğine katkısı araştırılmalı ve minimuma indirilmelidir.

Genel olarak farmakopelerde verilen test yöntemlerine bakıldığında, arada ufak farklılıklar bulunmaktadır. Avrupa Farmakopesi'nde konvansiyonel (hemen) ve modifiye salım sağlayan katı dozaj şekillerinden ilaç salımının test edilmesinde sepet (aparat 1), palet (aparat 2), pistonlu silindir (aparat 3), sürekli akış hücresi (aparat 4) yöntemleri önerilmektedir. Transdermal yamalar için disk üzerinde palet, hücre, dönen silindir aparatlarının kullanımı önerilmektedir. Avrupa Farmakopesi'nde ayrıca ilaçlı sakızlar için çiğnemeyi taklit eden sakız makinası (chewing gum machine) önerilmektedir [32].

Amerikan Farmakopesi'nde hemen salım sağlayan, uzatılmış salım sağlayan ve geciktirilmiş salım sağlayan dozaj şekillerinden ilaç salımının testi için, sepet (aparat 1), palet (aparat 2), pistonlu silindir (aparat 3), sürekli akış hücresi (aparat 4) kullanımı önerilmektedir. Transdermal yamalardan ilaç salımının test edilmesi için ise disk üzerinde palet (aparat 5), dönen silindir (aparat 6), aşağı-yukarı hareket eden örnek tutucu (aparat 7) yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir [33].

Türk Farmakopesi'nde ise ilaç salım çalışmaları; katı dozaj şekilleri, transdermal yamalar ve lipofilik katı dozaj şekillerinin in vitro salım çalışmaları olmak üzere 3 farklı başlık altında verilmektedir [35]. Konvansiyonel ve modifiye salım sağlayan dozaj şekilleri ve transdermal yamalar için önerilen aparatlar Avrupa Farmakopesi ile uyumludur, ek bir başlık altında bulunan lipofilik katı dozaj şekillerinin in vitro salım testi içinse sürekli akış hücresi önerilmektedir.

Salım yöntemleri ve koşullarının seçimi, ilaç ve dozaj şeklinin özelliklerine göre yapılmaktadır. Ayrıca, bazı farmakopelerde (örn. USP) bazı dozaj şekillerine ait monograflar da bulunmaktadır. Aksi gerekmediği takdirde farmakopeye uyulması gerekmektedir. Öte yandan, nanopartiküler sistemler için halihazırda farmakopelerde kayıtlı herhangi bir in vitro salım testi bulunmamaktadır. Nanopartiküler sistemlerin davranışının incelenmesinde kullanılacak bir in vitro salım testinin seçiminde uygun aparatın ve salım koşullarının (salım ortamı, karıştırma tipi vb.) belirlenmesi çok önemlidir. Bu seçimin, uygulama yerine ve formülasyonun etki yerine göre yapılması uygun olacaktır, ancak kompleks yapılar olan nanoparti-

küler ilaç taşıyıcı sistemler için in vivo koşulları bu doğrultuda taklit etmek kolay değildir [36,37].

3. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için kullanılan in vitro salım test yöntemleri

İN vitro salım testleri, sadece ilaç kalitesini ve performansını sağlamak için değil, aynı zamanda nanopartiküler ilaç sistemlerinin ürün geliştirme süreçlerinde de yardımcı olmak için önemli bir araçtır. Nanopartiküler sistemler için düzenleyici otoriteler tarafından önerilen resmi in vitro salım yöntemleri mevcut olmaması sebebiyle, mevcut farmakope yöntemlerinin modifikasyonu ile yeni yöntem geliştirilmesi ilk seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır [2,21]. Birçok çalışmada, USP aparat 2 (palet), USP aparat 4 (akış hücresi) ve modifiye edilmiş akış hücresi, nanopartiküler sistemlerden in vitro salımı test etmek için kullanılmıştır [38-41]. Nanopartiküler ilaç sistemlerinin in vitro salım çalışmasında kullanılan akış hücresi yönteminde, akış hücresinin çapı, reseptör kompartmanın hacmi gibi özellikler değiştirilmiş, salım ortamının akış hızı oldukça düşük olarak ayarlanmıştır. Nanopartiküler sistemlerde en sık karşılaşılan sorun agregasyondur (topaklanma). İn vitro salım çalışmaları sırasında, nanopartiküler sistemlerde oluşabilecek agregasyonu önlemek için karıştırma hızının, örnek alma yönteminin (santrifüj, ultrasantrifüj, filtrasyon vb.), uygulanacak in vitro salım testi yönteminin seçimi vb. parametreler önem arz etmektedir [42-45]. Bu kapsamda, sürekli akış hücresi yönteminde cam boncukların akış hücresine eklenmesi, in vitro salım testi sırasında agregasyonu en aza indirmek için tercih edilen yollardan bir tanesidir [37].

Nanopartiküler sistemlerde in vitro salım testleri, genellikle uzun zaman boyunca (örn., birkaç hafta) sürdürüldüğü için, salım ortamının buharlaşmasını engellemek amacıyla önlemler alınmalıdır. Ayrıca bu süreçte mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için uygun koruyucular ilave edilebilir. Bu amaçla kullanılmak üzere birçok antimikrobiyal madde (metil paraben, etil paraben, sorbik asit, sodyum benzoat vb.) mevcuttur ancak seçim yapılırken etkin maddenin yanı sıra diğer formülasyon bileşenleri ile geçimliliği ve test ortamının pH'sı da göz önünde bulundurulmalıdır. Antimikrobiyallerle ilgili olarak, iyon-

zasyon özellikleri ve fizikokimyasal etkileşimler ve analitik girişimler de incelenmelidir [37].

Salım ortamının içeriği belirlenirken, sistemin uygulanacağı bölgedeki sıvıların ozmolaritesi, pH'sı ve tampon kapasitesi dikkate alınmalıdır [46,47]. Salım profilini uygun şekilde karakterize etmek için uygun test süresi ve örnek alma aralıklarının doğru olarak belirlenmesi gerekmektedir. Yüksek sıcaklık ve ilaç salımını artıracak pH gibi hızlandırılmış koşullarda yapılan salım testleriyle de başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir [48,49].

Nanopartiküler sistemlerden ilaç salımının test edilmesinde genel olarak i) örnek alma ve ayırma, ii) sürekli akış ve iii) membran difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır [2]. Birçok çalışmada ise bu üç yöntemin farklı kombinasyonları kullanılmıştır [50-53]. Aşağıdaki bölümlerde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden ilaç salımının test edilmesinde sıklıkla kullanılan bu yöntemler detaylı olarak açıklanmıştır.

3.1. Örnek alma ve ayırma yöntemi

Bu yöntem, esas olarak basit ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle özellikle polimerik partiküler sistemlerin vitro salım testi için kullanılan en yaygın yöntemdir [54]. Bu yöntemde, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem, sabit bir sıcaklıkta tutulan salım ortamına ilave edilir. Salım ortamından (süzüntü veya süpernatant) belirli zaman aralıklarında alınan örneklerle salınan ilaç miktarı belirlenir ya da nanopartiküler sistemlerde belirli zaman aralıklarında salınmamış etkin madde miktarı belirlenir, daha sonra toplam ilaç miktarından çıkarılarak salınan ilaç miktarı hesaplanır. Bu yöntemde kullanılan düzenekler, salım ortamının karıştırılmasını sağlayan kısımlar (manyetik karıştırıcı, palet, çalkalayıcı, basket vb.) salım ortamının içeriği, nanopartiküler sistemlerin yerleştirildiği kaplar, salım ortamından alınan örnek hacimleri ve örnek alma teknikleri yönüyle farklılıklar göstermektedir [20]. Bu yöntemin kullanıldığı çalışmalara ait örnekler Tablo 1'de özetlenmiştir. Salım çalışmasının yapılacağı kap tipi, salım çalışması için gerekli ortam hacmine göre seçilmektedir. Genel olarak, 10 mL'den küçük hacimler için flakon, daha büyük hacimler (100-400 mL) için şişe veya flask tercih edilmektedir [55,56]. Nanopartiküler sistemlerin agregasyonunu azaltmak ve ıslanmayı artırmak için salım ortamının karıştırılması kritik bir öneme sahiptir. Bu amaçla, büyük hacimler için ge-

nel olarak USP aparat 1 veya USP aparat 2 kullanılmaktadır. Küçük hacimler (<10 mL) için kullanılan flakonlarda ise salım ortamının karıştırılması için manyetik karıştırıcılar veya orbital çalkalayıcılar gibi alternatif teknikler kullanılmaktadır [57,58].

Örnek alma ve ayırma yönteminde, örnek alma aşamasından sonra ayırma yönteminin seçimi de bu yöntemin önemli bir parametresidir. Bazı çalışmalarda, örnek alımından sonra salım ortamı ve nanopartiküler sistemler arasında fiziksel ayrımı sağlamak için ayırma yöntemi olarak polimerik malzemeleri süzebilen uygun gözenek boyutuna sahip membran filtreler kullanılarak filtrasyon gerçekleştirilmiştir [41, 59, 60]. Ayrıca, nanopartiküler sistemlerin küçük boyutları nedeniyle santrifüjleme, ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon ve basınçlı ultrafiltrasyon gibi yüksek enerjili ayırma tekniklerinin sıklıkla uygulandığı da görülmektedir [59,61]. Belirli zaman noktalarında salım ortamından alınan örneklerde nanopartiküler sistem ile salım ortamını ayırmak için kullanılan santrifüjleme işlemi, yüksek enerjili ayırma teknikleri arasında en popüler yöntemdir. Santrifüjlemeden sonra süpernatantta salınan ilaç miktarı belirlenir ya da çöken nanopartiküler sistemde salınmadan kalan ilaç miktarı belirlenir. Yapılan bir çalışmada, küçük molekül ağırlığa sahip bir ilaç olan selekoksib içeren bir nanopartiküler sistemden ilaç salımı çalışmasında salım ortamından alınan örnekler 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirilerek fiziksel ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir [59]. Öte yandan, insülin, DNA gibi büyük moleküller için ultrasantrifüj, santrifüj gibi yüksek enerjili ayırma teknikleri kullanılmıştır [62,63]. Bir diğer yüksek enerjili ayırma yöntemi olan basınçlı ultrafiltrasyon ile nanopartiküler sistemler 5 dakika gibi kısa bir sürede salım ortamından tamamen ayrılabilmiştir [24,64]. Genel olarak, örnek alma ve ayırma yöntemi ile nanopartiküller sistemlerden ilaç salımının direkt olarak tayin edilmesi mümkündür, ancak agregasyon nedeniyle sorunlar çıkmaktadır. Ayrıca, filtrasyon ile örnek ayırma tekniğinde, filtrelerin tıkanması, ilacın filtreye adsorpsiyonu vb. durumlarla karşılaşılabilen ve filtrasyon işleminden önce filtrenin doyurulması işlemi gerekebilmektedir [24,65]. Aynı zamanda filtrasyon işleminden önce gerçekleştirilmesi gereken filtrelerin doyurulması işlemi, ek zaman ve iş gücü gerektirilmektedir. Örnek alma sırasında yüksek enerjili ayırma tekniklerinde de bazı güçlükler bulunmaktadır. Yüksek enerjili ayırma işlemi sırasında ilaç salımının devam etmesi, sıkça karşılaşılan so-

Tablo 1. Nanopartiküler sistemlerden in vitro ilaç salımı testi için “örnek alma ve ayırma yöntemi” nin kullanımına ait örnekler ve test parametreleri

Etkin madde	Nanopartiküler sistem	Uygulama yolu	Salım ortamı ve hacmi	Karıştırıcı tipi	Karıştırma hızı	Ayırma tekniği	Referans
Timokinon	Lipid-polimer hibrit nanopartikül	Oral	1 mL fosfat tamponu (pH 6,8)	Çalkalayıcı	100 rpm	Santrifüj (15.000 rpm)	[67]
Likokalkon A	Lipozom	Oral	1 mL pH 1,2 hidroklorik asit çözeltisi, 1 mL iki kere distillenmiş su (pH 7,0) ve 1 mL fosfat tamponları (pH 6,8 ve 7,4)	Çalkalayıcı	100 rpm	Santrifüj (10.000 rpm)	[68]
İnsülin	Lipozom	Oral	2,5 mL SGF (simule mide sıvısı) ve 2,5 mL SIF (simule barsak sıvısı)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	Ultrasantrifüj filtresi (Amicon®)	[62]
Kolistin	Lipozom	Belirtilmemiş	Fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	Basıncılı ultrafiltrasyon	[24]
Selekoksisib	Mezopor karbon matris	Oral	900 mL %1 sodyum lauril sülfat (SLS) içeren fosfat tamponu (pH 6,8), 900 mL %1 SLS içeren hidroklorik asit çözeltisi (pH 1,2)	USP Aparat 2 (palet)	50 rpm	0,45 µm membran filtre	[58]
Doksorubisin+ Kurkumin	Nanojel	Belirtilmemiş	2 mL pH 7,4 tamponu (% 83 fosfat tamponu, %1 tween 80 ve %16 metanol) ve 2 mL pH 5,8 tamponu (% 83 fosfat tamponu, %1 tween 80 ve %16 metanol)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	Santrifüj (12.000 rpm)	[69]
Oleanolik asit	Nanosüspansiyon	Oral	900 mL % 0,5 (a/h) sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren su	USP Aparat 2 (palet)	100 rpm	Belirtilmemiş	[70]
İnsülin	Silika nanopartikül	Oral	5 mL fosfat tamponu (pH 7,4) ve 5 mL HCl çözeltisi (pH 1,0)	Manyetik karıştırıcı	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	[71]
Diklofenak sodyum	Polimerik nanopartikül	Oküler veya eklem içi uygulama	300 mL fosfat tamponu (pH 6,8)	Orbital çalkalayıcı	50 rpm	Filtrasyon	[41]
Paklitaksel	Polimerik nanopartikül	İntravenöz	10 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	Belirtilmemiş	Ultrasantrifüj (22.000 g)	[51]
Deksametazon fosfat	Polimerik nanopartikül	İntravitreal	2 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	50 rpm	Santrifüj	[72]
Paklitaksel	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	10 mL % 0,1 (a/h) Tween 80 içeren fosfat tamponu (pH 7,4)	Orbital çalkalayıcı	120 rpm	Santrifüj	[73]
Sildenafil	Polimerik nanopartikül	Pulmoner	% 0,1 SDS içeren fosfat tamponu (pH 7,4)	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Santrifüj	[74]

Etkin madde	Nanopartiküler sistem	Uygulama yolu	Salım ortamı ve hacmi	Karıştırıcı tipi	Karıştırma hızı	Ayırma tekniği	Referans
Betametazon fosfat	Polimerik nanopartikül	İntravenöz	Fötal sığır serumu ve fosfat tampon karışımı (1:1, h/h)	İnkübasyon	Belirtilmemiş	Santrifüj	[75]
Paklitaksel	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	5 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Orbital çalkalayıcı	Belirtilmemiş	Santrifüj	[76]
Rapamisin	Polimerik nanopartikül	Oral	20 mL fosfat tamponu (pH 7,4) 20 mL fosfat tamponu (pH 5,0)	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Santrifüj	[77]
Dosetaksel	Polimerik nanopartikül	İntravenöz	5 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	Belirtilmemiş	Santrifüj	[78]
Selekoksisib	Polimerik nanopartikül	Oral	Suni duodenal çözeltisi (pH 10,0)	Manyetik karıştırıcı	60 rpm	Santrifüj	[79]
Paklitaksel	Polimerik nanopartikül	Oral	10 mL fosfat tamponu (pH 5,8 ve 7,4)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	Santrifüj	[45]
İnsulin	Polimerik nanopartikül	Oral	25 mL pH 1,2 tamponu ve fosfat tamponu (pH 6,5 ve 7,2)	Erweka aparatı	75 rpm	Santrifüj	[80]
Sparflokasin	Polimerik nanopartikül	Oküler	Suni gözyaşı sıvısı (pH 7,4)	Mekanik çalkalayıcı	100 rpm	Santrifüj	[81]
Bovin serum albümin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	1 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	100 rpm	Santrifüj	[82]
Haloperidol	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	100-200 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çözünme hücresi	Belirtilmemiş	Santrifüj	[83]
Sefradin	Proniozom	Oral	500 mL pH 1,2 tamponu (2 saat) sonra 500 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	USP Aparat 1 (basket)	50 rpm	Filtrasyon	[60]

runlardan bir tanesidir. Kolistin yüklü lipozomların geliştirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada, ilacı nanopartiküler sistemden ayırmak için farklı ayırma teknikleri (ultrasantrifüj, santrifüjülü ultrafiltrasyon, basınçlı ultrafiltrasyon) uygulanmış ve ayırma etkinliği incelenmiştir [24]. 25 °C’ de, 100 nm’den küçük kolistin yüklü lipozomların, 300.000 x g’de 8 saat boyunca ultrasantrifüjlenmesiyle tam ayırmanın sağlanamadığı, en etkin ayırma yönteminin ise basınçlı ultrafiltrasyon yöntemi olduğu bildirilmiştir. Uzun süreli ve yüksek hızda yapılan yüksek enerjili ayırma işlemleri, emülsiyon ve lipozom gibi nanopartiküller sistemlerin stabilitesini etkilemekte ve ilaç salımının değişmesine neden olabilmektedir [2,24,66]. Bu yöntemde, nanopartiküler sistemlerin

salım ortamından ayrılmasının doğru ve tam şekilde gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir ve net çizgilerle belirlenmiş bir yöntemin var olmaması sebebiyle ayırma tekniğinin optimizasyonu gereklidir.

3.2. Membran difüzyon yöntemi

Membran difüzyon yönteminde, ilaç yüklü nanopartiküler sistemler belirli moleküler ağırlıkta kesme değerine (MWCO) sahip bir diyaliz membranı ile salım ortamından fiziksel olarak ayrılır, ilaç yüklü nanopartikül, sistemin donör bölümüne eklenir. Nanopartiküler sistemden salınan ilaç, membrandan difüze olarak donör bölmeden reseptör bölmeye geçerek ve salınan ilaç miktarı belirli zaman aralıkların-

da reseptör taraftan alınan örneklerde tayin edilir [2, 54]. Membran difüzyon yöntemi, bazı çalışmalarda diyaliz yöntemi olarak da ifade edilmektedir [2,20]. drug release is currently assessed using a variety of methods including sample and separate (SS Bu yöntemde kullanılan diyaliz membranı, salınan ilacı geçirir, ancak nanopartiküler sistemin kendisini geçirmez. Bu sayede örnek alma ve ayırma tekniğinden farklı olarak, membran difüzyon yönteminde, örnek alma işlemi sonrası nanopartiküler sistemlerin salım ortamından uzaklaştırılması işlemine gerek kalmamaktadır [54].

Membran difüzyon yöntemi, lipozomların [84], polimerik nanopartiküllerin [18] ve lipit nanotaşıyıcıların [85] in vitro ilaç salım profillerini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tablo 2’de nanopartiküler sistemlerden ilaç salımı için membran difüzyon yönteminin kullanıldığı çalışmalara örnekler sunulmuştur.

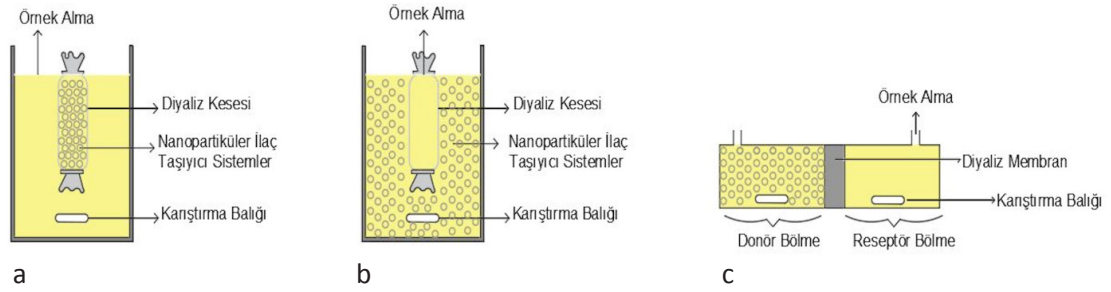
Membran difüzyon yönteminde ilaç salımını etkileyen temel parametreler arasında karıştırma koşulu, donör ve reseptör hücre hacimleri arasındaki oran ve diyaliz membranının MWCO değeri bulunmaktadır [86,87]. Kullanılan diyaliz membranının gözenek boyutu, ilacın membranlardan serbest difüzyonu sağlayacak büyüklükte, nanopartiküler sistemin geçemeyeceği küçüklükte olmalıdır [88]. Membran difüzyon yöntemiyle yapılacak in vitro salım çalışmalarında çok yüksek değerde MWCO’ya sahip membranların kullanımı ile hem ilacın hem de nanopartiküler sistemin membranlardan geçişine izin vermektedir. Bu doğrultuda membran MWCO değerinin seçimi oldukça önemlidir. Tenofovir (Mol. Ağ.: 287,2 Da) içeren lipozom formülasyonları ile yapılan bir çalışmada farklı MWCO değerlerinde (20 kDa, 25 kDa, 50 kDa) membranlarla in vitro salım çalışması gerçekleştirilmiştir [89]. 20 kDa membran ile salımının membran tarafından baskılandığı, 25 kDa membran ile daha uygun bir salım elde edildiği ve 50 kDa membranla ise 25 kDa membrana göre salımda anlamlı bir artış görülmediği bildirilmiştir ve bu nedenle membran MWCO’sunun ilaç molekül ağırlığının yaklaşık 100 katı olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Membran difüzyon yönteminde, diyaliz membran boyunca ilacın taşınmasında bir itici güç sağlanması için diyaliz membranının iç hacminin, dış ortamın hacminden en az 6-10 kat daha az olması önerilmektedir [90]. İn vitro salım testine başlamadan önce, ilacın polimere veya diyaliz membranına bağlanma potansiyeli kontrol edilmeli, gerekirse

farklı bir membran kullanılmalıdır. Bu yöntemde, ilacın membrandan difüzyonunu sağlayacak ancak nanopartiküler sistemin geçişine izin vermeyecek şekilde uygun bir gözenek boyutuna sahip bir membran kullanılmalıdır [2,54].

Membran difüzyon yöntemi, diyaliz kesesi ters diyaliz kesesi ve yan yana diyaliz şeklinde uygulanmaktadır [90-93]. Diyaliz kesesi yönteminde, nanopartiküler sistemler, salım ortamı içeren bir diyaliz kesesinin içine (donör) koyulur ve salım ortamı içeren daha büyük hacimli kaba (reseptör) yerleştirilir (Şekil 1a). Bu teknikte, diyaliz kesesinin içinde bulunan nanopartiküler sistemden salınan ilaç, diyaliz membranından difüze olarak reseptör bölmeğe geçer. Bu yöntemde, karıştırma işlemi sadece dış ortamda gerçekleştirilmektedir. Diyaliz keseleri USP aparat 1 ve USP aparat 2 ile kombine edilerek kullanılabilir [40,87,94]. Genel olarak, itici gücün oluşması için, diyaliz kesesinin iç hacmi, dış ortam hacminden önemli ölçüde daha küçük olmalıdır. Dolayısıyla, diyaliz kesesinin içine konulduğu kabın boyutu in vitro salım çalışması için gereken toplam salım ortamı hacmi dikkate alınarak seçilmelidir [2]. Nanopartiküler sistemlerden ilaç salımının testi için sıklıkla kullanılan diyaliz kesesi yöntemine ait literatür örnekleri, uygulama parametreleri ile birlikte Tablo 2’de özetlenmiştir.

Ters diyaliz kesesi yönteminde de diyaliz kesesi yönteminde kullanılan düzeneğin aynısı kullanılır ancak bu yöntemde farklı olarak; nanopartiküler sistemler, diyaliz kesesinin dışına (donör) yerleştirilir ve örnek alma diyaliz kesesinin içinden (reseptör) yapılır (Şekil 1b). Bu yöntemin temel üstünlüğü, diyaliz kesesinin dışında olan nanopartiküler sistemlerin agregasyonunun, donör bölmede gerçekleşen karıştırma işlemi sayesinde engellenmiş olmasıdır [54]. Ancak bu yöntemde sakıncası bulunmaktadır. Dış ortam hacmi, iç ortam hacmine göre daha büyük olduğu için; bu durum, analizin ayırt edici yeteneğini azaltmaktadır [2].

Yan yana diyaliz yönteminde ise, bir diyaliz membranı ile ayrılmış eşit hacimde ortam içeren donör ve reseptör hücrelerinden oluşur. Her iki tarafta da karıştırma yapılır (Şekil 1c). Belirli zaman noktalarında analiz edilmek üzere örnekler alınır, alınan örnek hacmi kadar salım ortamı ilave edilerek sink koşul sağlanır. Bazı çalışmalarda yan yana diyaliz yönteminin modifikasyonu olan cam sepet diyaliz yöntemi de kullanılmıştır. Bu yöntemde, USP aparat 1’in se-



Şekil 1. a. Diyaliz kesesi yönteminin şematik gösterimi b. Ters diyaliz kesesi yönteminin şematik gösterimi c. Yan yana diyaliz kesesi yönteminin şematik gösterimi [20,91,93]'den esinlenerek çizilmiştir.

Tablo 2. Nanopartiküler sistemlerden ilaç salım testi için “membran difüzyon yöntemi” nin kullanımına ait örnekler ve uygulanan parametreleri

Etkin madde	İlaç taşıyıcı sistem	Hedeflenen uygulama yolu	Salım ortamı	Karıştırıcı tipi	Membran MWCO	Karıştırma hızı	İç hacim/Dış hacim	Referans
Epirubisin	Altın nanopartikül	Belirtilmemiş	30 mL fosfat tamponu (pH 5,0 ve 7,4)	Belirtilmemiş	3,5 kDa	Belirtilmemiş	2 mL/30 mL	[3]
İzoniazid, Rifampisin	Sığır serum albümin nanopartikül	Belirtilmemiş	150 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	100 rpm	10 mL/150 ml	[96]
Resrevatrol	Gümüş nanopartikül	Belirtilmemiş	pH 5,2 ve pH 7,4 tamponu	Belirtilmemiş	10 kDa	100 rpm	1 mL / belirtilmemiş	[97]
Selekoksisib	Katı lipit nanopartikül	Oral	40 mL fosfat tamponu (pH 6,8)	Çalkalayıcı	12-14 kDa	80 rpm	1 mL/40 mL	[86]
5-fluorourasil	Katı lipit nanopartikül	Oral	50 mL pH 2,0 koşullarında ve 50 mL farklı pH'larda fosfat tamponu (pH 4,5; 6,8 ve 7,4)	Çalkalayıcı	12 kDa	90-100 rpm	Belirtilmemiş/50 mL	[98]
Kuinakrin	Lignosülfat nanopartikül	Belirtilmemiş	10 mL fosfat tamponu (pH 7,4) ve 10 mL fosfat tamponu (pH 5,5)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	50 rpm	2 mL/10 mL	[99]
Paklitaksel	Lipid-polimer nanopartikül	Oral	20 mL % 5 (a/h) Tween 80 ve % 20 metanol içeren fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	12 kDa	200 rpm	2 mL/20 mL	[100]
Eozin B	Lipozom	Belirtilmemiş	Fosfat tamponu (pH 7,2)	Belirtilmemiş	12 kDa	Belirtilmemiş	2 mL / belirtilmemiş	[101]
E vitamini ve melfalan	Lipozom	İntravenöz	50 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	12 kDa	150 rpm	2 mL/50 mL	[102]
Metazolamid	Lipozom	Oküler	50 mL simüle göz yaşı sıvısı	Belirtilmemiş	12-14 kDa	50 rpm	2 mL/50 mL	[103]
Diazepam	Nanoemülsiyon	Parenteral	200 mL fosfat tamponu (pH 7,4) : metanol 80:20 (% h/h))	Belirtilmemiş	12 kDa	Belirtilmemiş	2 mL/200 ml	[104]
Metotreksat	Nanoemülsiyon	Subkütan	Fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	Belirtilmemiş	50 rpm	Belirtilmemiş	[105]
Posakonazol	Nanoemülsiyon	Oral	25 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	1 mL/25 mL	[106]
Sefalekssin	Nanoemülsiyon	Oral	900 mL 0,1 N HCl (pH 1,2)	USP Aparat 2 (Palet)	12 kDa	100 rpm	Belirtilmemiş /900 mL	[87]

Disülfram	Nanosüspansiyon	Belirtilmemiş	250 mL fosfat tamponları (pH 6,8 ve 7,4)	Çalkalayıcı	3,5 kDa	100 rpm	3mL/250 mL	[107]
Kandesartan sileksetil	Niozom	Oral	50 mL% 0,1 (a/h) Tween 80 içeren simüle bağırsak sıvısı (SIF) (pH 6,8)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	60 rpm	Belirtilmemiş /50 mL	[108]
5-Fluorourasil	Polimerik nanopartikül	Oral	100 mL pH 1,2; 4,5; 7,0; 7,5 tamponu	USP Aparat 2 (Palet)	3,5 kDa	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş / 100 mL	[40]
Doksorubisin	Polimerik nanopartikül	İntravenöz	20 mL fosfat tamponları (pH 5,0 ve pH 7,4)	Çalkalayıcı	3,5 kDa	120 rpm	Belirtilmemiş / 20 mL	[109]
Dosetaksel	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	40 mL% 0,5 (h/h) tween 80 içeren fosfat tamponu (pH 5,5) ve 40 mL % 0,5 (h/h) tween 80 içeren fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	12-14 kDa	100 rpm	2 mL/40 mL	[110]
Kurkumin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	Askorbik asit (antioksidan) ve sodyum dodesil sülfat (yüzey aktif madde) içeren 30 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Orbital çalkalayıcı	100 kDa	Belirtilmemiş	3 mL/30 mL	[111]
Diazepam	Polimerik nanopartikül	Oral	100 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	Belirtilmemiş	100 rpm	5mL/100 mL	[112]
Tarenflurbil	Polimerik nanopartikül	İntranazal	10 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı su banyosu	12 kDa	100 rpm	1mL/ 10 mL	[113]
Deksketoprofen trometamol	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	100 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Belirtilmemiş	12-14 kDa	100 rpm	1mL/100 mL	[114]
Diklofenak	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	150 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	12-14 kDa	100 rpm	5mL/150 mL	[18]
İmatinib	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	45 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	90 rpm	5 mL/45 mL	[115]
Doksorubisin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	30 mL fosfat tamponu (pH 5,5) ve 30 mL fosfat tamponu (pH 7,2)	Belirtilmemiş	10 kDa	100 rpm	0,5 mL/30 mL	[116]
Rosuvastatin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	40 mL fosfat tamponu	Manyetik karıştırıcı	12 kDa	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş /40 mL	[117]
Deksametazon	Polimerik nanopartikül	Oküler	2,5 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Belirtilmemiş	14 kDa	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş /2,5 mL	[118]
Metotreksat	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	Fosfat tamponu (pH 4,0; 7,2 ve 9,0)	Çalkalayıcı	12-14 kDa	50 rpm	Belirtilmemiş	[119]
Paklitaksel	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	Fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	[120]
İbuprofen	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	100 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Modifiye USP basket aparatı	12-14 kDa ve 50 kDa	50 rpm	2 mL/100 mL	[52]
Nimodipin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	200 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	10 kDa	Belirtilmemiş	5 mL/200 mL	[121]
Sisplatin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	30 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	12 kDa	Belirtilmemiş	1 mL/30 mL	[122]

Nimodipin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	200 mL fosfat tamponu (pH 6,8)	Manyetik karıştırıcı	12 kDa	Belirtilmemiş	5 mL/200 mL	[123]
Lidokain	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	25 mL fosfat tamponu	Belirtilmemiş	50 kDa	Belirtilmemiş	5 mL/25 mL	[124]
Breviskapin	Polimerik nanopartikül	İntravenöz	20 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	8 kDa	150 rpm	5 mL/20 mL	[125]
Triptolid	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	Fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	8 kDa	Belirtilmemiş	5 mL/-	[126]
Estradiol	Polimerik nanopartikül	Oral	15 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkayıcı	12 kDa	100 rpm	1 mL/15 mL	[127]
Norfloksasin	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	50 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Manyetik karıştırıcı	12 kDa	100 rpm	2 mL/ 50 mL	[128]
Propafenon	Polimerik nanopartikül	Belirtilmemiş	10 mL fosfat tamponu (pH 7,4)	Horizontal çalkalayıcı	6-8 kDa	200 rpm	2,5 mL/10 mL	[129]
Terkonazol	Silika nanopartikül	Oküler	20 mL izotonik fosfat tamponu (pH 7,4)	Çalkalayıcı	Belirtilmemiş	160 rpm	1 mL/20 mL	[130]

peti, cam ile çevrili olup tabanı bir diyaliz membran ile kapatılmıştır. Çoğunlukla, lipit bazlı nanosistemlerin (ör. lipit nanokapsüller ve lipozomlar) in vitro salım testi için tercih edilen bu yöntemde ise sink koşullar sağlanamamaktadır [52,95].

3.3. Sürekli akış yöntemi

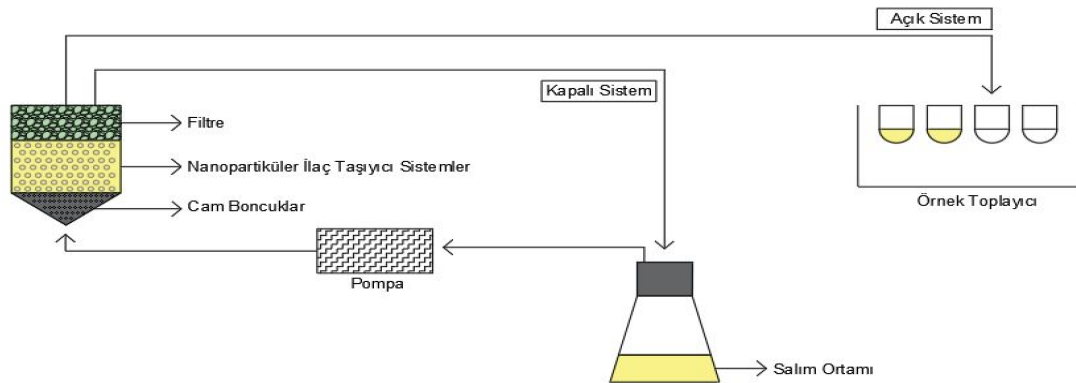
Sürekli akış yönteminde (USP aparat 4), ilaç yüklü nanopartiküler sistemin yer aldığı küçük hacimli bir hücre, salım ortamı rezervuarı, bir pompa ve salım ortamının bu pompa ile hücre içinden aktığı bir akış hücresi ile donatılmış bir sistem kullanılmaktadır. USP aparatı 4, normalde USP'de modifiye salım sağlayan oral dozaj şekillerinin in vitro salım testi için geliştirilmiş olup akış hızı, hücre tiplerinin çeşitliliği ve salım ortamı hacminin esnek olması nedeniyle değişik dozaj şekilleri için de bu yöntem uygulanmaktadır [131,132]. Bu yöntemde, ilaç salımı, nanopartiküler sistemleri içeren hücreden geçerek sistemde sürekli sirküle edilen ortamda gerçekleşir ve elüent periyodik aralıklarla toplanarak analiz edilir [93].

Örnek alma ve ayırma ve membran difüzyon yöntemlerine göre sürekli akış yönteminin nanopartiküler sistemler için kullanımı daha kısıtlıdır. Sürekli akış yönteminde, düzenekte sirküle olan salım ortamının akış hızı, pompanın tipine (şırınga veya peristaltik) ve kullanılan filtrelere göre ayarlanmalıdır [39, 41]. Salım ortamının düşük akış hızı, nano-

partiküler sistemlerden etkin maddenin yavaş veya eksik salımına neden olan önemli bir parametre olarak bildirilmiştir [20]. Bu yöntemde kapalı ve açık sistem olmak üzere 2 tip akış sistemi tercih edilebilir [133,134]. Kapalı sistem sürekli akış yönteminde, salım ortamı; ilaç yüklü nanopartiküler sistemleri içeren bir hücreden sürekli olarak geçer ve salınan ilaç miktarı sürekli sirküle olan bu salım ortamından belirli bir süre boyunca tayin edilir; açık sistemde ise bir fraksiyon (örnek) toplayıcı mevcuttur ve belirli zaman noktalarında salım ortamı ilaç yüklü nanopartiküler sistemleri içeren bir hücreden sadece bir kez geçerek bu toplayıcıda toplanır (Şekil 2) [135]. Dolayısıyla, açık sistemde elde edilen analiz sonuçları, belirli zaman aralıklarında salınan kümülatif olmayan ilaç miktarını verirken, kapalı sistemden elde edilen analiz sonuçları salınan kümülatif ilaç miktarını vermektedir. Genel olarak, ekipmanın otomatik kurulum olması, kapalı (tam ve sürekli olarak dolaşan ortam) ve açık (tam ve sürekli olarak dolaşım yapmayan ortam) sistemlerdeki sürekli akış yöntemiyle rutin örnek almayı ve ortam değişimini basitleştirmektedir. Bununla birlikte, sürekli akış yöntemi, cihaz maliyetinin yüksekliği, kurulum zorluğu, hücrelerde yer alan filtrelerin tıkanması, ilacın filtre ve cam boncuklara adsorpsiyonu ve buna bağlı olarak da akış hızını sabit tutmakta yaşanan zorluklar gibi çeşitli sakıncalara sahiptir [20].

Tablo 3. Nanopartiküler sistemlerden ilaç salım testi için “sürekli akış yöntemi” nin kullanımına ait örnekler ve uygulanan parametreleri

Etkin madde	Uygulama yolu	Nanopartiküler sistem	Salım ortamı	Akış hızı	Cam boncuk kullanımı	Akış sistemi tipi (kapalı/açık)	Referans
Atorvastatin	Oral	Polimerik nanopartikül	pH 6,8 fosfat tamponu	8 mL/dk, 16 mL/dk	4 g 1 mm cam boncuk	Kapalı	[41]
Piroksikam	Oral	Polimerik nanopartikül	pH 1,2 tamponu (ilk 15 dk), pH 4,5 (15 dk-30 dk arası) tamponu, pH 6,8 tamponu (30-240 dk arası)	6 mL/dk	7 g 1 mm cam boncuklar	Açık	[39]
Amfoterisin B	İntravenöz	Lipozom	pH 7,4 tamponu	16 mL/dk	Belirtilmemiş	Kapalı	[136]



Şekil 2. Sürekli akış yönteminin, kapalı ve açık sistem olarak şematik gösterimi [54]'den esinlenerek çizilmiştir.

Tablo 4. İn vitro salım test yöntemlerinin karşılaştırılması

	Örnek Alma ve Ayırma Yöntemi	Membran Difüzyon Yöntemi (Diyaliz Kesesi Yöntemi)	Sürekli Akış Yöntemi
Örnek Kabı	Salım ortamının hacmine bağlı olarak şişe, flask veya flakon	Diyaliz kesesi	Sürekli akış hücresi
Örnek Alma	Çeşitli ayırma teknikleri kullanılarak (filtrasyon, santrifüj, ultrasantrifüj vb.) çöken nanopartiküler sistemlerden veya süpernatanttan örneğin alınması	Membranın dışını saran ortamdan (dış ortamdan) örneğin alınması	Nanopartiküler sistemleri içeren hücre içinde sürekli akışın sağlandığı ortamdan örneğin alınması
Üstünlükleri	İlk açığa çıkma etkisinin doğru ölçümü ve sink koşullarının sağlanabilmesi	Nanopartiküler sistemlerin dış ortamdan fiziksel olarak ayrılması nedeniyle örnek alma ve ortam değiştirmenin kolayca sağlanabilmesi	Örneklerin otomatik olarak sürekli toplanabilmesi ve analiz edilebilmesi
Sakıncaları	Uğraştırıcı örnek alma süreci ve nanopartiküler sistemlerin ortamdan istenmeyen şekilde uzaklaşması	Dış ortamla yavaş dengeleme nedeniyle ilk ilaç salım seviyelerinin doğru ölçümünün sınırlı olması	Birden fazla zaman noktasının analizi, salım profilinin tümünün incelenmesine izin vermesi Filtrenin tıkanması nedeniyle akış hızındaki değişiklik yaşanabilmesi ve ortamın hızlı bir şekilde değiştirilememesi, sistemin pahalı olması, sık bakım gerektiren ekipmanların kullanılması ve uzun süreli salım çalışmalarının zorluğu

4. Yöntemlerin karşılaştırılması

Kompleks bir yapıya sahip olan nanopartiküler sistemlerin in vitro salım testi için kullanılacak yöntem ve koşulların doğru seçilmesi sağlıklı sonuç elde edilmesi yönüyle çok önemlidir. Nanopartiküler sistemlerin in vitro salımını incelemek için kullanılan yöntemlerin birbirlerine üstünlüklerini ve sakıncalarını değerlendirmek ve doğru, güvenilir yöntemin belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır [41,137,138].

Bu bölümde, yukarıda ayrıntılarıyla açıklanan yöntemler için kritik parametrelerinin belirlenmesi üzerinde durulacak ve bu amaçla yapılan çalışmalara örnek verilecektir.

Örnek alma ve ayırma yönteminde gerçekleştirilecek örnek ayırma yöntemini belirlemek ve örneğin ortam içerisinde karıştırılmasında kullanılacak karıştırma tipinin seçimi, bu yöntemin kritik basamaklarını oluşturmaktadır. Örnek ayırma yönteminden (santrifüj, ultrasantrifüj vs.) nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin salımının etkilenmemesi ve dışardan uygulanan bu enerji ile nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin zarar görmemesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, lipozom, emülsiyon gibi ilaç taşıyıcı sistemlerde yüksek enerjili ayırma tekniklerinin kullanımının bu sistemlerin stabilitesini etkileyerek salım profilini değiştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Benzer şekilde, karıştırma tipinin seçimi de nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden etkin maddenin salımının doğru şekilde analiz edilebilmesi için önemlidir.

Membran difüzyon yönteminde ise ilacın membrandan difüzyonu söz konusudur, bu durumda seçilecek olan membranın MWCO değeri, membranın nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemle ve etkin maddeyle geçimliliği, difüzyonun gerçekleşmesinde bir itici gücün oluşması için membran içi ve dışı arasındaki hacimleri, bu yöntemin kritik parametrelerini oluşturmaktadır. Bu doğrultuda, bu yöntemde etkin maddenin membrandan difüzyonunu engellemeyecek ve nanopartiküler sistemin de geçemeyeceği bir membran MWCO'nun seçilmesi önemlidir. Ayrıca seçilen membranın etkin madde ve nanopartiküler sistemle geçimli olması da diğer bir önemli özelliktir. Membranın iki tarafındaki salım ortamı hacminin belirlenmesi önemli bir kriterdir. İlacın membrandan difüzyonunun gerçekleşmesi için gerekli itici gücün oluşturulması amacıyla diyaliz kesesinin iç hacminin, dış ortam hacminden önemli ölçüde daha küçük olması gerekmektedir [18,103,104,107].

Sürekli akış hücresi yönteminin seçiminde ise kullanılan filtrelerin tıkanmaması ve akış hızının ayarlanması kritik parametreleri oluşturmaktadır. Filtrelerin tıkanmaması için nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin sürekli akış hücresine cam boncuklarla (1 mm çaplı) birlikte eklenmesi, çalışmaların farklı akış hızlarında yapılarak akış hızının optimizasyonunun sağlanması önemlidir.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için in vitro ilaç salımı test yöntemlerinin özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 4'te özetlenmiştir. Uygulama yönüyle, örnek alma ve ayırma yöntemi en kolay olanıdır [92]. Bu yöntem genellikle ani (burst-out) salımın tayini için uygundur, ancak örnekleme sürecinin uğraştırıcı olması ve örnek alma sırasında nanopartiküllerin istenmeden ortamdaki uzaklaştırılma ihtimalinden dolayı sakıncaları mevcuttur. Membran difüzyon yönteminde ise salınan ilacı nanopartiküler sistemden ayırmak için zaman alıcı bir prosedüre ihtiyaç yoktur, çünkü nanopartiküler sistemlerin ve salınan ilacın bulunduğu ortam zaten bir membran ile fiziksel olarak ayrılmıştır. Bu nedenle, membran difüzyon yöntemi, örnek alma işlemi sırasında nanopartikül kaybı olasılığını en aza indirir. Membran difüzyon yönteminin sakıncası ise, diyaliz membranının doğal bariyer özelliklerinden dolayı, diyaliz kesesinin içi ve dışı arasındaki dengenin yavaş sağlanmasıdır. Bu durum özellikle, ani salıma sahip formülasyonlarda salınan başlangıç ilaç seviyelerinin doğru analizini sınırlayabilmektedir [138]. Ayrıca, ilacın ve nanopartiküler sistemin membran ile geçimsizliği varsa, bu yöntem kullanılamaz. Sürekli akış yönteminde, USP aparat 4 kullanılmaktadır ve otomatik bir işlem olması nedeniyle üstünlükleri vardır. Örnek alma ve ayırma yöntemi ve membran difüzyon yönteminde ise örnek alma işlemi otomatik değildir ve emek gerektirir. Sürekli akış yönteminde ilacın salımının sadece saniyeler, dakikalar içinde otomatik olarak sürekli örnekleme ve analiz edilmesi mümkündür [139]. Sürekli akış yönteminin sakıncaları arasında pahalı oluşu, filtrelerin arızalanması sayılabilir [91,93].

Gite ve ark., atorvastatin için geliştirdikleri nanopartiküler sistemlerden in vitro ilaç salımını incelemek için sürekli akış ve diyaliz kesesi yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Diyaliz kesesi yöntemi için karıştırıcı olarak USP aparat 1 (sepet) kullanılmış, nanopartiküller $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'de %1,5 SLS içeren pH 6,8 fosfat tamponunda süspand edilerek diyaliz kesesine yerleştirilerek farklı karıştırma hızlarında

(75 rpm, 100 rpm, 125 rpm) in vitro salımı incelenmiştir. Farklı karıştırma hızlarının salım profilinde anlamlı bir fark yaratmadığı belirlenmiştir ve ilacın % 68'inden fazlasının salınmaması, diyaliz membranının salımı engellediğini düşündürmüştü, bu nedenle ilacın tamamen salınmasını sağlamak için alternatif olarak sürekli akış yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Sürekli akış yönteminde ise aynı tampon farklı akış hızlarında (8 mL/dak., 16 mL/dak.) pompalanarak; kapalı tip sürekli akış hücresinde 60 dak. boyunca örnekler analiz edilmiş, 60 dak. sonunda salımın %65'inden fazlasının gerçekleşmediği ve akış hızının salım profilinde anlamlı bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu sebeple de sürekli akış hücresi yönteminde modifikasyona karar verilmiştir. Nanopartiküler sistemin sürekli akış hücresine 1 mm'lik cam boncuklarla karıştırılıp eklenmesi ile ilacın %100'ünün salınmasının sağlandığı bildirilmiştir [41].

Bir başka çalışmada, E vitamini içeren nanoemülsiyonlardan ilaç salımının tayinin de diyaliz kesesi, ters diyaliz kesesi ve diyaliz kesesi içeren sürekli akış hücresi yöntemi karşılaştırılmıştır. Derinin fizikokimyasal özelliklerine uygun olacak şekilde salım ortamı olarak %2 (a/a) Labrasol içeren asetat tamponu (pH 5,5) seçilmiş ve salım ortamının sıcaklığı $32 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ olarak ayarlanmıştır. Diyaliz kesesi yönteminde, diyaliz membranının gözenek boyutunun difüzyonu kısıtlama olasılığını incelemek için 50 kDa ve 100 kDa MWCO denenmiş ve aralarında anlamlı bir fark bulunmaması nedeniyle çalışmalara 50 kDa MWCO'ya sahip membran ile devam edilmiştir. Diyaliz membranı salım çalışmasına başlamadan önce salım ortamında 24 saat bekletildikten sonra, E vitamini nanoemülsiyonu diyaliz keselerine koyulmuş ve salım ortamına (200 mL) yerleştirilmiştir. 100 rpm'de çalkalayıcı su banyosunda karıştırılmıştır. Ters diyaliz kesesi yönteminde ise aynı koşullarda, E vitamini içeren nanoemülsiyonlar kesenin dışındaki ortama ilave edilmiş ve sink koşul sağlanmıştır. Sürekli akış hücresinde de aynı koşullar (sıcaklık, tampon, sink koşulu) kullanılarak in vitro salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda diyaliz kesesi yönteminde elde edilen E vitamini salımının diğer iki yönteme göre daha yavaş olduğu, ters diyaliz kesesi ve diyaliz kesesi içeren sürekli akış yöntemleriyle elde edilen salım profillerinin de benzer olduğu bildirilmiştir [137].

Manna ve ark. ise çok tabakalı lipozomlardan bupivakain'in salımının doğru değerlendirilmesi için

uygun in vitro salım yönteminin geliştirilmesi amacıyla çalışma yapmışlardır. Bu kapsamda, karıştırıcı olarak USP 2 (palet) kullanılan diyaliz kesesi yöntemi, ters diyaliz kesesi yöntemi ve karıştırıcı olarak çalkalayıcı kullanılan örnek alma ve ayırma yöntemi ile salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Diyaliz kesesi yönteminde, 10 kDa, 20 kDa, 50 kDa ve 100 kDa MWCO membranlar denenmiştir. Her diyaliz membranı, % 0,5 Sodyum dodesil sülfat (SDS) içerisinde bekletilmiş ve su ile yıkanmıştır. Bupivakain içeren lipozomlar, 200 mL fosfat tamponu içeren ve USP 2 (palet) ile karıştırılan salım ortamına diyaliz keseleri içinde ilave edilmiş ve belirli zaman aralıklarında alınan örnekler analiz edilmiştir. MWCO değeri arttıkça difüzyon hızının arttığı görülmüş olup difüzyonunun kısıtlanmaması için çalışmaya en yüksek MWCO değerine sahip (100 kDa) membran diyaliz keseleriyle devam edilmiştir. Ters diyaliz kesesi yönteminde ise lipozomlar salım ortamına ilave edilmiş ve 100 kDa MWCO membrana sahip diyaliz kesesinin içinden belirli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. Örnek alma ve ayırma yönteminde ise, mikrosantrifüj tüplerinde bulunan lipozomlar farklı pozisyonlarda (horizontal, vertikal, 45°) 12 rpm hızında karıştırılmış, belirli zaman aralıklarında alınan örnekler, santrifüj edildikten sonra süpernantlarda salınan etkin madde miktarı tayin edilmiştir. Yapılan çalışmada vertikal karıştırmanın, 45° pozisyonlarında ve horizontal karıştırmaya göre anlamlı derecede daha hızlı salım ile sonuçlandığı görülmüştür. Bu doğrultuda, en uygun karıştırma pozisyonu olarak vertikal karıştırma seçilmiştir [140].

5. SONUÇ

Son yıllarda hastalıklardan korunma, teşhis ve tedavisinde kullanım onayı alan nanopartiküler sistem sayısında önemli artışlar olduğu görülmektedir. Yeni geliştirilen bir nanopartiküler sistemden ilacın salımının güvenilir biçimde ve doğru olarak değerlendirilebilmesi; ilacın kalitesi, etkililiği ve güvenliliğini garanti etmek yönüyle oldukça önemlidir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden ilaç salımının incelenmesi için, bu derlemede üzerinde durulan örnek alma ve ayırma, membran difüzyon, sürekli akış gibi farklı yöntemler kullanılmakta olup, her birinin farklı üstünlük ve kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu doğrultuda, tüm formülasyonlar için tek ve üstün bir in vitro salım testi yönteminden bahsetmek mümkün değildir. Dolayısıyla, bu sistemlerden ilaç salımının

taininde kullanılacak yöntemin ve parametrelerin (düzenek, salım ortamı, salım ortamının hacmi, örnek alım zamanı, akış hızı vb.) seçimi, doğru değerlendirme yapabilmek için önemli bir basamaktır. Geliştirilen ilaç sistemi için en uygun ilaç salım test yöntemine karar verebilmek için, öncelikle bu yöntemlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek seçiminin yapılması, daha sonra her bir formülasyon için kritik parametrelerinin belirlenmesi gereklidir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kompleks yapısı nedeniyle, in vitro ilaç salım testi yöntemleri için her formülasyona uyan tek bir yaklaşımdan bahsetmenin mümkün olmaması ve bu sistemler için farmakopede önerilen salım sistemlerinin henüz bulunmaması sebebiyle, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin in vitro salım testlerine karar verirken formülasyon bazlı düşünülmesinde yarar vardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar finansal veya başka bir yolla çıkar çatışmaları olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Beyanı

Literatür araştırması, derlemenin yazılması, verilerin yorumlanması (EÇ), derleme çalışmasının fikri, koordinasyonu, derleme tasarımı, geliştirilmesi ve düzenlenmesi (SŞ)

KAYNAKLAR

1. FDA. (2011). Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology. *Biotechnology Law Report*, 30(5), 613–616. <https://doi.org/10.1089/blr.2011.9814>
2. 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>
3. Chen, X., Han, W., Zhao, X., Tang, W., Wang, F. (2019). Epirubicin-loaded marine carragee nanoligosaccharide capped gold nanoparticle system for pH-triggered anticancer drug release. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43106-9>
4. 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>
5. Cong, V. T., Houg, J. L., Kavallaris, M., Chen, X., Tilley, R. D., Gooding, J. J. (2022). How can we use the endocytosis pathways to design nanoparticle drug-delivery vehicles to target cancer cells over healthy cells?. *Chemical Society reviews*, 51(17), 7531–7559. <https://doi.org/10.1039/d1cs00707f>
6. Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E., Rodriguez-Torres, M., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>Hami 2021
7. 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>
8. Cao, Q., Li, X., Zhang, Q., Zhou, K., Yu, Y., He, Z., Xiang, Z., Qiang, Y., Qi, W. (2022). Big data analysis of manufacturing and preclinical studies of nanodrug-targeted delivery systems: a literature review. *BioMed Research International*, 2022, 1231446. <https://doi.org/10.1155/2022/1231446>
9. Ventola, C. L. (2017). Progress in nanomedicine: Approved and investigational nanodrugs. *Pharmacy and Therapeutics (P and T)*, 42(12), 742–755.
10. Teng, Z., Yu, M., Ding, Y., Zhang, H., Shen, Y., Jiang, M., Liu, P., Opoku-Damoah, Y., Webster, T. J., Zhou, J. (2018). Preparation and characterization of nimodipine-loaded nanostructured lipid systems for enhanced solubility and bioavailability. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 119–133. <https://doi.org/10.2147/IJN.S186899>
11. Wang, Y., Khan, A., Liu, Y., Feng, J., Dai, L., Wang, G., Alam, N., Tong, L., Ni, Y. (2019). Chitosan oligosaccharide-based dual pH responsive nano-micelles for targeted delivery of hydrophobic drugs. *Carbohydrate Polymers*, 223, 115061. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115061>
12. Zhao, Y., Chen, G., Meng, Z., Gong, G., Zhao, W., Wang, K., Liu, T. (2019). A novel nanoparticle drug delivery system based on PEGylated hemoglobin for cancer therapy. *Drug Delivery*, 26(1), 717–723. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1639846>
13. Gregoriadis, G., Perrie, Y. (2010). “Liposomes,” in *Encyclopedia of Life Sciences* (Chichester: John Wiley & Sons). doi: 10.1002/9780470015902.a0002656.pub2
14. Sahu, B. P., Das, M. K. (2014). Nanosuspension for enhancement of oral bioavailability of felodipine. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 4(2), 189–197. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0188-3>

15. Pattni, B. S., Chupin, V. V., Torchilin, V. P. (2015). New developments in liposomal drug delivery. *Chemical Reviews*, 115(19), 10938–10966. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>
16. Kumar, M., Bishnoi, R. S., Shukla, A. K., Jain, C. P. (2019). Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(3), 225–234. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>
17. Yahya, I., Atif, R., Ahmed, L., Eldeen, T. S., Omara, A., Eltayeb, M. (2019). Utilization of solid lipid nanoparticles loaded anticancer agents as drug delivery systems for controlled release. *International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology*, 3(12), 7–16. <https://doi.org/10.33564/ijeast.2019.v03i12.002>
18. Balde, A., Hasan, A., Joshi, I., Nazeer, R. A. (2020). Preparation and optimization of chitosan nanoparticles from discarded squilla (*Carinosquilla multicarinata*) shells for the delivery of anti-inflammatory drug: Diclofenac. *Journal of the Air & Waste Management Association* (1995), 70(12), 1227–1235. <https://doi.org/10.1080/10962247.2020.1727588>
19. Sahu, T., Ratre, Y. K., Chauhan, S., Bhaskar, L. V. K. S., Nair, M. P., Verma, H. K. (2021). Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102487. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487>
20. 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>
21. 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>
22. 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.
23. Shah, V.P. (2005). The role of dissolution testing in the regulation of pharmaceuticals: The FDA perspective. *Pharmaceutical Dissolution Testing 1st Edition*, 16, eBook ISBN: 9780429163463
24. 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>
25. Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413–420. <https://doi.org/10.1023/a:1016212804288>
26. USP 21: United States Pharmacopeia and the National Formulary. (1985). Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention.
27. USP 22: United States Pharmacopeia and the National Formulary. (USP 22 NF 18) (1990). Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention.
28. FIP. (1997). Guidelines for dissolution testing of solid oral products. <https://www.fip.org/file/1557> Erişim Tarihi 19.09.2022
29. Dokoumetzidis, A., Macheras, P. (2006). A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*, 321(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.011>
30. Marroum, P. J. (2014). History and evolution of the dissolution test. *Dissolution Technol*, 21(3), 11–16.
31. EMA/CHMP/CVMP/QWP (2017). Reflection paper on the dissolution specification for generic solid oral immediate release products with systemic action. *European Medicines Agency*, (Ağustos), 1–10.
32. European pharmacopoeia. (2019). (10th ed.). Strasbourg: Council of Europe
33. USP 43: United States Pharmacopeia and the National Formulary. (USP 43 NF 38) (2019). Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention.
34. EMA/CHMP/QWP. (2014). Guideline on quality of oral modified release products. *European Medicines Agency*, 44(Mart), 1–16.
35. Türk Farmakopesi (TFA) (2017). Analiz yöntemleri/malzemeleeri. *Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu*.
36. 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.
37. 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.
38. 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>

39. Serrano, D. R., Lalatsa, A., Dea-Ayuela, M. A., Bilbao-Ramos, P. E., Garrett, N. L., Moger, J., Guarro, J., Capilla, J., Ballesteros, M. P., Schätzlein, A. G., Bolás, F., Torrado, J. J., Uchegbu, I. F. (2015). Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 12(2), 420–431. <https://doi.org/10.1021/mp500527x>
40. Tummala, S., Satish Kumar, M. N., Prakash, A. (2015). Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.010>
41. 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>
42. 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-eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. *Powder Technology*, 219, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.12.046>
43. Varshosaz, J., Ghassami, E. (2015). Enhancement of dissolution rate of fenofibrate by spray drying technique: Comparison of eudragit E-100, solutol® HS15 and hydroxypropyl cellulose as carriers. *Farmacia*, 6(3), 433–445.
44. Bohrey, S., Chourasiya, V., Pandey, A. (2016). Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study. *Nano Convergence*, 3(1), 3–9. <https://doi.org/10.1186/s40580-016-0061-2>
45. Putro, J. N., Ismadi, S., Gunarto, C., Soetaredjo, F. E., Ju, Y. H. (2020). A study of anionic, cationic, and nonionic surfactants modified starch nanoparticles for hydrophobic drug loading and release. *Journal of Molecular Liquids*, 298, 112034. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112034>
46. 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>
47. Mudie, D. M., Samiei, N., Marshall, D. J., Amidon, G. E., Bergström, C. (2020). Selection of in vivo predictive dissolution media using drug substance and physiological properties. *The AAPS Journal*, 22(2), 34. <https://doi.org/10.1208/s12248-020-0417-8>
48. Shameem, M., Lee, H., DeLuca, P. P. (1999). A short-term (accelerated release) approach to evaluate peptide release from PLGA depot formulations. *AAPS PharmSci*, 1(3), 1–6. <https://doi.org/10.1208/ps010307>
49. Tomic, I., Vidis-Millward, A., Mueller-Zsigmondy, M., Car-dot, 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>
50. 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>
51. Bhardwaj, U., Burgess, D. J. (2010a). A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1–2), 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.009>
52. Abdel-Mottaleb, M. M. A., Lamprecht, A. (2011). Standardized in vitro drug release test for colloidal drug carriers using modified USP dissolution apparatus. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(2), 178–184. <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.502534>
53. Gao, Y., Zuo, J., Bou-Chacra, N., Pinto, T. D. J. A., Clas, S. D., Walker, R. B., Löbenberg, R. (2013). In vitro release kinetics of antituberculosis drugs from nanoparticles assessed using a modified dissolution apparatus. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/136590>
54. Amatya, S., Park, E. J., Park, J. H., Park, Kim, J. S., Seol, E., Lee, H., Choi, H., Y-H., Shin, Na, 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>
55. 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)
56. Jeong, Y. I., Song, J. G., Kang, S. S., Ryu, H. H., Lee, Y. H., Choi, C., Shin, B. A., Kim, K. K., Ahn, K. Y., Jung, S. (2003). Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 259(1-2), 79–91. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(03\)00207-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00207-2)
57. 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>
58. Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., Préat, V. (2009). Paclitaxel-lo-

- aded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 133(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.086>
59. 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>
60. Saim, M., Bashir, L., Naz, S., Ghayas, S., Bushra, R., Anwar, Z., Uddin, S.A., Korai, U. (2022). Development and characterization of cephadrine proniosomes for oral controlled drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 56, s67–s74. <https://doi.org/10.5530/ijper.56.1s.44>
61. 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>
62. 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)
63. Sarhadi, S., Moosavian, S. A., Mashreghi, M., Rahiman, N., Golmohamadzadeh, S., Tafaghodi, M., Sadri, K., Chamani, J., Jaafari, M. R. (2022). B12-functionalized PEGylated liposomes for the oral delivery of insulin: In vitro and in vivo studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103141>
64. Yue, P. F., Lu, X. Y., Zhang, Z. Z., Yuan, H. L., Zhu, W. F., Zheng, Q., Yang, M. (2009). The study on the entrapment efficiency and in vitro release of puerarin submicron emulsion. *AAPS PharmSciTech*, 10(2), 376–383. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9216-3>
65. 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>
66. 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>
67. Moghaddam, F. A., Ebrahimiyan, M., Oroojalian, F., Yazdian-Robati, R., Kalalinia, F., Tayebi, L., Hashemi, M. (2022). Effect of thymoquinone-loaded lipid-polymer nanoparticles as an oral delivery system on anticancer efficiency of doxorubicin. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 12(1), 33–44. <https://doi.org/10.1007/s40097-021-00398-6>
68. Liu, Y., Yang, G., Hui, Y., Ranaweera, S., Zhao, C. X. (2022). Microfluidic nanoparticles for drug delivery. *Small*, 2106580, 1–33. <https://doi.org/10.1002/sml.202106580>
69. Abedi, F., Davaran, S., Hekmati, M., Akbarzadeh, A., Baradaran, B., Moghaddam, S. V. (2021). An improved method in fabrication of smart dual-responsive nanogels for controlled release of doxorubicin and curcumin in HT-29 colon cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00764-6>
70. Banarase, N. B., Kaur, C. D. (2022). Whole whey stabilized oleanolic acid nanosuspension: Formulation and evaluation study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 67, 103001. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.103001>
71. Mahkam, M., Hosseinzadeh, F., Galehassadi, M. (2012). Preparation of ionic liquid functionalized silica nanoparticles for oral drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 03(03), 391–395. <https://doi.org/10.4236/jbmb.2012.33038>
72. Sarkhel, S., Ramsay, E., Kontturi, L. S., Peltoniemi, J., Urtili, A. (2014). High-through put in vitro drug release and pharmacokinetic simulation as a tool for drug delivery system development: Application to intravitreal ocular administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1–2), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.062>
73. Zhang, Z., Feng, S. S. (2006). Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: Synthesis, formulation, characterization and in vitro drug release. *Biomaterials*, 27(2), 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.104>
74. Beck-Broichsitter, M., Schweiger, C., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., Kissel, T. (2012). Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 158(2), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.030>
75. Ishihara, T., Kubota, T., Choi, T., Takahashi, M., Ayano, E., Kanazawa, H., Higaki, M. (2009). Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *International Journal of Pharmaceutics*, 375(1–2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.001>
76. Dong, Y., Feng S.S. (2006). Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxypoly(ethyleneglycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79(4), 12–19. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>
77. Bisht, S., Feldmann, G., Koorstra, J. B., Mullendore, M., Alvarez, H., Karikari, C., Rudek, M. A., Lee, C. K., Maitra, A., & Maitra, A. (2008). In vivo characterization of a polymeric

- nanoparticle platform with potential oral drug delivery capabilities. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(12), 3878–3888. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0476>
78. Musumeci, T., Ventura, C. A., Giannone, I., Ruozi, B., Montenegro, L., Pignatello, R., Puglisi, G. (2006). PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 325(1–2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.023>
 79. Morgen, M., Bloom, C., Beyerinck, R., Bello, A., Song, W., Wilkinson, K., Shamblin, S. (2012). Polymeric nanoparticles for increased oral bioavailability and rapid absorption using celecoxib as a model of a low-solubility, high-permeability drug. *Pharmaceutical Research*, 29(2), 427–440. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0558-7>
 80. Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., Rafiee-Tehrani, M. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007>
 81. Gupta, H., Aqil, M., Khar, R. K., Ali, A., Bhatnagar, A., Mittal, G. (2010). Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.10.004>
 82. Panyam, J., Dali, M. M., Sahoo, S. K., Ma, W., Chakravarti, S. S., Amidon, G. L., Levy, R. J., Labhasetwar, V. (2003). Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of Controlled Release*:92(1-2), 173–187. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(03\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(03)00328-6)
 83. Budhian, A., Siegel, S. J., Winey, K. I. (2008). Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 346(1–2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.011>
 84. Bhardwaj, U., Burgess, D. J. (2010b). Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1–2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.003>
 85. Khosa, A., Krishna, K. V., Dubey, S. K., Saha, R. N. (2020). Lipid nanocarriers for enhanced delivery of temozolomide to the brain. *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2059, 285–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_15
 86. Alajami, H. N., Fouad, E. A., Ashour, A. E., Kumar, A., Yassin, A. E. B. (2022). Celecoxib-loaded solid lipid nanoparticles for colon delivery: formulation optimization and in vitro assessment of anti-cancer activity. *Pharmaceutics*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010131>
 87. 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: physicochemical characterization and antibacterial evaluation. *Polymers*, 14(5), 1055. <https://doi.org/10.3390/polym14051055>
 88. 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>
 89. Xu, X., Khan, M. A., Burgess, D. J. (2012). A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 426(1–2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.030>
 90. 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>
 91. D'Souza, S., Amatya, S., Park, E. J., Park, J. H., Kim, J. S., Seol, E., ... Wong, T. W. (2013). Drug release testing methods of polymeric particulate drug formulations. *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery*, 47(1), 524–539. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813663-8.00003-8>
 92. Andhariya, J. V., Burgess, D. J. (2016). Recent advances in testing of microsphere drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(4), 593–608. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1134484>
 93. Kim, Y., Park, E. J., Kim, T. W., Na, D. H. (2021). Recent progress in drug release testing methods of biopolymeric particulate system. *Pharmaceutics*, 13(8), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081313>
 94. Bhagav, P., Upadhyay, H., Chandran, S. (2011). Brimonidine tartrate-eudragit long-acting nanoparticles: formulation, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *AAPS PharmSci-Tech*, 12(4), 1087–1101. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9675-1>
 95. 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>
 96. Ge, Z., Ma, R., Xu, G., Chen, Z., Zhang, D., Wang, Q., Hei, L., Ma, W. (2018). Development and in vitro release of isoniazid and rifampicin-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental And Clinical Research*, 24, 473–478. <https://doi.org/10.12659/msm.905581>
 97. K p, F.  .,  oşkunçay, S., Duman, F. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antio-

- oxidant and drug release system activities. *Materials Science and Engineering C*, 107, 110207. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110207>
98. Patil, P., Killedar, S., More, H., Vambhurkar, G. (2022). Development and characterization of 5-fluorouracil solid lipid nanoparticles for treatment of colorectal cancer. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s12247-021-09605-x>
99. Etman, S. M., Abdallah, O. Y., Mehanna, R. A., Elnaggar, Y. (2020). Lactoferrin/Hyaluronic acid double-coated ligno-sulfonate nanoparticles of quinacrine as a controlled release biodegradable nanomedicine targeting pancreatic cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 578, 119097. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119097>
100. Godara, S., Lather, V., Kirthanashri, S. V., Awasthi, R., Pandita, D. (2020). Lipid-PLGA hybrid nanoparticles of paclitaxel: Preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Materials Science & Engineering. C, Materials For Biological Applications*, 109, 110576. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110576>
101. Najafzadeh, M., Bakhshandeh, H., Zamani, Z., Movahedi, M., Atyabi, S. M. (2022). Preparation, characterization, and evaluation of eosin B-loaded nano-liposomes for growth inhibition of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research*, 121(1), 383–393. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07395-2>
102. Sambamoorthy, U., Manjappa, A. S., Eswara, B. R. M., Sannapala, A. K., Nagadeepthi, N. (2022). Vitamin E oil incorporated liposomal melphalan and simvastatin: approach to obtain improved physicochemical characteristics of hydrolyzable melphalan and anticancer activity in combination with simvastatin against multiple myeloma. *AAPS PharmSciTech*, 23(1). <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02177-6>
103. Londhe, V. Y., Sharma, S. (2022). Formulation, characterization, optimization and in-vivo evaluation of methazolamide liposomal in-situ gel for treating glaucoma. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 67, 102951. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102951>
104. Đoković, J., Konkel, M., Mitrović, J., Savić, S. M., Cekić, N., Savić, S. D. (2019). PEG-ylated parenteral nanoemulsions as prospective carriers for enhanced brain delivery with diazepam as a model drug – physicochemical characterization. *Symposium on Pharmaceutical Engineering Research SPHER-RE*. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-202001221435-0>
105. Suresh, P., Salem-Bekhit, M. M., Veedu, H. P., Alshehri, S., Nair, S. C., Bukhari, S. I., Viswanad, V., Taha, E. I., Sahu, R. K., Ghoneim, M. M., Elbagory, I. (2022). Development of a novel methotrexate-loaded nanoemulsion for rheumatoid arthritis treatment with site-specific targeting subcutaneous delivery. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 12(8), 1299. <https://doi.org/10.3390/nano12081299>
106. Gorle, A., Ahire, K., Shende, R. (2022). Design, Development and Characterization of 5-Fluorouracil Solid Lipid Nanoparticles for Treatment of Colorectal Cancer. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 12(2), 24–32. <https://doi.org/10.22270/jddt.v12i2.5245>
107. Farooq, M.A., Xu, L., Aquib M., Ahsan, A., Mirza Baig, M.F.A., Wang, B. (2019). Denatured food protein-coated nanosuspension: A promising approach for anticancer delivery of hydrophobic drug. *Journal of Molecular Liquids*.
108. Sezgin-Bayindir, Z., Antep, M. N., Yuksel, N. (2014). Development and characterization of mixed niosomes for oral delivery using candesartan cilexetil as a model poorly water-soluble drug. *AAPS PharmSciTech*, 16(1), 108–117. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0213-9109>
- Zhang, Y., Wang, C., Huang, Y., Yan, H., Liu, K. (2015). Core-crosslinked polymeric micelles with high doxorubicin loading capacity and intracellular pH- and redox-triggered payload release. *European Polymer Journal*, 68, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.033>
110. Al-Nemrawi, N. K., Altawabeyeh, R. M., Darweesh, R. S. (2022). Preparation and characterization of docetaxel-plga nanoparticles coated with folic acid-chitosan conjugate for cancer treatment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(2), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.10.034>
111. Rabanel, J. M., Faivre, J., Paka, G. D., Ramassamy, C., Hildgen, P., Banquy, X. (2015). Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nano-platform to the CNS. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 96, 409–420. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.09.004>
112. Bohrey, S., Chourasiya, V., Pandey, A. (2016). Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study. *Nano Convergence*, 3(1), 3–9. <https://doi.org/10.1186/s40580-016-0061-2>
113. Muntimadugu, E., Dhommatti, R., Jain, A., Challa, V. G. S., Shaheen, M., Khan, W. (2016). Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.012>
114. Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Yazan, Y. (2019). Dexketoprofen trometamol-loaded Eudragit® RL 100 nanoparticle formulation, characterization and release kinetics. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 57(1), 69–84. <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05705>
115. Esfandyari-Manesh, M., Abdi, M., Talasaz, A. H., Ebrahimi, S. M., Atyabi, F., Dinarvand, R. (2020). S2P peptide-conjugated PLGA-Maleimide-PEG nanoparticles containing Imatinib

- for targeting drug delivery to atherosclerotic plaques. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00324-w>
116. Fan, W., Xu, Y., Li, Z., Li, Q. (2019). Folic acid-modified β -cyclodextrin nanoparticles as drug delivery to load DOX for liver cancer therapeutics. *Soft Materials*, 17(4), 437–447. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2019.1624265>
 117. Afshar, M., Dini, G., Vaezifar, S., Mehdikhani, M., Movahedi, B. (2020). Preparation and characterization of sodium alginate/polyvinylalcohol hydrogel containing drug-loaded chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101530. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101530>
 118. Yu, A., Shi, H., Liu, H., Bao, Z., Dai, M., Lin, D., Lin, D., Xu, X., Li, X., Wang, Y. (2020). Mucoadhesive dexamethasone-glycol chitosan nanoparticles for ophthalmic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 575, 118943. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118943>
 119. Wang, Y., Yang, X., Yang, J., Wang, Y., Chen, R., Wu, J., Liu, Y., Zhang, N. (2011). Self-assembled nanoparticles of methotrexate conjugated O-carboxymethyl chitosan: Preparation, characterization and drug release behavior in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1665–1670. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.080>
 120. Xiong, X. Y., Tam, K. C., Gan, L. H. (2005). Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 103(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.018>
 121. Ge, H., Hu, Y., Jiang, X., Cheng, D., Yuan, Y., Bi, H., Yang, C. (2002). Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(6), 1463–1473. <https://doi.org/10.1002/jps.10143>
 122. Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A. G., Ithakissios, D. S. (2002). PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: In vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*, 79(1–3), 123–135. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00530-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00530-2)
 123. Hu, Y., Jiang, X., Ding, Y., Zhang, L., Yang, C., Zhang, J., Chen, J., Yang, Y. (2003). Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly(caprolactone)-poly(ethylene oxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 24(13), 2395–2404. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00021-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00021-8)
 124. Peracchia, M. T., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A., Lotan, N., Langer, R. (1997). PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *Journal of Controlled Release*, 46(3), 223–231. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01597-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01597-0)
 125. Liu, M., Li, H., Luo, G., Liu, Q., Wang, Y. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of surface modification polymeric nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research*, 31(4), 547–554. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1191-8>
 126. Liu, M., Dong, J., Yang, Y., Yang, X., Xu, H. (2005). Characterization and release of triptolide-loaded poly (D, L-lactic acid) nanoparticles. *European Polymer Journal*, 41(2), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.09.015>
 127. Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., Ravi Kumar, M. N. V. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 119(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.016>
 128. Jeon, H. J., Jeong, Y. Il, Jang, M. K., Park, Y. H., Nah, J. W. (2000). Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 207(1–2), 99–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00537-8)
 129. Sant, S., Nadeau, V., & Hildgen, P. (2005). Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 107(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.02.017>
 130. Zaghoul, N., Hoffy, N. M. E., Mahmoud, A. A., Elkasabgy, N. A. (2022). Cyclodextrin stabilized freeze-dried silica/chitosan nanoparticles for improved terconazole ocular bioavailability. *Pharmaceutics*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030470>
 131. Iyer, S. S., Barr, W. H., Karnes, H. T. (2006). Profiling in vitro drug release from subcutaneous implants: A review of current status and potential implications on drug product development. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. <https://doi.org/10.1002/bdd.493>
 132. Fotaki, N. (2011). Flow-through cell apparatus (USP apparatus 4): Operation and features. *Dissolution Technologies*, 18, 46–49
 133. Wagenaar, B. W., Müller, B. W. (1994). Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. *Biomaterials*, 15(1), 49–54. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90196-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90196-1)
 134. Wang, J., Wang, B. M., Schwendeman, S. P. (2002). Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release*, 82(2–3), 289–307. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00137-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00137-2)
 135. Rawat, A., Bhardwaj, U., Burgess, D. J. (2012). Comparison of in vitro-in vivo release of Risperdal® Consta® microsp-

- heres. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1–2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.006>
136. Tang, J., Srinivasan, S., Yuan, W., Ming, R., Liu, Y., Dai, Z., Noble, C. O., Hayes, M. E., Zheng, N., Jiang, W., Szoka, F. C., Schwendeman, A. (2019). Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 134, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.11.010>
137. Morais, J. M., Burgess, D. J. (2014). In vitro release testing methods for vitamin e nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 475(1), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.063>
138. 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>
139. Nothnagel, L., Wacker, M. G. (2018). How to measure release from nanosized carriers? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 120, 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.004>
140. Manna, S., Wu, Y., Wang, Y., Koo, B., Chen, L., Petrochenko, P., Dong, Y., Choi, S., Kozak, D., Oktem, B., Xu, X., Zheng, J. (2019). Probing the mechanism of bupivacaine drug release from multivesicular liposomes. *Journal of Controlled Release*, 294, 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.029>