

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

SUDA ÇÖZÜNEN NANOKİTOSAN SENTEZİ

Aylin GEÇER

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Aylin Geçer tarafından hazırlanan ‘‘Suda özünen Nanokitosan Sentezi’’ adlı tez çalışması 21/01/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : *Prof. Dr. Ayla alımlı*

Eř Danışman : *Prof. Dr. Belma Turan, Ankara Üniversitesi*

Jüri Üyeleri :

Başkan: *Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Hacettepe Üniversitesi*

Üye : *Prof. Dr. Ayla alımlı, Ankara Üniversitesi*

Üye : *Prof. Dr. Zeki Aktaş, Ankara Üniversitesi*

Üye : *Prof. Dr. Emine Bayraktar, Ankara Üniversitesi*

Üye : *Doç. Dr. Nihal Aydođan, Hacettepe Üniversitesi*

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr.Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

SUDA ÇÖZÜNEN NANOKİTOSAN SENTEZİ

Aylin GEÇER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Ayla ÇALIMLI
Eş Danışman: Prof.Dr. Belma TURAN

Bu doktora çalışmasında biyobozunur bir polimer olan kitosandan suda çözünen nanokitosan sentezlenmiş ve bu ürün suda iyi çözünmeyen bir ilaç olan *candesartan-cilexetil* çözünürlüğünü artırmak için incelenmiştir. Çalışma dört aşamadan oluşmuştur. Birinci aşamada suda çözünen nanokitosan iyonik jelleşme tekniği ile sentezlenmiş ve FTIR, TEM, DLS analizleri ile karakterize edilmiştir. Suda çözünür nanokitosanın ortalama parçacık boyutu 220 nm olarak saptanmıştır.

İkinci aşamada yüksek tansiyona karşı kullanılan *candesartan-cilexetil* ilacı suda çözünen nanokitosana iki farklı yöntemle (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) yüklenmiş ve elde edilen örnekler FTIR, HPLC, AFM analizleri ile karakterize edilmiştir. Örneklerin ilaç yükleme etkinlikleri %66, boyutları ise 37-76 nm aralığında bulunmuştur. Ultrasonik etki yönteminin iyonik jelleşme yöntemine göre küçük parçacık boyutu verdiği belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında suda çok iyi çözünen nanokitosanın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi in vitro deneyler ile incelenmiştir. Suda çözünen nanokitosanın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğünü artırdığı (yaklaşık 400 kat) saptanmıştır.

Dördüncü aşamada ise suda çözünen nanokitosanın kalp kası hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Suda çözünen nanokitosanın hücrenin zamana bağlı canlılığının korunmasını olumlu etkilediği belirlenmiştir.

Bu doktora çalışmasında sonuç olarak suda çok iyi çözünen nanokitosanın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının biyoyararlanım (%15) ve tedavi edici etkinliğinin artmasında önemli bir faktör olan ilaç çözünürlüğünü arttırabildiği belirlenmiştir.

Ocak 2010, 108 sayfa

Anahtar Kelimeler: Suda çözünen nanokitosan, suda çözünmeyen, *candesartan-cilexetil*, *candesartan*, iyonik jelleşme, ultrasonik etki

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

SYNTHESIS OF WATER-SOLUBLE NANOCHITOSAN

Aylin GEÇER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Ayla ÇALIMLI
Co-Supervisor: Prof.Dr. Belma TURAN

Water soluble nanochitosan was synthesized from a biodegradable polymer chitosan in this Ph. D. Thesis. This product was examined to enhance the solubility of poorly water soluble drug *candesartan-cilexetil*. The study was composed of four steps. Water soluble nanochitosan was synthesized by ionic gellation technique and characterized by FTIR, TEM, DLS analyses in the first step. The average particle size of water soluble nanochitosan was determined as 220 nm.

In the second step, the drug *candesartan-cilexetil* used against hypertension was loaded to water soluble nanochitosan by two different methods (ultrasonic effect, ionic gellation) and obtained samples were characterized by FTIR, HPLC, AFM analyses. The drug loading efficiencies and sizes of samples were found as 66% and in the range of 37-76 nm respectively. Ultrasonic effect method gave a high drug loading efficiency and small particle size compared to ionic gellation method.

The effect of nanochitosan very soluble in water to the solubility of poorly water soluble drug *candesartan-cilexetil* was investigated by in vitro experiments in the third step of the study. The water soluble nanochitosan increased the solubility of poorly water soluble drug *candesartan-cilexetil* as approximately 400 times.

The effect of water soluble nanochitosan to the viability of cardiomyocytes was examined in the fourth step. Water soluble nanochitosan affected the protection of cardiomyocytes viability dependent to time positively.

In this Ph. D. study nanochitosan very soluble in water could enhanced the drug solubility which is an important factor to increase the bioavailability (15%) and therapeutic efficiency of poorly water soluble drug *candesartan-cilexetil* consequently.

January 2010, 108 pages

Key Words: Water soluble nanochitosan, water insoluble, *candesartan-cilexetil*, *candesartan*, ionic gellation, ultrasonic effect

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince her konuda beni destekleyen, elindeki tüm olanakları sunarak düzgün bir çalışma ortamı sağlayan, bilgi birikimi ve önerileri ile çalışmaya yön veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI'ya (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği) çok teşekkür ederim. Bilimsel yaklaşımları, öneri ve değerlendirmeleri ile çalışmama önemli katkısı olan ve Biyofizik Araştırma laboratuvarının tüm olanaklarını sunan değerli eş danışman hocam Prof. Dr. Belma TURAN'a (Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik) çok teşekkür ederim. Bilimsel bakış açısı, önerileri ve değerlendirmeleri ile çalışmamın her bir aşamasında emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na (Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği), değerli hocam Prof. Dr. Zeki AKTAŞ'a (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği) ve değerli hocam Prof. Dr. Nuray YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği) çok teşekkür ederim. Kimyasal yorumlamalardaki değerlendirmeleri için değerli hocam Prof. Dr. Beytiye ÖZGÜN'e (Ankara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya) ve Fluometre analizindeki değerlendirmeleri için değerli hocam Prof. Dr. Mehmet UĞUR'a (Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik) bana ayırdıkları zaman ve gösterdikleri ilgi için çok teşekkür ederim. Deneysel çalışma sürecimdeki anlayışı ve desteği için Kimya Mühendisliği Bölüm Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Taner TOĞRUL'a (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği), ön denemelerimde sağladığı madde desteği için değerli hocam Prof. Dr. Kezban CANDOĞAN'a (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği), AFM analizindeki desteği için değerli hocam Prof. Dr. Yalçın ELERMAN'a (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Fizik Mühendisliği), Zeta Sizer cihazını kullanmama olanak sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL'e (Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği), ömrüm boyunca katkılarından dolayı Doç. Dr. Aynur GEÇER BÜYÜKUTKU'ya (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Jeoloji Mühendisliği, TEM analizindeki emeği nedeniyle Dr. Ayten AKTAŞ'a, HPLC analizindeki katkılarından dolayı Yük. Kim. Müh. Dilek ÇİMEN'e, bağışladıkları ilaç etken maddeleri (*Candesartan-cilexetil* ve *candesartan*) nedeniyle Astra Zeneca firmasına, hücre canlılığı deneyleri ve kan alımlarındaki emeği nedeniyle Araş. Gör. Ayça BİLGİNOĞLU'na, kan alımlarındaki emekleri nedeniyle Araş. Gör. Esmâ Nur ZEYDANLI'ya ve Aytaç SEYMEN'e, Fluometre deneylerindeki emekleri nedeniyle Şerife SAYAR ve Kemal SAYAR'a, HPLC yönteminin oluşturulmasındaki katkıları nedeniyle Uzman Eczacı Burak KANDİLCİ ve Araş. Gör. Mustafa ÇELEBİER'e, görüşlerini aldığım değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Yavuz GÖKÇE ve Araş. Gör. Mehmet YILMAZ'a, desteği nedeniyle değerli arkadaşım Araş. Gör. Ceren ATILLA'ya, sevgili anne ve babama, tüm aileme ve tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından (20080745003 HPD) “Suda Çözünür Nanokitosan Sentezi” konulu proje ile desteklenmiştir.

Aylin GEÇER
Ankara, Ocak 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1 Materyal.....	11
3.2 Yöntem.....	11
3.2.1 Suda çözünen nanokitosanın sentezi ve karakterizasyonu.....	12
3.2.1.1 Suda çözünen nanokitosanın sentezi.....	12
3.2.1.1.1 Trimetil kitosanın(TMC) sentezi.....	12
3.2.1.1.2 Trimetil nanokitosan sentezi.....	14
3.2.1.2 Suda çözünen nanokitosanın karakterizasyonu.....	15
3.2.1.2.1 FTIR analizi.....	15
3.2.1.2.2 NMR analizi.....	16
3.2.1.2.3 SEM analizi.....	16
3.2.1.2.4 TEM analizi.....	16
3.2.1.2.5 DLS analizi.....	16
3.2.2 İlaç yükleme ve ilaç yüklü örneklerin karakterizasyonu.....	17
3.2.2.1 İlaç yükleme.....	17
3.2.2.1.1 Ultrasonik etki yöntemi.....	17
3.2.2.1.2 İyonik jelleşme yöntemi.....	18
3.2.2.2 İlaç yüklü örneklerin karakterizasyonu.....	19
3.2.2.2.1 HPLC analizi.....	19
3.2.2.2.2 FTIR analizi.....	20
3.2.2.2.3 AFM analizi.....	20
3.2.3 Nanokitosanın İlaç Çözünürlüğüne Etkisinin Belirlenmesi.....	20
3.2.3.1 Nanokitosanın ilaç çözünürlüğüne etkisinin UV ile belirlenmesi.....	21
3.2.3.2 Nanokitosanın ilaç çözünürlüğüne etkisinin HPLC ile belirlenmesi.....	23
3.2.4 Nanokitosanın hücre canlılığına etkisinin incelenmesi.....	24
3.2.5 Nanokitosanın hücreye floresan boya girişine etkisi.....	25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
4.1 Suda Çözünen Nanokitosan Karakterizasyon Bulguları.....	28
4.1.1 FTIR analizi sonuçları.....	28
4.1.2 NMR analizi sonuçları.....	30
4.1.3 SEM analizi sonuçları.....	33
4.1.4 TEM analizi sonuçları.....	33
4.1.5 DLS analizi sonuçları.....	37
4.2 İlaç Yüklü Örneklerin Karakterizasyon Bulguları.....	41
4.2.1 HPLC analizi sonuçları.....	41
4.2.1.1 <i>Candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan HPLC sonuçları.....	41
4.2.1.2 <i>Candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan HPLC sonuçları.....	43

4.2.2 FTIR analizi sonuçları.....	45
4.2.2.1 <i>Candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan FTIR sonuçları.....	45
4.2.2.2 <i>Candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan FTIR sonuçları.....	47
4.2.3 AFM analizi sonuçları.....	49
4.2.3.1 <i>Candesartan-cilexetil</i> ve <i>candesartan</i> AFM sonuçları.....	49
4.2.3.2 <i>Candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan AFM sonuçları	53
4.2.3.3 <i>Candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan AFM sonuçları.....	60
4.3 Nanokitosanın İlaç Çözünürlüğüne Etkisi	65
4.3.1 UV analizi sonuçları.....	65
4.3.2 HPLC analizi sonuçları.....	68
4.4 Nanokitosanın hücre canlılığına etkisi.....	75
4.5 Nanokitosanın Hücreye Floresan boya (Fura-2) Girişine Etkisi	76
5. SONUÇLAR.....	78
KAYNAKLAR.....	80
EKLER.....	85
EK 1 a. Trimetil Kitosanın Etanolde, b. Trimetil Nanokitosanın Etanolde, c. Trimetil Nanokitosanın HEPES Tampon Çözeltilinde Büyüklük Dağılım Değerleri	87
EK 2 a. Trimetil Kitosanın, b. Trimetil Nanokitosanın Suda Büyüklük Dağılım Değerleri.....	88
EK 3 <i>Candesartan-Cilexetil/Candesartan</i> Yüklü Örneklerin En Büyük Tane Boyutu Değerleri.....	89
EK 4 Trimetil Kitosan ve Trimetil Nanokitosanın Tanecik Ortalama Boyutlarının ve PDI Değerlerinin (DLS) Süreli Yayınlarla Karşılaştırılması.....	90
EK 5 Trimetil Kitosanın Kromatogramı.....	91
EK 6 Trimetil Nanokitosanın Kromatogramı.....	92
EK 7 Ultrasonik Etki Yöntemi ile Hazırlanan <i>Candesartan-Cilexetil</i> Yüklü Trimetil Kitosan.....	93
EK 8 Ultrasonik Etki Yöntemi ile Hazırlanan <i>Candesartan</i> Yüklü Trimetil Kitosan.....	94
EK 9 Trimetil Kitosanın 1 ve 3 Gün Süreyle <i>Candesartan-Cilexetil</i> İlacının Çözünürlüğüne Etkisi.....	95
EK 10 Trimetil Kitosanın 1 ve 3 Gün Süreyle <i>Candesartan-Cilexetil</i> İlacının Çözünürlüğüne Etkisi	96
EK 11 1 ve 3 Gün Süreyle <i>Candesartan-Cilexetil</i> İlacının Çözünürlüğüne Arap Zamkı Etkisi.....	97
EK 12 Ticari Suda Çözünür Kitosanın 1 ve 3 Gün Süreyle <i>Candesartan-Cilexetil</i> İlacının Çözünürlüğüne Etkisi.....	98
EK 13 1 ve 3 Gün Süre ile UV ile Yapılan Çözünürlük Deneylerinden Elde Edilen Artış Miktarlarının Karşılaştırılması.....	99
EK 14 İlaç Yüklü Trimetil Nanokitosan Örneklerinin Sudaki Çözeltisi Analizlendiğinde İlacın Alınma Süresi ve Alan Değerleri.....	100
EK 15 İlaç Yüklü Trimetil Kitosan Örneklerinin Sudaki Çözeltisi Analizlendiğinde İlacın Alınma Süresi ve Alan Değerleri.....	101
EK 16 Arap Zamkı Maddesinin Kromatogramı.....	102

EK 17 İlaç Yüklü Arap Zamkı Örneklerinin Sudaki Çözeltileri	
Analizlendiğinde İlacın Alınma Süresi ve Alan Değerleri.....	103
EK 18 Ticari Suda Çözünür Kitosanın Kromatogramı.....	104
EK 19 İlaç Yüklü Ticari Suda Çözünür Kitosanın Örnekleri	
Suda Analizlendiğinde İlacın Alınma Süresi ve Alan Değerleri.....	105
EK 20 UV Sonuçları ve HPLC Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	107

SİMGELER DİZİNİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskop
CN	Siyano
dk	Dakika
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	Dimetil sülfoksit
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
g	gram
h	saat
HCl	Hidroklorik asit
HEPES	(N-(2-Hidroksietil) Piperazin-N-(2-Etan Sülfonik Asit)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KBr	Potasyum Bromür
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mPa	Milipaskal saniye
NaCl	Sodyum klorür
NanoTMC	Trimetil nanokitosan
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskop
TMC	Trimetil Kitosan
UV	Ultraviyole
w/w	Kütlece Oran
in vivo	Canlı içinde
in vitro	Laboratuvarda

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Kitinin deasetilasyonu ile kitosan sentezi.....	1
Şekil 1.2	Geleneksel tablet/kapsül ve katı dağılımın suda iyi çözünmeyen bir ilacın çözünürlüğüne etkisi (Serajuddin 1999).....	2
Şekil 1.3	a. <i>Candesartan-cilexetil</i> , b. <i>candesartanın</i> kimyasal yapıları.....	4
Şekil 2.1	Trimetil kitosanın kimyasal yapısı (Ding vd. 2006).....	8
Şekil 2.2	Trimetil nanokitosaanın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 3.1	Trimetil kitosan sentezinde kullanılan deney sistemi.....	13
Şekil 3.2	Trimetil kitosan sentez aşamaları (Sieval vd. 1998).....	13
Şekil 3.3	Trimetil kitosan sentez mekanizması.....	14
Şekil 3.4	Trimetil nanokitosaanın sentez aşamaları.....	15
Şekil 3.5	Ultrasonik etki ile ilaç yükleme.....	18
Şekil 3.6	İyonik jelleşme yöntemi ile ilaç yükleme.....	19
Şekil 3.7	Çözünürlüğün UV ile saptanması.....	22
Şekil 3.8	Hücre izolasyonu (Ozdemir et. al. 2005).....	25
Şekil 3.9	Nanokitosaanın hücreye Fura-2 floresan boyası girişine etkisi.....	26
Şekil 4.1	a. Kitosan, b. Trimetil kitosan, c. Trimetil nanokitosaan FTIR spektrumları.....	29
Şekil 4.2	a. Kitosan, b. TMC (Trimetil kitosan klorür) NMR spektrumları.....	31
Şekil 4.3	a. Kitosan (x400 büyütme), b. TMC (Trimetil kitosan klorür, x3200 büyütme) SEM görüntüleri.....	33
Şekil 4.4	Trimetil nanokitosaanın farklı bölgelerden çekilmiş TEM görüntüleri.....	34
Şekil 4.5	Trimetil nanokitosaanın boyut dağılımının belirlenmesinde kullanılan tüm TEM görüntüleri.....	35
Şekil 4.6	Trimetil nanokitosaanın boyut dağılımı.....	36
Şekil 4.7	a. Trimetil kitosaanın etanolde, b. Trimetil nanokitosaanın etanolde, c. Trimetil nanokitosaanın HEPES tampon çözeltisinde büyüklük dağılımı.....	38
Şekil 4.8	a. Trimetil kitosaanın, b. Trimetil nanokitosaanın suda büyüklük dağılımı.....	39
Şekil 4.9	Trimetil kitosaan ve trimetil nanokitosaanın tanecik ortalama boyutlarının (DLS) süreli yayınlarla karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.10	a. <i>Candesartan-cilexetil</i> , b. Ultrasonik etki, c. İyonik jelleşme ile hazırlanan <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosaan kromatogramları, ve d. yükleme etkinliği değerleri.....	42
Şekil 4.11	a. <i>Candesartan</i> , b. Ultrasonik etki, c. İyonik jelleşme ile hazırlanan <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosaan kromatogramları, ve d. yükleme etkinliği değerleri.....	43
Şekil 4.12	a. <i>Candesartan-cilexetil</i> , b. Trimetil nanokitosaan, c. Ultrasonik etki ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosaan FTIR analizi sonuçları.....	45
Şekil 4.13	a. Trimetil kitosaan, b. <i>Candesartan-cilexetil</i> , c. İyonik jelleşme ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosaan FTIR analizi sonuçları.....	46

Şekil 4.14 a. <i>Candesartan</i> , b. Trimetil nanokitosan, c. Ultrasonik etki ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan FTIR analizi sonuçları.....	47
Şekil 4.15 a. Trimetil kitosan, b. <i>Candesartan</i> , c) İyonik jelleşme ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan FTIR analizi sonuçları.....	48
Şekil 4.16 <i>Candesartan-cilexetilin</i> a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri.....	50
Şekil 4.17 <i>Candesartan-cilexetilin</i> tanecik boyut dağılımı.....	51
Şekil 4.18 <i>Candesartanın</i> a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri.....	52
Şekil 4.19 <i>Candesartanın</i> tanecik boyut dağılımı.....	53
Şekil 4.20 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil kitosan örneğinin a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri.....	54
Şekil 4.21 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı.....	55
Şekil 4.22 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan örneğinin a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri.....	56
Şekil 4.23 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı.....	57
Şekil 4.24 İyonik jelleşme yöntemi ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan örneğinin a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri.....	58
Şekil 4.25 İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı.....	59
Şekil 4.26 <i>Candesartan-cilexetil</i> yüklü nanokitosan örnekleri tanecik boyutlarının karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.27 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil kitosan örneğinin a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri.....	61
Şekil 4.28 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı.....	62
Şekil 4.29 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan örneğinin a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri.....	63
Şekil 4.30 Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı.....	64
Şekil 4.31 <i>Candesartan-cilexetilin</i> metanolde UV spektrumu.....	66
Şekil 4.32 <i>Candesartan-cilexetilin</i> çalışma doğrusu.....	66
Şekil 4.33 Trimetil nanokitosanın 1 ve 3 gün süreyle <i>candesartan-cilexetil</i> ilacının çözünürlüğüne etkisi.....	67
Şekil 4.34 a. Trimetil nanokitosan, b. <i>Candesartan-cilexetilin</i> sudaki kromatogramları.....	68
Şekil 4.35 İlaç yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin kromatogramları.....	69
Şekil 4.36 İlaç yüklü trimetil kitosan örneklerinin kromatogramları.....	70
Şekil 4.37 İlaç yüklü arap zamkı örneklerinin kromatogramları.....	71
Şekil 4.38 İlaç yüklü ticari suda çözünür kitosan örneklerinin kromatogramları.....	72
Şekil 4.39 HPLC sonuçlarından elde edilen çözünürlük artış miktarlarının karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.40 <i>Candesartan-cilexetilin</i> çözünürlüğünü artırmada sıralama.....	74
Şekil 4.41 a. Nanokitosan, ve b. arap zamkının hücre canlılığına etkisi.....	75

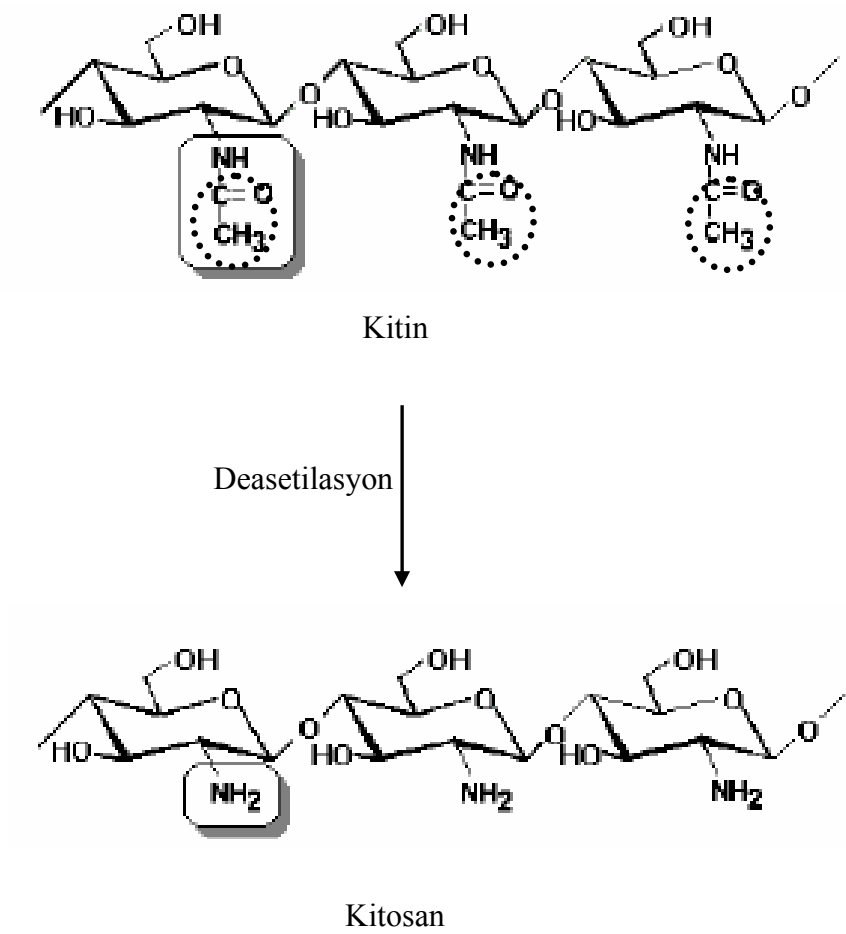
Şekil 4.42 Nanokitosan ve arap zamkının hücre canlılığına etkisinin karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.43 a. 10 µg/ml nanokitosanın, b.100 µg/ml nanokitosanın, c. nanokitosan derişiminin, d. 100 µg/ml trimetil kitosanın hücreye floresan boya (Fura-2) girişine etkisi.....	77
Şekil 4.44 Trimetil kitosanın (100 µg/ml) ve trimetil nanokitosanın (100 µg/ml) Fura-2'nin hücreye girişine etkilerinin karşılaştırılması.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Hazırlanan örneklerin ilaç yükleme oranları.....	24
Çizelge 4.1	Kitosan ve Trimetil kitosan FTIR sonuçlarının süreli yayınlarla karşılaştırılması.....	29
Çizelge 4.2	Kitosan ve Trimetil kitosan NMR sonuçlarının süreli yayınlarla karşılaştırılması.....	32
Çizelge 4.3	% 20 ilaç yükleme ile hazırlanan <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan örneklerinde HPLC ile belirlenen <i>candesartan-cilexetil</i> miktarları ve <i>candesartan-cilexetil</i> yükleme değerleri.....	42
Çizelge 4.4	% 20 <i>candesartan</i> yükleme ile hazırlanan <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan örneklerinde HPLC ile belirlenen <i>candesartan</i> miktarları ve <i>candesartan</i> yükleme değerleri.....	44
Çizelge 4.5	<i>Candesartan</i> yüklü örneklerin ortalama tane boyutu değerleri.....	65

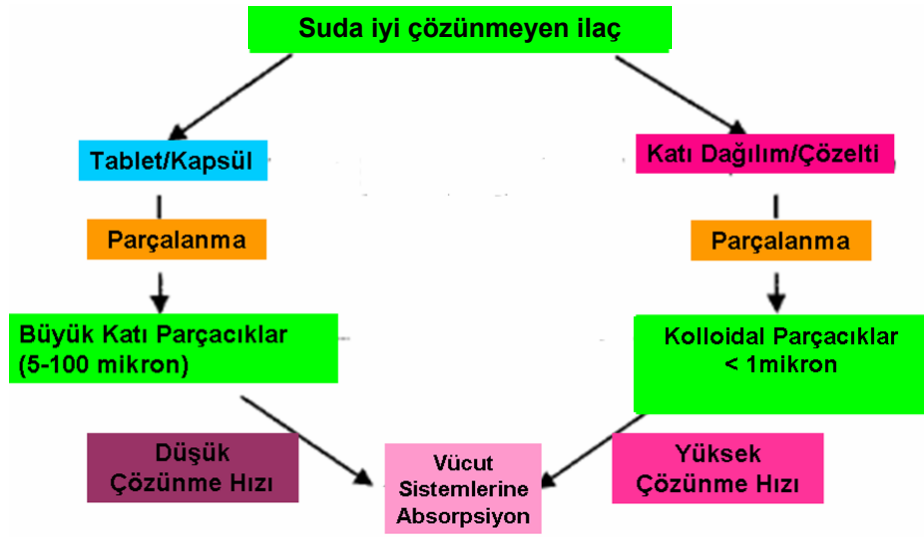
1. GİRİŞ

Kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen kitosan suda çözünmez, ancak seyreltik asit çözeltilerinde çözünür. Deasetilasyon işlemi kitinin sodyum hidroksit çözeltisi (%40-%50) ile yüksek sıcaklıkta (110-115°C) etkileştirilmesi ile gerçekleştirilir (Şekil 1.1). Kitosan biyoyumluluk ve biyobozunurluk gibi özellikleri nedeniyle tıp ve eczacılık alanlarında yaygın bir şekilde kullanılır (Duman ve Şenel 2004).



Şekil 1.1 Kitinin deasetilasyonu ile kitosan sentezi

Kitosan ile hazırlanan katı dağılımlar suda iyi çözünmeyen ilaçların çözünürlük ve biyoyararlanımlarını artırır (Portero vd. 1998). Suda çözünmeyen ilaçların vücuda verilmesinde katı dağılımın geleneksel tablet/kapsüllere üstünlüğü Şekil 1.2’de görülmektedir. Suda çözünmeyen ilaç tablet/kapsül şeklinde verildiğinde 5-100 µm boyutunda büyük katı parçacıklar oluşur ve çözünme hızları düşüktür. Katı dağılım/çözelti olarak verildiğinde ise 1 µm’nin altında kolloidal parçacıklar oluşur ve hızla çözünür (Serajuddin 1999).



Şekil 1.2 Geleneksel tablet/kapsül ve katı dağılımın suda iyi çözünmeyen bir ilacın çözünürlüğüne etkisi (Serajuddin 1999)

Katı dağılımlar, kitosan çözeltisi (Kitosan seyreltik asit çözeltisinde çözülür) ve ilaç çözeltisinin (İlaç organik çözücüde çözülür) karıştırılıp kurutulmasıyla hazırlanır. Katı dağılımındaki asit kalıntısı nedeniyle ilaç bozunur, aktifliğini kaybeder ve kararlılığı azalır. Son yıllarda suda çözünür kitosan türevleri ile suda iyi çözünmeyen ilaçların çözünürlük ve biyoyararlanımları artırılarak bu problem aşılmaya çalışılmaktadır (Portero vd. 1998, Kim vd. 2006a).

Suda çözünür kitosan türevleri homojen faz reaksiyonu, molekül ağırlığını azaltma ve kimyasal modifikasyon yöntemleri ile sentezlenmektedir (Chung vd. 2005). Homojen

faz reaksiyonu ile kitosanın deasetillenme derecesi değiştirilmekte, kimyasal modifikasyon yöntemi ile ise kitosana hidrofilik grup eklenmektedir.

Trimetil kitosan, trietil kitosan, izobütil kitosan, kitosanın monosakkarit ve dissakkarit türevleri suda çözünür kitosan türevleridir (Sieval vd. 1998, Thanou vd. 2000, Yang vd. 2002, Avadi vd. 2003, Miao vd. 2006, Li vd. 2007). Trimetil kitosan kitosanın kısmi olarak kuaternize türevidir. Kitosanda asetil grupları olduğu için ve komşu kuaterner amin grupları üzerine eklenen metil gruplarının sterik etkisi nedeniyle kitosanın tamamen kuaternizasyonu olanaksızdır. Trimetil kitosan sentezi kitosanın metillenmesine dayanır. Metilleme nükleofilik süstitüsyon ile gerçekleştirilmektedir (Mao vd. 2007).

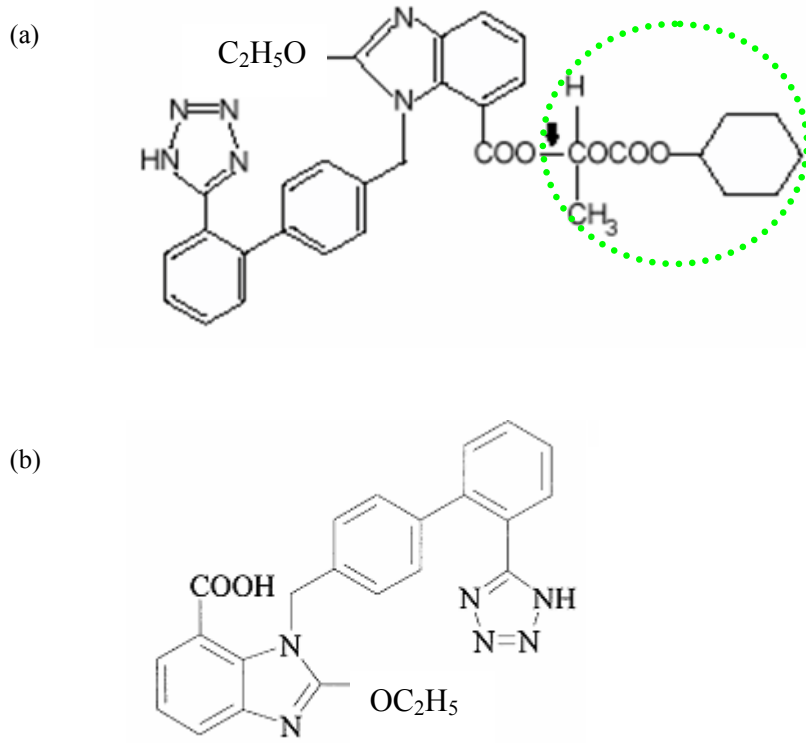
Sürelî yayınlarda suda çözünür kitosan türevlerinin suda iyi çözünmeyen ilaçların çözünürlük ve biyoyararlanımını artırdığı belirlenmiştir (Portero vd. 1998, Kim vd. 2006a). Merisko-Liversidge vd. (2003) ise yaptıkları çalışmada suda çözünmeyen ilacın boyutu azaldıkça çözünürlük ve biyoyararlanımının arttığını saptamıştır.

Sürelî yayınlarda suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının suda çözünen nanokitosana yüklendiği ve çözünürlüğünün artırılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doktora çalışması; *candesartan-cilexetil* ilacının nanokitosana yüklenmesi ve çözünürlüğünün artırılması konusunda ilk araştırmadır.

Candesartan-cilexetil ($C_{33}H_{34}N_6O_6$, $M_A=610.67$ g/gmol) yüksek tansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta ve mide bağırsak sisteminde hidrolize uğrayarak *candesartana* ($C_{24}H_{20}N_6O_3$, $M_A=440.45$ g/gmol) dönüşmektedir. *Candesartan* (AT1 reseptör blokörü) kan basıncını düşürür ve kalp krizi ve böbrek rahatsızlığı gibi hastalıkları önler (<http://www.rxlist.com/atacand-drug.htm>).

Şekil 1.3'de kimyasal yapıları verilen *candesartan-cilexetil* siklohegzil karbonat esteri *candesartan* ise karboksilik asittir ve tetrazol, bifenil, benzimidazol gruplarını içermektedir. *Candesartan-cilexetili* çözmek için metanol, asetonitril ve DMSO

(Dimetil sülfoksit) gibi çözücüler kullanılmaktadır (Miyabashi vd. 1996, Stenhoff vd. 1999, Cagigal vd. 2001).



Şekil.1.3 a. *Candesartan-cilexetil*, b. *candesartan*ın kimyasal yapıları

Candesartan-cilexetil suda iyi çözünmeyen özeliği nedeniyle düşük biyoyararlanım (% 15) gösterir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Candesartan>). *Candesartan-cilexetil* ağızdan alındıktan sonra bağırsakta esterazlar tarafından hidrolize uğrayarak aktif şekli *candesartana* dönüşür. In vitro çalışmalarda ise *candesartan-cilexetil* aktif hale geçemediği için doğrudan suda çözünen *candesartan* kullanılır.

*Candesartan-cilexetil*in arap zankı ile süspansiyonu sıçanlarda kan şekerini % 20 oranında artırmıştır. Bu nedenle arap zankı *candesartan-cilexetil* için iyi bir taşıyıcı değildir (Turan 2002).

Bu doktora çalışmasında suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının suda çözünen nanokitosan ile çözünürlüğünün artırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sürelili yayınlarda metilleme adım sayısı, süresi değiştirilerek ve farklı baz kullanarak trimetil kitosan sentezine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Sieval vd. (1998), trimetil kitosanı adım sayısını değiştirerek tek, iki, üç adımda metilleme ile sentezlemiştir. Suda çözünür trimetil kitosan sentezi için en uygun yöntemin iki adımlı metilleme yöntemi olduğunu göstermiştir. Kuartinizasyon derecesi tek adımlı metilleme ile % 35, iki adımlı metilleme ile % 60, 3 adımlı metilleme ile ise % 85 olarak belirlenmiştir. Adım sayısı arttıkça kuartinizasyon derecesinin arttığı saptanmıştır (Snyman vd. 2002). Metilleme süresi 45 dk (Hamman vd. 2002), 75 dk (Thanou vd. 1999) ve 90 dk (Chen vd. 2007) şeklinde değiştirilerek trimetil kitosan sentezlenmiştir. Süre arttıkça kuartinizasyon derecesinin arttığı belirlenmiştir (Jintapattanakit vd. 2008). Trimetil kitosanın sentezinde baz olarak sodyum hidroksit kullanıldığında adım sayısı arttıkça kuartinizasyon derecesinin % 21'den %59'a arttığı saptanmıştır. Sodyum hidroksit yerine dimetil amin piridin kullanıldığında ise adım sayısı arttıkça kuartinizasyon derecesinin azaldığı gösterilmiştir (Hamman ve Kotze 2001).

Trimetil nanokitosanın sentezine yönelik süreli yayınlarda tripolifosfat anyonları ile katyonik trimetil kitosan iyonik çapraz bağlanmıştır (Amidi vd. 2006, 2007, Chen vd. 2007). Ticari suda çözünür kitosan türevi ile de iyonik jelleşme tekniği kullanarak suda çözünür nanokitosan sentezlenmiştir (Vila vd. 2004).

Sürelili yayınlarda suda iyi çözünmeyen ilaçların polimerlere yüklenmesinde genellikle ultrasonik etki, çözücü buharlaştırma, diyaliz ve iyonik jelleşme yöntemleri kullanılmaktadır (Bodmeir and Paeratakul 1989, Lee vd. 2004, Yokoyoma vd. 2004, Zhang vd. 2004, Francis vd. 2005, Kim vd. 2006, Satturwar vd. 2007, Yao vd. 2007).

Suda iyi çözünmeyen ilaçların kitosan ve suda çözünen kitosan türevlerine yüklendiği az sayıda çalışma (Portero vd. 1998, Kim vd. 2006a, b, Yao vd. 2007, Zhou vd. 2009) vardır. Portero vd. (1998), ticari suda çözünür kitosanın (kitosan glutamat) ve suda çözünmeyen kitosanın (kitosan bazı) suda iyi çözünmeyen *nipedifin* ilacının (kas

kasılmasına karşı kullanılır) çözünürlüğüne etkisini incelemiştir. Bu amaçla kitosan glutamat ve kitosana *nipedifin* ilacının fiziksel karışımını, ezilmiş karışımını, yoğrulmuş karışımını ve katı dağılımını hazırlamıştır. Kitosana *nipedifin* ilacının katı dağılımının hazırlanmasında çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kitosan çözeltisi ve ilaç çözeltisi karıştırılıp kurutulmaktadır. *Nipedifin* ilacının çözünürlüğünü artırmada en başarılı yöntemin çözücü buharlaştırma yöntemi, en başarısız yöntemin ise fiziksel karıştırma olduğu saptanmıştır. Kitosan glutamat *nipedifin* ilacının çözünürlüğünü kitosana göre daha çok artırmıştır.

Trimetil kitosanın suda iyi çözünmeyen lipofilik *siklosporin A* (kalp transplantasyonu sonrası tedavide, behçet hastalığı tedavisinde kullanılır) ilacının çözünürlüğüne etkisi araştırılmıştır (Zhou vd. 2009). Bu amaçla trimetil kitosana *siklosporin A* ilacının fiziksel karışımı, ezilmiş karışımı ve katı dağılımı hazırlanmıştır. Katı dağılımının hazırlanmasında kullanılan çözücü buharlaştırma yöntemi *siklosporin A* ilacının çözünürlüğünü diğer yöntemlere göre daha çok artırmıştır.

Ticari suda çözünür kitosanın suda iyi çözünmeyen *retinol* ilacının (deri hastalıklarının tedavisinde kullanılır) çözünürlüğüne etkisi incelenmiştir (Kim vd. 2006a). İlaç çözeltisi suda çözünür kitosan çözeltisine ultrasonik etki ile damlatılarak *retinol* ilacı suda çözünür kitosana yüklenmiştir. Polimer: ilaç (w/w) karışım oranının *retinol* ilacının çözünürlüğüne etkisi UV analizi ile incelenmiş ve ticari suda çözünür kitosanın *retinol* ilacının çözünürlüğünü sudaki çözünürlüğüne göre 1600 kat artırdığı saptanmıştır.

Kim vd. (2006b) yaptıkları başka bir çalışmada suda iyi çözünmeyen bir ilaç olan *retinoik asiti* (deri hastalıklarının tedavisinde kullanılır) ticari suda çözünür kitosana (düşük molekül ağırlıklı) ultrasonik etki yöntemi ile yüklemiş yükleme etkinliğini % 90 olarak belirlemiştir. Yao vd. (2007) ise suda iyi çözünmeyen *paclitaxel* ilacını (kanser tedavisinde kullanılır) polietilen glikol oktil sülfat kitosana diyaliz yöntemi ile yüklemiş ve yükleme etkinliğini %70-85 aralığında saptamıştır.

Suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ve aktif şekli suda çözünen *candesartanın* kitosan ve suda çözünen nanokitosana yüklendiği bir çalışmaya süreli yayınlarda rastlanmamıştır. Satturwar vd. (2007), *candesartan-cilexetili* polietilen glikol A-B blok kopolimerine diyaliz ve çözücü buharlaştırma yöntemleri ile yüklemiş (A, B: t-butil metakrilat, izo-butil akrilat, n-butil akrilat, propil metakrilat) ve yükleme etkinliğini % 60-90 aralığında saptamıştır.

Süreli yayınlarda trimetil nanokitosan ve trimetil kitosanın hücre canlılığına etkisi incelenmiştir (Kean vd. 2005, Amidi vd. 2006, Sayın vd. 2008). Trimetil kitosan kültür hücresi (maymun böbrek fibroblastı, COS-7) ile 6 h süre ile etkileştirilmiştir (Kean vd. 2005). Trimetil kitosan derişimi (0.1-1000µg/ml) arttıkça hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir.

Trimetil nanokitosan kültür hücresi (Calu-3) ile etkileştirilmiş ve nanokitosanın hücre canlılığını olumlu etkilediği gösterilmiştir. Sıçan burun epitel hücreleri FITC albumin yüklü trimetil nanokitosan ile inkübe edilip konfokal mikroskobu ile gözleendiğinde ışıklı hücreler saptanırken FITC albümin çözeltisi ile inkübe edildiğinde ışık görülmemiştir. FITC albümin yüklü trimetil nanokitosan sıçan burun epitel hücreleri tarafından alınmıştır (Amidi vd. 2006).

Trimetil kitosan ve karboksi metil kitosanın hücre (sıçan yumurtalık hücresi) canlılığına etkisi incelenmiştir (Sayın vd. 2008). Karboksi metil kitosanın hücre canlılığını olumlu trimetil kitosanın ise olumsuz etkilediği saptanmıştır.

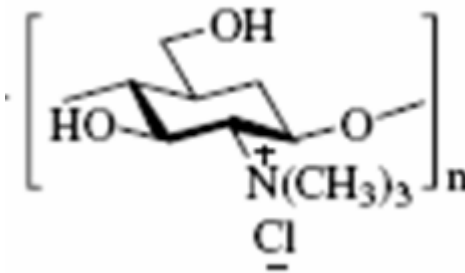
Trimetil kitosan çok sayıda çalışmada peptidler gibi düşük oral biyoyararlanımı olan hidrofilik ilaçların emilimini artırmak için kullanılmıştır (Thanou vd. 2000a, b, 2001, Plessis vd. 2010). Trimetil kitosanın bağırsak epitelinden emilimi sınırlı olan *octreotid* peptidi (bağırsak tümör tedavisinde kullanılır) ile karışımı kültür hücresi (Caco-2) ile etkileştirilmiştir. Trimetil kitosan varlığında bağırsak epitelinden *octreotid* emiliminin arttığı belirlenmiştir (Thanou vd. 2000a).

Buserilin peptidi trimetil kitosan çözeltisi ile karıştırılarak sıçana verildiğinde peptid ilacının biyoyararlanımının arttığı saptanmıştır (Thanou vd. 2000b).

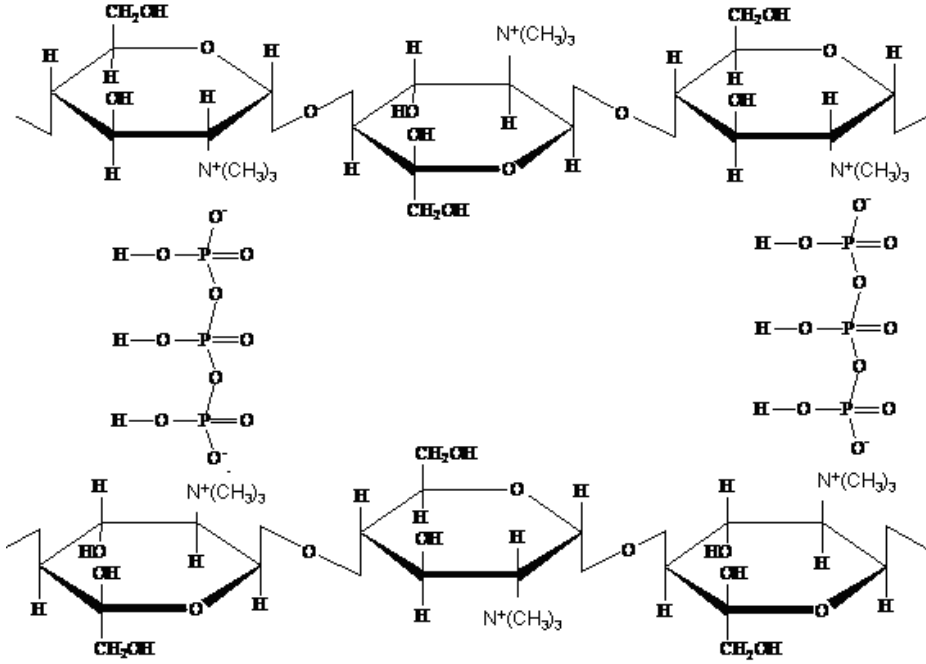
Biyoyararlanım değeri düşük *salmon kalsitonin* peptidi trimetil kitosan ile sıçanlara burundan verildiğinde salmon kalsitoninin maksimum plazma derişiminin 6 kat arttığı bulunmuş ve trimetil kitosanın peptidin biyoyararlanımını artırdığı saptanmıştır (Plessis vd. 2010).

Suda çözünür kitosan türevlerinden oktil orto sülfat kitosan ile yapılan bir çalışmada kanser tedavisinde kullanılan suda iyi çözünmeyen *paclitaxel* ilacının yan etkilerini azaltmak amacıyla *paclitaxel* yüklü oktil orto sülfat kitosan miseli hazırlanmıştır (Zhang vd. 2008). *Paclitaxel* yüklü misel tümöre karşı *paclitaxele* eşdeğer bir etki göstermiştir. İlaç yüklü misel ile ilaca göre daha düşük bir plazma alanı (3.6 kat daha az) bulunmuş ve miselin ilacın biyoyararlanımını artırdığı belirlenmiştir.

Bu doktora çalışmasında süreli yayın bilgileri değerlendirilerek trimetil kitosan iki adımlı metilleme yöntemi (Sieval vd. 1998) ile trimetil nanokitosan ise iyonik jelleşme tekniği (Amidi vd. 2006) ile sentezlenmiş ve FTIR, NMR, SEM, TEM, DLS (Dynamic Light Scattering) analizleri ile karakterize edilmiştir. Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosanın kimyasal yapıları sırasıyla Şekil 2.1 ve Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.1 Trimetil kitosanın kimyasal yapısı (Ding vd. 2006)



Şekil 2.2 Trimetil nanokitosanın kimyasal yapısı

İkinci aşamada trimetil kitosan ve trimetil nanokitosana suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacı ve karşılaştırma amacıyla suda çözünen *candesartan* (*candesartan-cilexetilin* aktif formu) iki farklı teknik ile (ultrasonik etki ve iyonik jelleşme) yüklenmiştir. *Candesartan-cilexetil* yüklü örnekler ve *candesartan* yüklü örnekler HPLC, FTIR ve AFM analizleri ile karakterize edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında trimetil kitosan, trimetil nanokitosan, arap zamkı ve ticari suda çözünür kitosanın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi *in vitro* çözünürlük deneyleri ile araştırılmıştır.

Dördüncü aşamada trimetil nanokitosanın kalp kası hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Deneyler arap zamkı ile tekrarlanmış ve sonuçlar trimetil nanokitosan ile edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın son aşamasında trimetil kitosan ve trimetil nanokitosaanın hücreye (memeli fibroblast; LTK8) fura boyasının girişine etkisi floresan spektrofotometre analizi ile incelenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu doktora çalışmasında, suda iyi çözünen nanokitosan (trimetil nanokitosan) sentezlenmiş ve suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil*in çözünürlüğünü artırmak için incelenmiştir. *Candesartan-cilexetil*in suda çözünen şekli olan *candesartan* ise karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

3.1 Materyal

% 91 deasetilasyon derecesinde, 154 mikron büyüklüğünde kitosan (Chitoclear marka-Primex-İzlanda) trimetil kitosan sentezi için kullanılmıştır. % 99.9 saflıkta *candesartan-cilexetil* ve bunun suda çözünen şekli olan *candesartan* (Astra Zeneca-İsveç) yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Trimetil kitosan ile karşılaştırma amacıyla kullanılan ticari suda çözünür kitosan türevi kitosanın HCl tuzudur (Protasan UP CL 214 marka-Novamatrix-Norveç). Ticari suda çözünür kitosanın deasetilasyon derecesi % 90'dan büyük, ortalama molekül ağırlığı 1500-400 kDa, viskozitesi 20-200 mPas'dir. *Candesartan-cilexetil*in önceki uygulamalarında kullanılan arap zamkı karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. Arap zamkı (Riedel, 37AB3915) akasya ağaçlarından elde edilen suda çözünürlüğü (% 50) oldukça yüksek olan dallanmış bir polimerdir.

3.2 Yöntem

Yöntem suda çözünen nanokitosanın sentez ve karakterizasyonu, ilaç yükleme ve ilaç yüklü örneklerin karakterizasyonu, nanokitosanın ilaç çözünürlüğüne etkisinin saptanması, nanokitosanın hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi, nanokitosanın hücreye fura boyasının girişine etkisinin incelenmesi aşamalarından oluşmaktadır.

3.2.1 Suda çözünen nanokitosanın sentezi ve karakterizasyonu

Suda çözünen nanokitosan sentezi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada kitosandan iki adımlı metilleme (Sieval vd. 1998) yöntemi ile suda çözünür kitosan (trimetil kitosan) sentezlenmiştir. İkinci aşamada ise suda çözünür kitosandan iyonik jelleşme (Amidi vd. 2006) tekniği ile suda çözünen nanokitosan (trimetil nanokitosan) hazırlanmıştır. Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosan FTIR, NMR, SEM, TEM ve DLS analizleri ile karakterize edilmiştir.

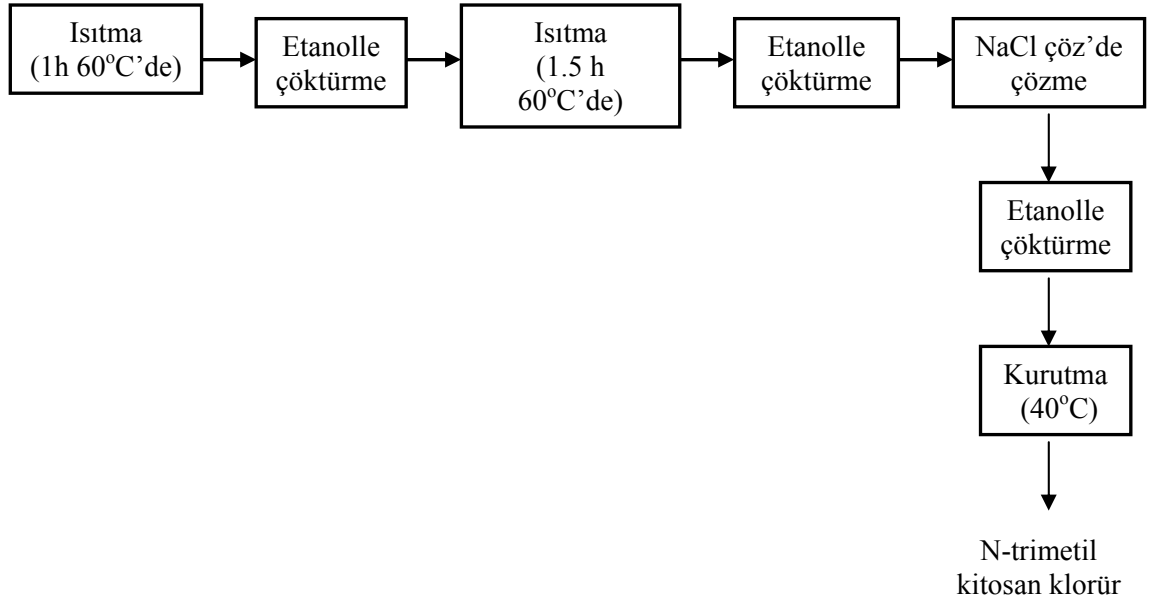
3.2.1.1 Suda çözünen nanokitosanın sentezi

3.2.1.1.1 Trimetil kitosanın (TMC) sentezi

Ticari suda çözünür kitosanın (10 g'ı 600 \$) fiyatı oldukça pahalı olduğu için trimetil kitosan sentezlenmiştir. Trimetil kitosan Sieval vd. (1998)'in yöntemine göre sentezlenmiştir. Deney sistemi Şekil 3.1'de görülmektedir. 2 g kitosan, 4.8 g sodyum iyodür, 80 ml 1-metil-2-pirolidon üç ağızlı balona konulmuştur. Balonun ağızlarına liebig yoğuşturucusu ve termometre yerleştirilmiştir. 11 ml %15 sodyum hidroksit çözeltisi ve 11.5 ml metil iyodür eklenmiştir. Balon sabit sıcaklıkta su banyosuna yerleştirilerek karışım 60°C'de 1 saat süreyle karıştırılmıştır. Ürün 12 dk süreyle etanolle çöktürülerek santrifüjle ayrılmıştır. 1. adımdan elde edilen ürün 80 ml 1-metil-2-pirolidonda çözülerek 60°C'ye ısıtılmıştır. 4.8 g sodyum iyodür, 11 ml % 15 sodyum hidroksit çözeltisi ve 7 ml metil iyodür eklenerek karışım hızla karıştırılmıştır. 30 dakika süreyle karışım 60°C'de ısıtılmıştır. 2 ml metil iyodür ve 0.6 g sodyum hidroksit pelleti eklenmiştir. 1 saat süreyle 60°C'de karıştırarak ısıtma sürdürülmüştür. Ürün 12 dk süreyle etanolle çöktürülerek santrifüjle ayrılmış ve 40 ml %10 sodyum klorür çözeltisinde çözülerek trimetil kitosan iyodürdeki iyodür ile sodyum klorürdeki klorür yer değiştirmiştir. Trimetil kitosan klorür 12 dk süreyle etanolle çöktürülerek santrifüjle ayrılmıştır. Trimetil kitosan klorür 40°C'de vakumda kurutulmuştur (Şekil 3.2).

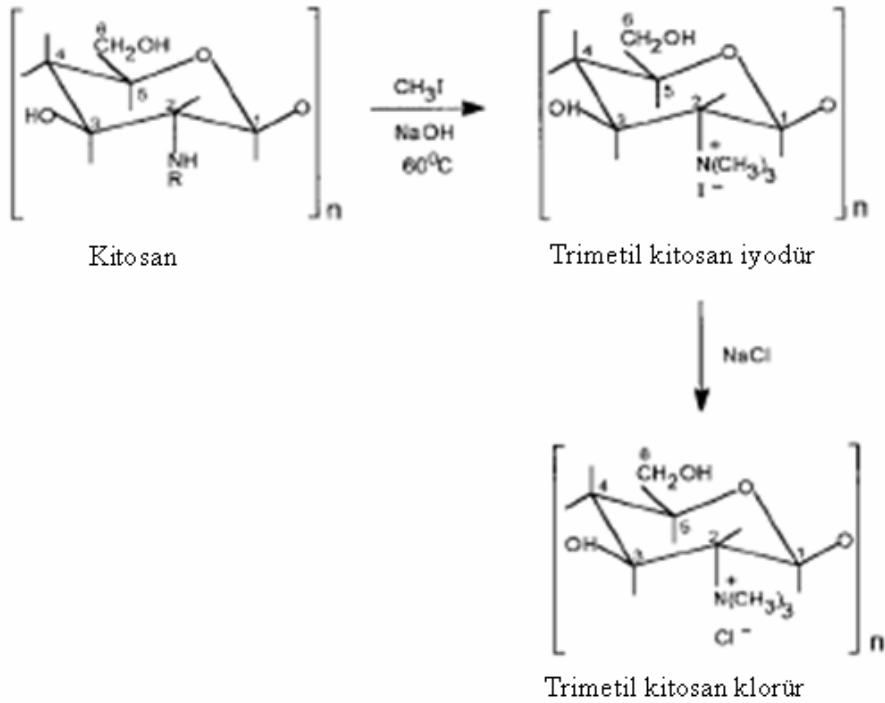


Şekil 3.1 Trimetil kitosan sentezinde kullanılan deney sistemi



Şekil 3.2 Trimetil kitosan sentez aşamaları (Sieval vd. 1998)

Trimetil kitosan sentez mekanizması Şekil 3.3’de görülmektedir. Kitosanın sodyum hidroksit bazı varlığında 60°C’de metil iyodür ile metillenmesi ile oluşan trimetil kitosan iyodür, sodyum klorür çözeltisi ile etkileştirilerek trimetil kitosan klorür elde edilir. Kitosandaki primer amin grupları metil grupları ile hidrojen atomlarının yer değişimi ile kuaterner amin gruplarına dönüşür. Bu çalışmada %91 deasetilasyon derecesinde kitosan kullanılmıştır. Kitosanın ikinci karbon atomuna bağlı olan asetamid grubundaki R fonksiyonel grubunun % 91’ini hidrojen atomları, % 9’unu ise asetil grupları oluşturmaktadır (Hamman ve Kotze 2001).

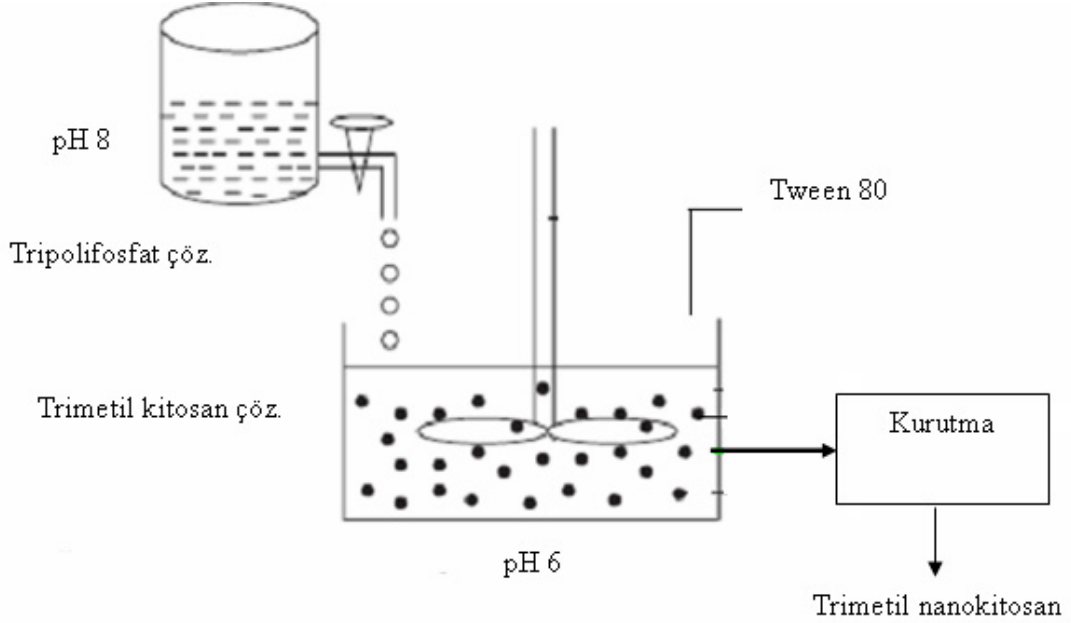


Şekil 3.3 Trimetil kitosan sentez mekanizması

3.2.1.1.2 Trimetil nanokitosan sentezi

Trimetil nanokitosan Amidi vd. (2006)’nin yöntemine göre sentezlenmiştir. 10 mg trimetil kitosan klorür 5 ml suda çözülmüş ve 0.05 ml Tween 80 eklenmiştir (pH: 6). 1 mg/ml derişiminde 1.8 ml tripolifosfat çözeltisi hazırlanmış ve pH’ı 8 olarak ölçülmüştür. Trimetil kitosan klorür çözeltisi ortam sıcaklığında karıştırılarak

tripolifosfat çözeltisi yavaşca damla damla eklenmiş ve pH 7 olarak ölçülmüştür. Trimetil nanokitosan vakumda kurutulmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Trimetil nanokitosaanın sentez aşamaları

3.2.1.2 Suda çözünen nanokitosaanın karakterizasyonu

3.2.1.2.1 FTIR analizi

3 mg kitosaan/trimetil kitosaan/trimetil nanokitosaan ve 150 mg KBr ile pelletler hazırlanmış ve Shimadzu 8400S markalı cihazda analiz edilmiştir. FTIR analizi bölümümüzdeki Nanoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.1.2.2 NMR analizi

¹H NMR'lar kitosan için D₂O/HCl'de (100:1 v/v) ve trimetil kitosan için D₂O'da (10 g/L) 80°C'de 400 MHz Bruker DPX-400, Yüksek Performans Dijital FT-NMR spektrometre kullanılarak TÜBİTAK ATAL'da yapılmıştır.

3.2.1.2.3 SEM analizi

Kitosan ve trimetil kitosan altınla kaplanarak SEM görüntüleri çekilmiştir. SEM analizi Quanta 400F Field Emission Taramalı Elektron Mikroskopunda ODTÜ Merkez Lab'da yapılmıştır.

3.2.1.2.4 TEM analizi

1 mg trimetil nanokitosaanın 3 ml etanolde süspansiyonu hazırlanarak 2 dk süreyle ultrasonik banyoya tutulmuştur. Mikrogrid üzerine karbon film yerleştirilerek 1-2 damla süspansiyon damlatılmış ve kuruduktan sonra analiz edilmiştir. Örneğin 17 farklı yerinden görüntüler alınmıştır. Her bir fotoğraftaki tüm tanecikler sayılmış ve çapları ayrı ayrı kaydedilmiştir. Tanecik sayısı ve çap değerleri kullanılarak trimetil nanokitosaanın boyut dağılımı çıkarılmıştır. TEM analizi FEI Tecnai G2 Geçirmeli Elektron Mikroskopunda Ankara Üniversitesi Nükleer Araştırma Merkezi Elektron Mikroskop biriminde yapılmıştır.

3.2.1.2.5 DLS analizi

Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosaanın etanolde ve 5 mM derişimdeki HEPES (N-(2-Hidroksietil) piperazin-N-(2-etan sülfonik asit) tampon çözeltisinde (pH:7.4) süspansiyonları ve suda çözeltileri hazırlanarak DLS analizleri yapılmıştır. Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosaanın dağılımlarını sağlamak amacıyla ultrasonik prob ve ultrasonik banyo ile ses etkisi verilmiştir. Taneciklerin büyüklük dağılımlarını

belirlemek için Zeta Sizer (MALVERN Zetasizer Nano Series Nano-S) cihazı kullanılmıştır. DLS analizleri Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünde yapılmıştır.

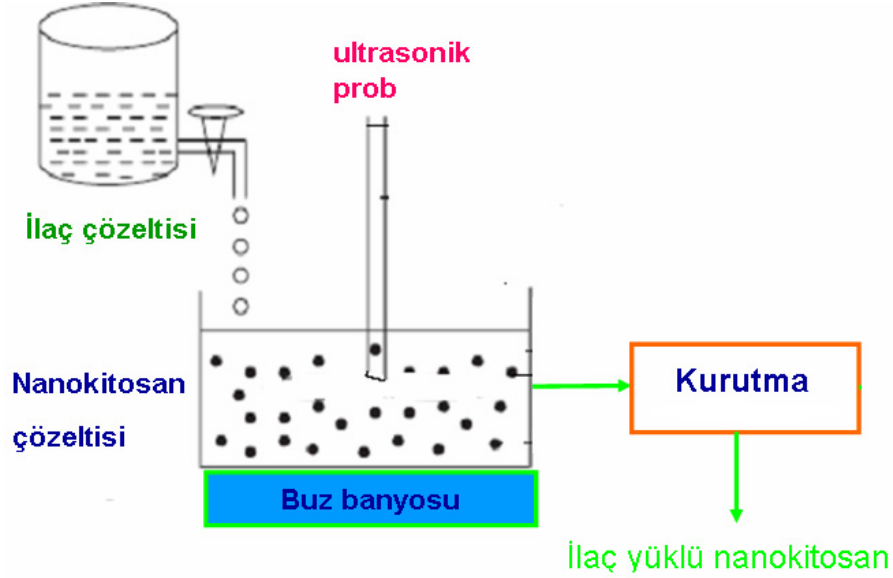
3.2.2 İlaç yükleme ve ilaç yüklü örneklerin karakterizasyonu

3.2.2.1 İlaç yükleme

Suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ve karşılaştırma amacıyla *candesartan-cilexetil*in aktif şekli olan *candesartan* suda çok iyi çözünen nanokitosana iki farklı yöntemle (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) yüklenmiştir.

3.2.2.1.1 Ultrasonik etki yöntemi

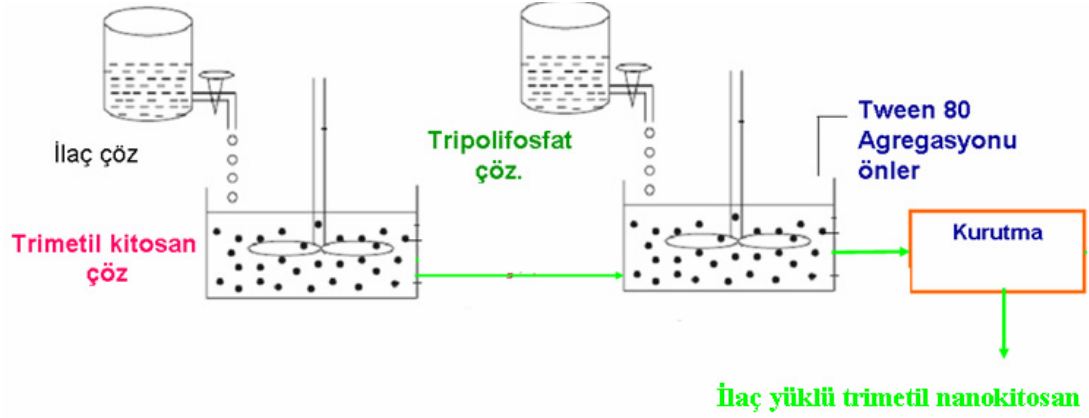
Candesartan-cilexetil ve karşılaştırma amacıyla *candesartan* trimetil nanokitosana Kim vd. 2006'in yöntemine (Şekil 3.5) ve Satturwar vd. 2007'in *candesartan-cilexetili* yüklemeye kullandığı miktarlara göre yüklenmiştir. *Candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin hazırlanmasında trimetil kitosan ya da trimetil nanokitosan (5 mg) suda (5 ml), *candesartan-cilexetil* ilacı (1 mg) ise DMSO'da (200 µl) çözülmüştür. İlaç çözeltisi trimetil kitosan ya da trimetil nanokitosan çözeltisine bir buz banyosu üzerinde ultrasonik etki ile damlatılmış, karışım vakum etüvünde düşük basınçta kurutularak DMSO ve su buharlaştırılmıştır. Yükleme işlemi *candesartan* ile tekrarlanmıştır.



Şekil 3.5 Ultrasonik etki ile ilaç yükleme

3.2.2.1.2 İyonik jelleşme yöntemi

Candesartan-cilexetil ve karşılaştırma amacıyla *candesartan* trimetil nanokitosana Amidi vd. 2006'nin yöntemine (Şekil 3.6) ve Satturwar vd. 2007'in *candesartan-cilexetili* yüklemede kullandığı miktarlara göre yüklenmiştir. *Candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin hazırlanmasında trimetil kitosan (5 mg) suda (5 ml), *candesartan-cilexetil* (1 mg) ise DMSO'da (200 µl) çözülmüştür. İlaç çözeltisi trimetil kitosan çözeltisine karıştırılarak damlatılmış, agregasyonu önlemek amacıyla 0,05 ml Tween 80 eklenmiştir. Karışım 0,9 ml 1 mg/ml tripolifosfat çözeltisi ile iyonik çapraz bağlanmış, vakum etüvünde düşük basınçta kurutularak DMSO ve su buharlaştırılmıştır. Yükleme işlemi *candesartan* ile tekrarlanmıştır.



Şekil 3.6 İyonik jelleşme yöntemi ile ilaç yükleme

3.2.2.2 İlaç yüklü örneklerin karakterizasyonu

İlaç (*candesartan-cilexetil*) yüklü örneklerin HPLC analizi ile yükleme etkinlikleri, AFM analizi ile tane boyutları belirlenmiştir. FTIR analizi ile ise ilaç ve polimer arasındaki etkileşimler araştırılmıştır.

3.2.2.2.1 HPLC analizi

Sürelî yayınlarda *candesartan-cilexetil*in HPLC kromatogramı bulunmaktadır; ancak *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosanın ya da herhangi bir kitosan türevinin HPLC kromatogramına rastlanmamıştır. Subba Rao vd. 2007'nun ve Qutab vd. 2007'in *candesartan-cilexetil* için geliştirdikleri HPLC yöntemlerine dayanarak TÜBİTAK ATAL'la birlikte ilaç (*candesartan-cilexetil*) yüklü örneklerin analizi için bir HPLC metodu geliştirilmiştir. HPLC analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Kolon tipi: Waters μ Bondapak marka CN RP 125A

Kolon dolgu maddesi çapı: 10 μ m

Kolon çap ve uzunluğu: 3.9x150 mm

Kolon özeliği: Siyano (CN) fonksiyonel gruplarına sahip

Hareketli faz: 20 mM derişimdeki sodyum dihidrojen fosfat monohidrat tampon çözeltisinin pH'ı trifloroasetik asitle 3'e ayarlandı. 500 ml tampon çözeltisi ve 500 ml asetonitril çözücüsü karıştırıldı.

Hareketli fazın akış hızı: 1 mL/dk

Sıcaklık: 27°C

Dedektör: UV

Candesartan-cilexetil dalga boyu: 210 nm

Enjeksiyon Hacmi: 10 µL

Cihaz: AGILENT 1100 series LC

3.2.2.2.2 FTIR analizi

3 mg ilaç yüklü örnek ya da ilaç ve 150 mg KBr ile pelletler hazırlanmış ve Shimadzu 8400S markalı cihazda analiz edilmiştir. FTIR analizi bölümümüzdeki Nanoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.2.2.3 AFM analizi

İlaç yüklü örneklerin atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile yüzey karakterizasyonları yapılmıştır. Bunun için NTMDT Solver Pro Atomik Kuvvet Mikroskobu kullanılmıştır.

3.2.3 Nanokitosanın İlaç Çözünürlüğüne Etkisinin Belirlenmesi

Suda çözünen nanokitosanın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetilin* çözünürlüğüne etkisi 2 farklı in vitro çözünürlük deneyi ile incelenmiştir. I. deneyde trimetil nanokitosan çözeltisi ve ilaç (*candesartan-cilexetil*) çözeltisi 37°C'de 1-3 gün süreyle karıştırılmış, elde edilen süzüntü UV ile analiz edilmiştir. II. deneyde ilaç trimetil nanokitosana ultrasonik etki yöntemi ile yüklenmiş ve ilaç yüklü örnekler HPLC ile analiz edilmiştir. Her iki çözünürlük deneyi trimetil kitosan, arap zankı ve

ticari suda çözünür kitosan ile tekrarlanmış ve sonuçlar trimetil nanokitosan ile karşılaştırılmıştır.

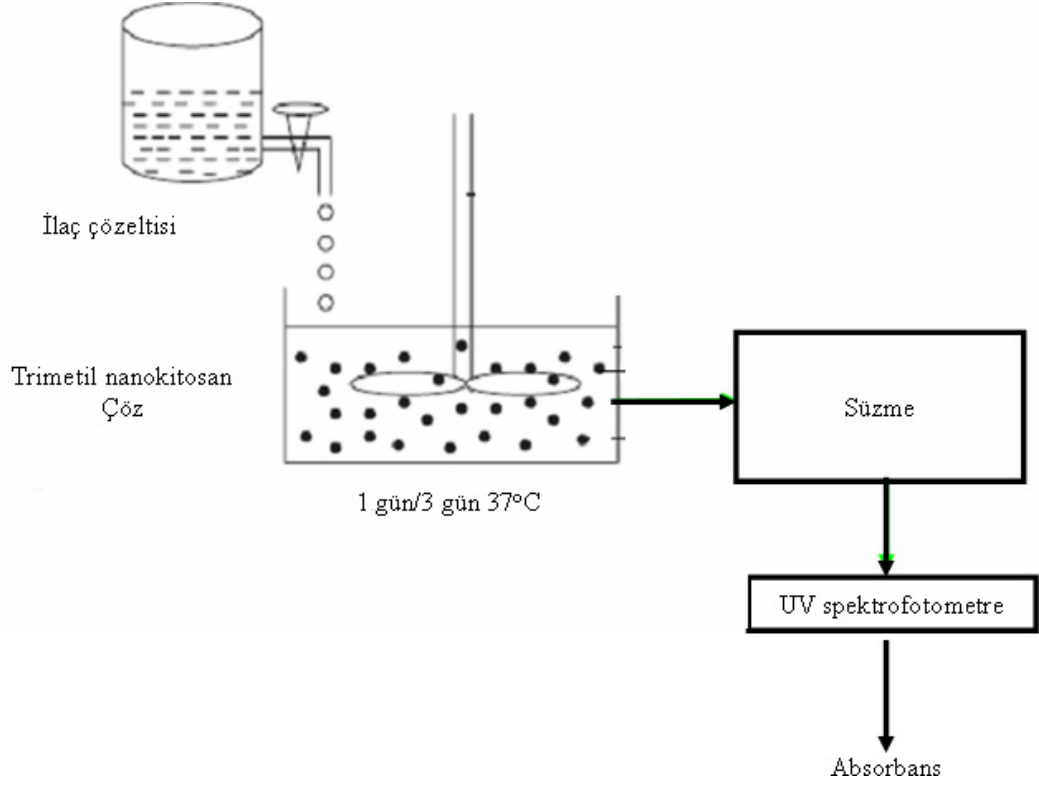
3.2.3.1 Nanokitosanın ilaç çözünürlüğüne etkisinin UV ile belirlenmesi

I. deney Kim vd. 2006'in yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Trimetil nanokitosan (0, 20, 40, 60, 80 mg) suda (10 ml), *candesartan-cilexetil* (1 mg) ise metanolde (1 ml) çözülmüştür. İlaç çözeltisi ve trimetil nanokitosan çözeltisi 37°C'de 1 ve 3 gün süre ile karıştırılmış ve süzülerek (Süzme işlemi Whatman No 2 kodlu süzgeç kağıdı ile süzme düzeneğinde gerçekleştirildi.) ilacın çözünmeyen kısmı ayrılmıştır. Süzüntü UV analizi için saklanmıştır.

UV analizleri *candesartan-cilexetil*in 400 nm'den küçük dalga boyu nedeniyle kuvars küvet ile gerçekleştirilmiştir. İlaç ve trimetil kitosanın stok çözeltileri hazırlanmış, spektrumları alınmış, en yüksek absorbans verdiği dalga boyları saptanmış, kalibrasyon doğruları çizilmiş ve süzüntü UV ile analiz edilmiştir.

0,03 mg/ml derişiminde ilaç stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti metanolle 6, 7.5, 10, 15, 30 kez seyreltilerek farklı derişimlerde (0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001 mg/ml) ilaç çözeltileri hazırlanmıştır. İlacın spektrumu metanol referansı ile alınmış ve en yüksek absorbansın okunduğu dalga boyu 203,5 nm olarak saptanmıştır. En yüksek derişimden başlamak üzere hazırlanan ilaç çözeltilerinin absorbans değerleri okunmuştur. Derişim değerlerine karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirilerek ilacın kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

2 mg/ml derişiminde trimetil kitosan stok çözeltisi hazırlanmış ve 6 kez su ile seyreltilmiştir. Trimetil kitosanın suda spektrumu alınmış ve en yüksek absorbansın okunduğu dalga boyu 226,5 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7 Çözünürlüğün UV ile saptanması

UV analizi için saklanan süzüntü trimetil nanokitosan, çözünen *candesartan-cilexetil*, su ve metanol içermektedir. Süzüntü su ve metanol karışımını içerdiğinden UV analizinde referans olarak su, metanol, su-metanol (su:metanol=10:1) karışımı denenmiştir. Süzüntü her bir referansla doğrudan analizlenmiş, çok yüksek absorbans değerleri okunması nedeniyle süzüntüyü UV ile analizlemeden önce seyreltmek gerekmiştir. Metanolün referans olduğu durumda süzüntü metanolla seyreltilmiş ve ilaç piki gözlenmiştir. Suyun referans olduğu durumda süzüntü su ile, su-metanol karışımının referans olduğu durumda ise süzüntü su-metanol karışımı ile seyreltilmiş ve ilaç piki gözlenmemiştir. Bu nedenle süzüntü metanolla seyreltilmiş (40 kez) ve metanol referans olarak kullanılmıştır.

UV spektrofotometre ile absorbans değerleri 202.5 nm'de ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerinden ilacın kalibrasyon doğrusu yardımıyla çözünürlük değerlerine geçilmiş, sonuçlar 40 ile çarpılarak süzüntüdeki ilacın çözünürlüğü bulunmuştur. Bu değer ilacın sudaki çözünürlük değerine bölünerek trimetil nanokitosanın *candesartan-*

cilexetilin sudaki çözünürlüğüne etkisi değerlendirilmiştir. Her bir çözünürlük deneyinde ilaç miktarı sabit (1 mg) tutulmuş, trimetil nanokitosan miktarı (0, 20, 40, 60, 80 mg) ise artırılmıştır.

Trimetil nanokitosan yerine sırasıyla trimetil kitosan, arap zankı ve ticari suda çözünür kitosan kullanarak deney tekrarlanmış ve bulgular trimetil nanokitosan ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

3.2.3.2 Nanokitosanın ilaç çözünürlüğüne etkisinin HPLC ile belirlenmesi

II. deney *candesartan-cilexetilin* trimetil nanokitosana ultrasonik etki ile yüklenmesi ve HPLC ile analiz edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Candesartan-cilexetil trimetil nanokitosana ultrasonik etki yöntemine göre yüklenmiştir. Trimetil nanokitosan (0, 20, 40, 60, 80 mg) suda (10 ml), *candesartan-cilexetil* (2 mg) ise metanolde (1 ml) çözülmüştür. İlaç çözeltilisi trimetil nanokitosan çözeltilisine bir buz banyosu üzerinde ultrasonik etki ile damlatılmış, karışım vakum etüvünde düşük basınçta kurutularak metanol ve su buharlaştırılmıştır.

Candesartan-cilexetil trimetil kitosan, arap zankı ve ticari suda çözünür kitosana (Kitosanın HCl tuzu) aynı yöntemle yüklenmiştir. İlaç yüklü trimetil kitosan, trimetil nanokitosan, arap zankı ve ticari suda çözünür kitosan örnekleri HPLC analizi için saklanmıştır. Hazırlanan örneklerin ilaç yükleme oranları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Hazırlanan örneklerin ilaç yükleme oranları

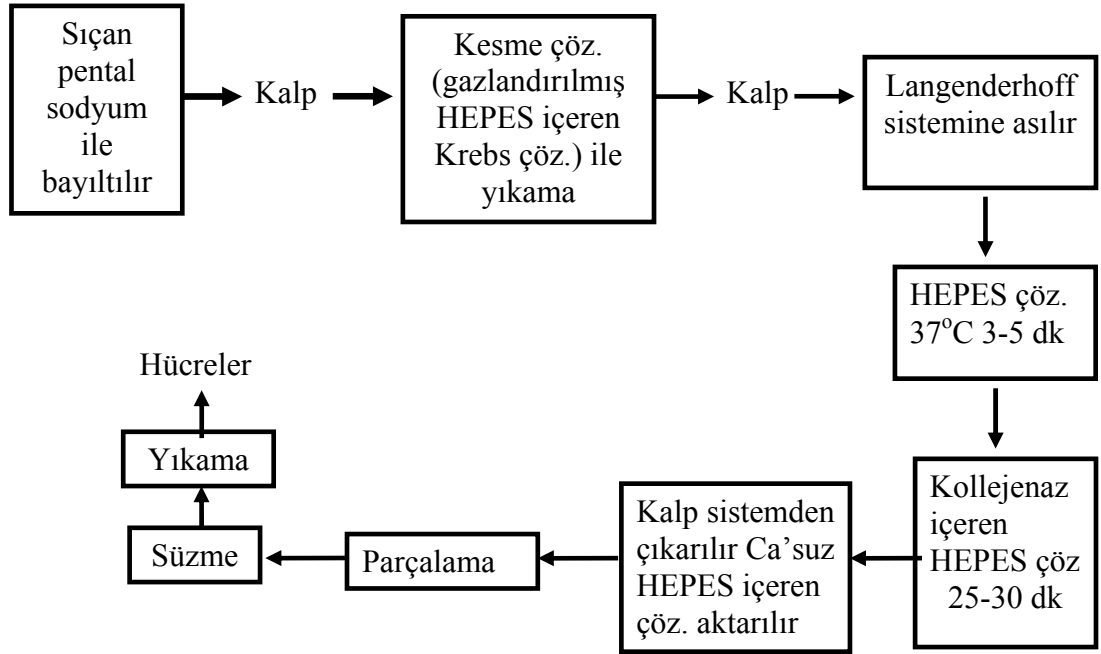
Kitosan/ilâç ağırlık oranı(mg/mg)	Yükleme Oranı=İlaç/kitosan ağırlık oranı (mg/mg)
20/2	0,100
40/2	0,050
60/2	0,033
80/2	0,025

Trimetil nanokitosan ve ilaç yüklü trimetil nanokitosan örnekleri (ilaç miktarı; (2 mg) sabit ve trimetil nanokitosan miktarı (0, 20, 40, 60, 80 mg) değişken) suda çözülmüş ve örneklerin kromatogramları alınmıştır. Her bir örnek için ilaca ait alan değeri kromatogramdan okunmuş ve trimetil nanokitosan miktarının ilaca ait alan değerine etkisi değerlendirilmiştir. Her bir örneğin ilaca ait alan değerleri ilacın alan değerine bölünerek ilacın sudaki çözünürlüğüne göre çözünürlük artış değeri hesaplanmıştır. Karşılaştırma amacıyla ilaç yüklü trimetil kitosan, ilaç yüklü arap zamkı ve ilaç yüklü ticari suda çözünür kitosan ile analiz tekrarlanmıştır.

3.2.4 Nanokitosanın hücre canlılığına etkisinin incelenmesi

Suda iyi çözünen nanokitosanın kalp kası hücreleri (kardiyomiyosit) canlılığının zamanla değişimine etkisi incelenmiştir. Çalışma hücre izolasyonu (Şekil 3.8) ve inkübasyonu olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada sıçan pental sodyum ($C_{11}H_{17}N_2NaO_3$; Pentobarbital sodyum) ile bayıltılmış ve kalbi alınmıştır. Kalp, kesme çözeltisi (gazlandırılmış HEPES içeren Krebs çözeltisi) ile yıkanmıştır (Gazlandırılmış çözelti içeriği: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.4 mM Na_2HPO_4 , 0.4 mM NaH_2PO_4 , 5 mM HEPES (N-(2-Hidroksietil) Piperazin-N-(2-Etan Sülfonik Asit), 10 mM glukoz; pH 7.4, %100 O_2 ile gazlanır). Kardiyomiyositlerin izolasyonu Langenderhoff sistemi kullanılarak $37^\circ C$ 'de gerçekleştirilmiştir. Tüm kalpler sisteme asılmış, HEPES çözeltisi ile kalbin içindeki kan temizlenmiş ve kollejenaz içeren HEPES çözeltisi ile kalbin yumuşaması (perfüzyon) sağlanmıştır. Perfüzyonun

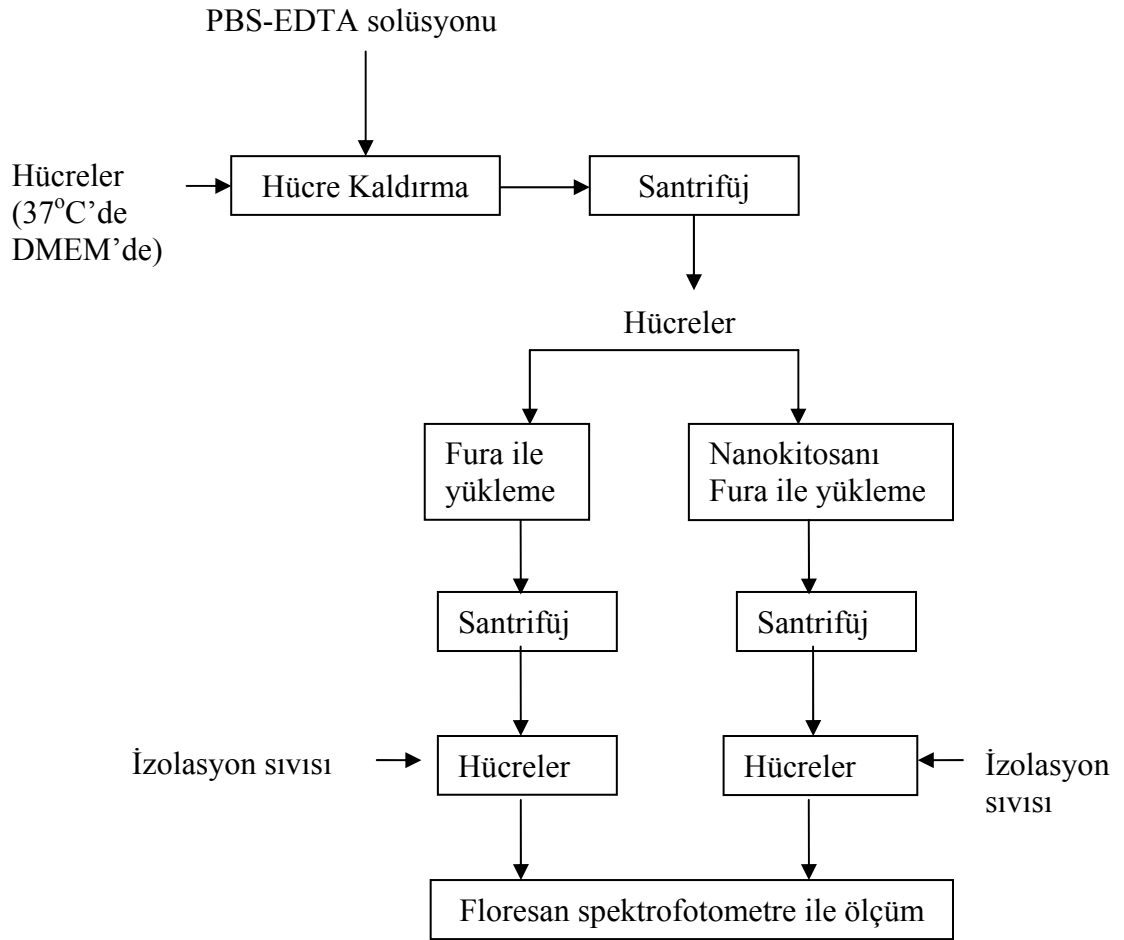
25-30 dk sında kalpler sistemden çıkarılarak Ca'suz HEPES içeren çözeltiliye aktarılarak parçalanmış ve elde edilen karışımlar süzölmüş ve böylece hücreler yıkanmıştır (Özdemir vd. 2005). İkinci aşamada ise trimetil nanokitosan çözeltilisi (750µl) ile hücreler (250 µl) 37°C'de 3 h süreyle inkübe edilmiş ve canlı hücreler ışık mikroskobu kullanılarak sayılmıştır (Yaras vd. 2007). Deneyler arap zamkı ile tekrarlanmıştır. Sonuçlar nanokitosan ile elde edilen bulgular ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.8 Hücre izolasyonu (Ozdemir vd. 2005)

3.2.5 Nanokitosanın hücreye floresan boya girişine etkisi

Nanokitosanın hücreye (Memeli fibroblast kültür hücresi (LTK 8)) floresan boya (Fura-2) girişine etkisi floresan spektrofotometre ile incelenmiştir (Şekil 3.9). Fura-2 hücre içine zor giren floresan bir boyadır. Floresan spektrofotometre ile ölçüm Fura-2 boyasının uyarılması, belli dalga boyunda ışık vermesi ve ışık şiddetinin belirlenmesi üzerine kuruludur. HEPES içeren Krebs çözeltilisinde 1000 µg/ml derişimindeki nanokitosan stok çözeltilisi hazırlanmıştır. HEPES içeren Krebs çözeltilisi (pH 7.4) 117 mM NaCl, 10 mM glukoz, 10 mM HEPES, 1,8 mM CaCl₂, 1,7 mM MgCl₂ ve 5,4 mM KCl içermektedir. 30 µl stok çözeltili izolasyon sıvısı ile 3 ml'ye tamamlanarak 10 µg/ml



Şekil 3.9 Nanokitosanın hücreye Fura-2 floresan boyası girişine etkisi

derişimindeki nanokitosan örneği hazırlanmıştır. İzolasyon sıvısı (pH 7.4) 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM MgCl₂ içermektedir ve solüsyona CaCl₂ eklenmektedir.

Deneyde kültür hücresi (memeli fibroblast- LTK 8) kullanılmıştır. 37°C'de yüksek glikozlu yüzey-bağımlı bir solüsyon (DMEM; Dulbecco Modified Eagle Medium) içinde büyütölen hücreler PBS (fosfat tamponu)-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit, Ca⁺² ve Mg⁺² iyonlarını tutar) solüsyonu ile kaldırılmış ve bir kısmı atılmıştır. Hücreler kaldırıldıktan sonra 5 dk santrifüj edilmiştir. Yukarıda kalan PBS-EDTA solüsyonu atılmıştır. Hücreler eşit olarak bölünmüştür.

Fura-2 boyası sırasıyla izolasyon sıvısı içindeki hücreye ve izolasyon sıvısı içindeki nanokitosan hücre karışımına oda sıcaklığında karanlıkta 50 dk süreyle yüklenmiştir. Yükleme işlemi sonunda santrifüjlenip hücreler Fura-2'den yıkanmıştır. Yukarıda kalan Fura-2 içeren solüsyon dökülmüş ve hücreler izolasyon sıvısı ile santrifüjlenip tekrar yıkanmıştır. Ölçümler floresan spektrofotometre (FP6500 Jesco Spectro) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Dalgaboyuna karşılık ışık şiddeti değerleri ölçülmüştür. Deneyler sırasıyla izolasyon sıvısı içinde 100 µg/ml nanokitosan örneği ve 100 µg/ml trimetil kitosan örneği ile tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

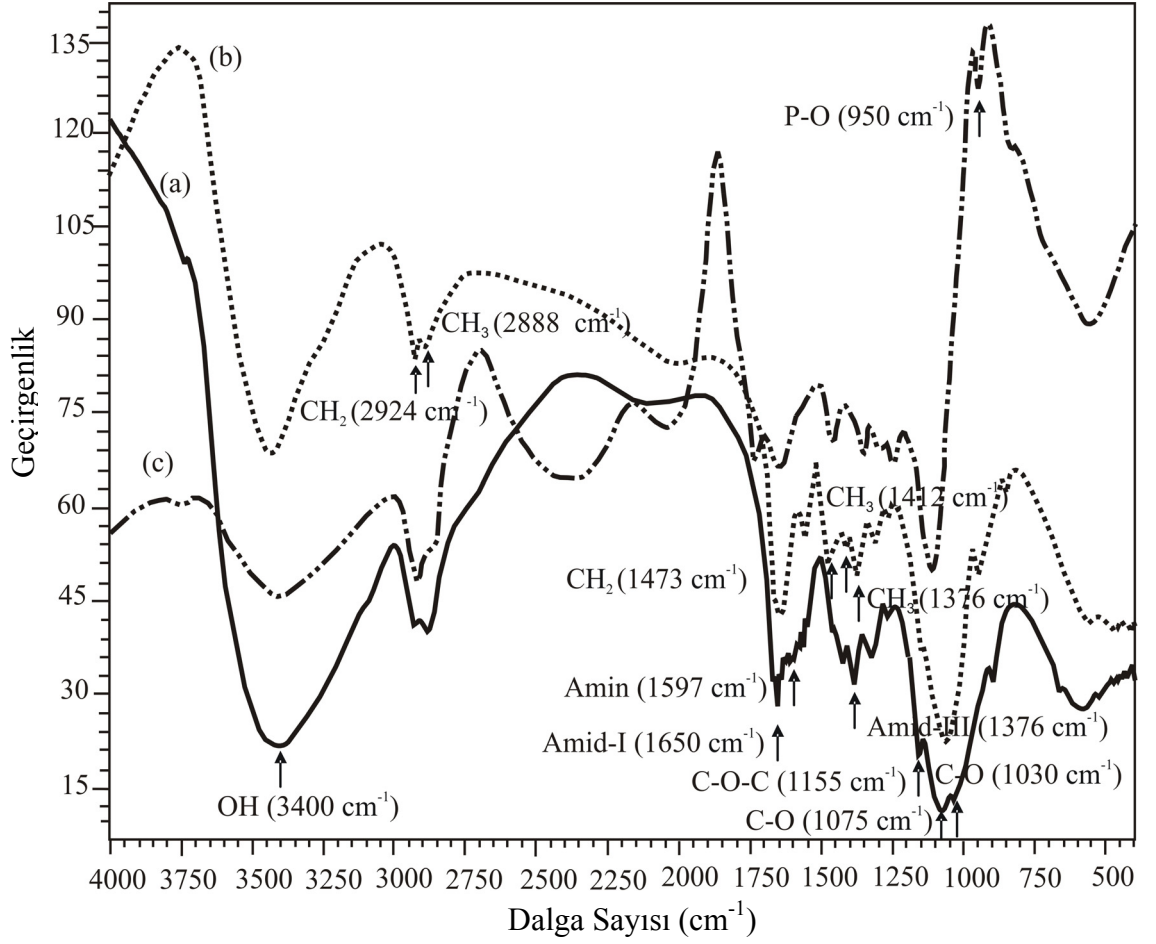
4.1 Suda Çözünen Nanokitosan Karakterizasyon Bulguları

Çalışmanın birinci aşamasında iki adımlı metilleme yöntemi ile kitosandan suda çözünen kitosan (trimetil kitosan) sentezlenmiş ve suda çözünen kitosandan ise iyonik jelleşme tekniği ile suda çözünen nanokitosan (trimetil nanokitosan) hazırlanmıştır. Örnekler FTIR, NMR, SEM, TEM ve DLS analizleri ile karakterize edilmiştir. Bulgular yorumlanmış ve süreli yayınlarla karşılaştırılmıştır. FTIR analizleri ile sentezlenen maddelerin kimyasal yapıları incelenmiş ve NMR analizleri ile suda çözünen kitosanın kuaternizasyon derecesi saptanmıştır. SEM, TEM ve DLS analizleri ile ise sentezlenen örneklerin boyutları belirlenmiştir.

4.1.1 FTIR analizi sonuçları

Kitosan, trimetil kitosan ve trimetil nanokitosanın FTIR spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir. Kitosanın FTIR spektrumunda 3400 cm^{-1} 'de OH, 1650 cm^{-1} 'de amid-I, 1597 cm^{-1} 'de amin, 1376 cm^{-1} 'de amid-III, 1155 cm^{-1} 'de C-O-C, 1030 ve 1075 cm^{-1} 'de C-O pikleri saptanmıştır. Ding vd. 2006 yaptıkları çalışmada kitosanın FTIR spektrumunda 3430 cm^{-1} 'de OH, 1662 cm^{-1} 'de amid-I, 1598 cm^{-1} 'de amin, 1380 cm^{-1} 'de amid-III, 1156 cm^{-1} 'de C-O-C, 1033 ve 1075 cm^{-1} 'de C-O piklerini saptamıştır (Şekil 4.1.a). Kitosana ait FTIR bulgularının Ding vd. 2006'nın sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Trimetil kitosan klorürün FTIR spektrumunda ise 1473 ve 2924 cm^{-1} 'de CH_2 , 1376 , 1412 ve 2888 cm^{-1} 'de CH_3 pikleri belirlenmiştir (Şekil 4.1.b). Ding vd. 2006 yaptıkları çalışmada trimetil kitosan klorürün FTIR spektrumunda 1476 ve 2932 cm^{-1} 'de CH_2 , 1378 ve 2884 cm^{-1} 'de CH_3 piklerini saptamıştır. Trimetil kitosan klorüre ait FTIR bulgularının Ding vd. 2006'nın sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. a.Kitosan, b.Trimetil kitosan, c.Trimetil nanokitosan FTIR spektrumları

Çizelge 4.1 Kitosan ve Trimetil kitosan FTIR sonuçlarının süreli yayınlarla karşılaştırılması

Gruplar		OH	Amid-I	Amin	Amid-III	C-O-C	C-O	CH ₂	CH ₃
Ding vd. 2006	Kitosan	3430	1662	1598	1380	1156	1033 1075		
	TMC							1476 2932	1378 2884
Bu çalışma	Kitosan	3400	1650	1597	1376	1155	1030 1075		
	TMC							1473 2924	1376 1412 2888

Trimetil nanokitosa'nın FTIR spektrumunda trimetil kitosa'nın tripolifosfat ile iyonik çapraz bağlanması nedeniyle 950 cm^{-1} 'de oluşan P-O piki saptanmıştır (Şekil 4.1.c). Trimetil kitosa'na fosfat grupları bağlanarak trimetil nanokitosa'ni oluşturmuştur. Süreli yayınlarda trimetil nanokitosa'na ait FTIR bulgusuna rastlanmadığı için önceki çalışmalarla karşılaştırma yapılamamıştır.

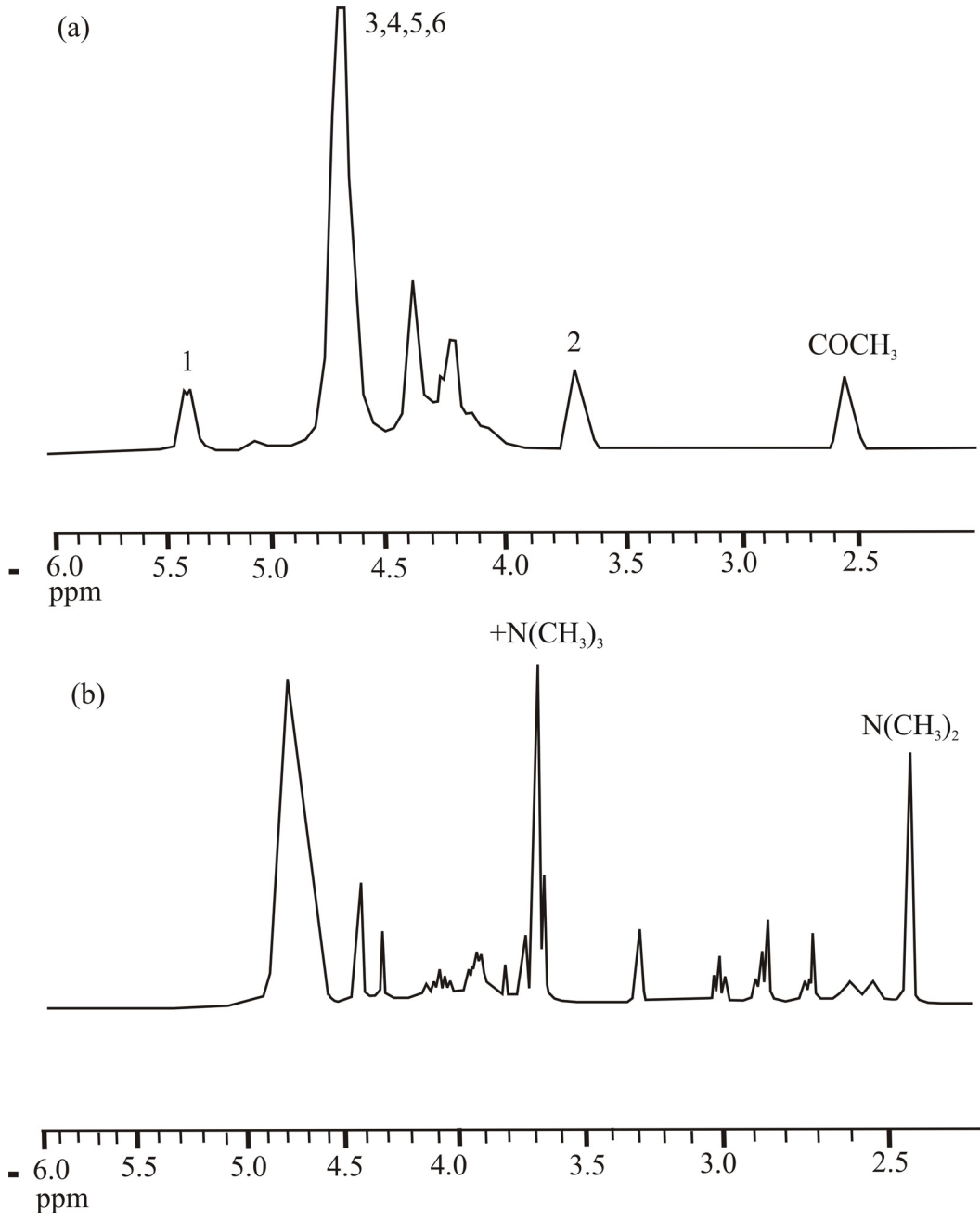
4.1.2 NMR analizi sonuçları

Kitosa ve trimetil kitosa klorürün NMR spektrumları görülmektedir (Şekil 4.2.a,b). Kitosanda tekrarlayan her bir glikoz amin biriminin 1. karbonuna bağlı hidrojen (H_1) piki $5.3 < \delta < 5.5$ ppm arasında, 3, 4, 5, 6. karbonlarına bağlı hidrojen (H_3, H_4, H_5, H_6) pikleri $4 < \delta < 4.9$ ppm arasında, 2. karbonuna bağlı hidrojen (H_2) piki 3.7 ppm'de, asetamid grubuna ait metil hidrojeni piki ise 2.6 ppm'de saptanmıştır (Şekil 4.2.a).

Britto vd. (2005) yaptıkları çalışmada kitosa'nın NMR spektrumunda $4.5 < \delta < 5$ ppm arasında anomerik karbona bağlı hidrojen (H_1) piki, $3.4 < \delta < 4$ ppm arasında glukopiranoz biriminin 3, 4, 5, 6. karbonlarına bağlı hidrojen (H_3, H_4, H_5, H_6) pikleri, 3.18 ppm'de glukopiranoz halkasının 2. karbonuna bağlı hidrojen (H_2) piki, 1.99 ppm'de asetamid grubuna ait metil hidrojeni piki saptamıştır (Çizelge 4.2).

Ding vd. (2006) ise yaptıkları çalışmada kitosa'nın NMR spektrumunda 4.76 ppm'de anomerik karbona bağlı hidrojen (H_1) piki, $3.43 < \delta < 3.81$ ppm arasında glukopiranoz biriminin 3, 4, 5, 6. karbonlarına bağlı hidrojen (H_3, H_4, H_5, H_6) pikleri, 3.09 ppm'de glukopiranoz halkasının 2. karbonuna bağlı hidrojen (H_2) piki, 1.96 ppm'de asetamid grubuna ait metil hidrojeni piki saptamıştır. Kitosa'na ait NMR bulguları süreli yayınlarda Britto vd. (2005)'nin belirlediği değerlere yakındır (Çizelge 4.2).

Trimetil kitosa klorürün NMR spektrumunda 2.5 ppm'de dimetillenmiş amin piki ve 3.7 ppm'de trimetillenmiş amin (kuaternize amin) piki gözlenmiştir (Şekil 4.2.b).



Şekil 4.2.a.Kitosan, b.TMC (Trimetil kitosan klorür) NMR spektrumları

Sieval vd. (1998) yaptıkları çalışmada trimetil kitosan klorürün NMR spektrumunda 2.5 ppm'de dimetillenmiş amin piki ve 3.35 ppm'de trimetillenmiş amin (kuaternize amin) piki saptamıştır. He vd. (2006) yaptıkları çalışmada trimetil kitosan klorürün NMR spektrumunda 3.4 ppm'de trimetillenmiş amin (kuaternize amin) piki saptamıştır (Çizelge 4.2).

Ding vd. (2006) ise yaptıkları çalışmada trimetil kitosan klorürün NMR spektrumunda 2.46 ppm’de dimetillenmiş amin piki ve 3.25 ppm’de trimetillenmiş amin (kuaternize amin) piki saptamıştır. Trimetil kitosan klorüre ait NMR bulguları Sieval vd. 1998, He vd. 2006 ve Ding vd. 2006’in sonuçları ile uyumludur (Çizelge 4.2).

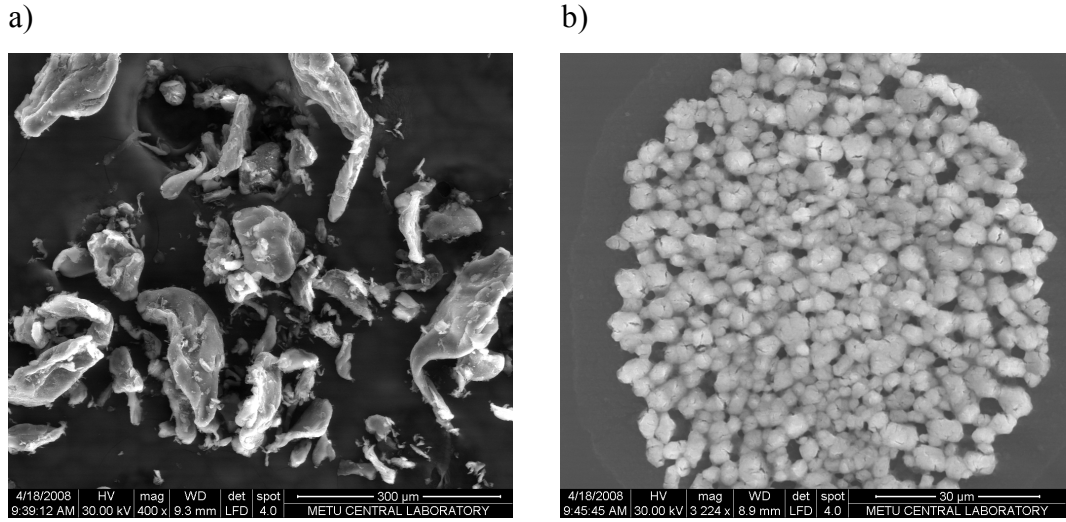
Çizelge 4.2 Kitosan ve Trimetil kitosan NMR sonuçlarının süreli yayınlarla karşılaştırılması

Gruplar		H ₁	H ₃ , H ₄ H ₅ , H ₆	H ₂	COCH ₃	N(CH ₃) ₂	+N(CH ₃) ₃
Sieval vd. 1998	TMC					2.5	3.35
Britto vd. 2005	Kitosan	4.5< δ <5	3.4< δ <4	3.18	1.99		
	TMC					2.76	3.3
He vd. 2006	TMC						3.4
Ding vd. 2006	Kitosan	4.76	3.43< δ <3.81	3.09	1.96		
	TMC					2.46	3.25
Bu çalışma	Kitosan	5.3< δ <5.5	4< δ <4.9	3.7	2.6		
	TMC					2.5	3.7

NMR spektrumu yardımıyla sentezlenen trimetil kitosan klorürün kuaternizasyon derecesi % 60 olarak hesaplanmıştır. Bu değer trimetil amin grubundaki hidrojenlerin pik integralinin ¹H piki integraline oranının 9’da biri alınarak hesaplanmıştır (Hamman and Kotze 2001, Synman vd. 2002, He vd. 2006, Amidi vd. 2006, Britto ve Assis 2007).

4.1.3 SEM analizi sonuçları

Kitosan ve trimetil kitosanın SEM görüntüleri Şekil 4.3.a.b’de görülmektedir. Kitosan katalog bilgilerine göre 154 mikron boyutundadır. Kitosanın SEM görüntüsü alındığında 150 mikron boyutunda yaprakların yanı sıra küçük kitosan taneleri de görülmüş ve kitosanın homojen bir dağılıma sahip olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.3.a, x400 büyütme). Trimetil kitosanın 1-3 mikron boyutunda homojen dağılımlı küresel tanelerden oluştuğu saptanmıştır (Şekil 4.3.b, x3200 büyütme). Süreli yayınlarda trimetil kitosana ait SEM bulgusuna rastlanmadığı için görüntülerin süreli yayınlarla karşılaştırılması yapılamamıştır.

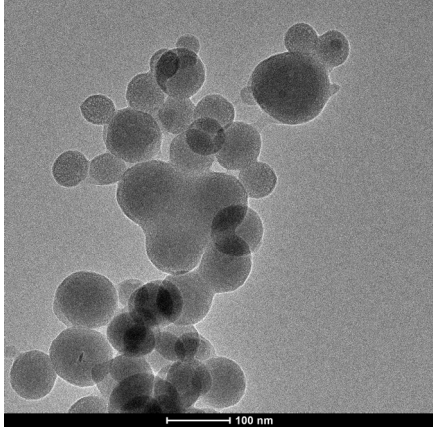


Şekil 4.3 a) Kitosan (x400 büyütme) b) TMC (Trimetil kitosan klorür, x3200 büyütme) SEM görüntüleri

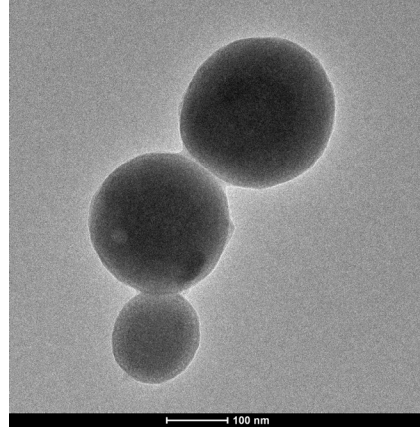
4.1.4 TEM analizi sonuçları

Trimetil nanokitosanın farklı bölgelerden çekilmiş TEM görüntüleri Şekil 4.4.a,b,c’de görülmektedir. Trimetil nanokitosan nano boyutta küresel taneciklerden oluşmuş ve geniş bir boyut dağılımı vermiştir. Bu boyut dağılımının belirlenmesi amacıyla aynı örneğin 17 farklı bölgesinden görüntüler alınmıştır (Şekil 4.5).

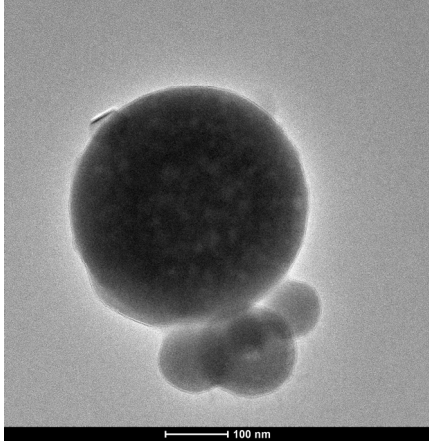
a)



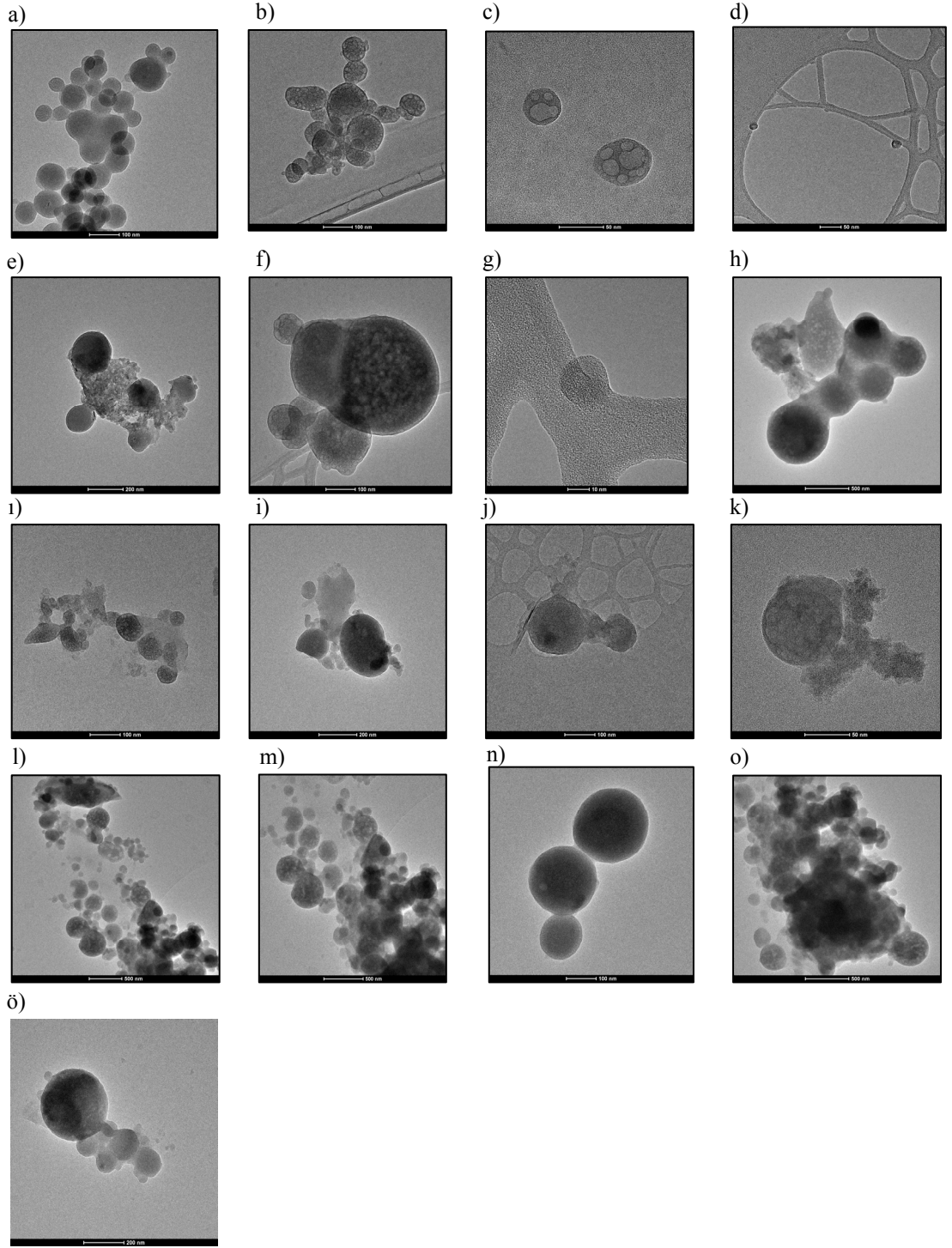
b)



c)

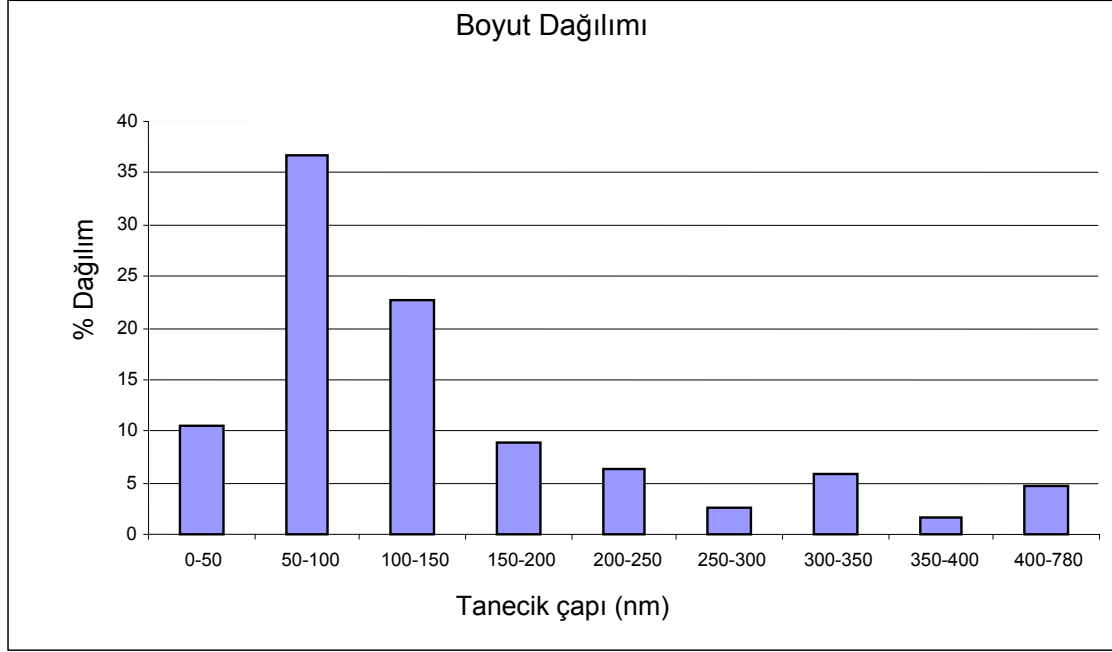


Şekil 4.4 Trimetil nanokitosanın farklı bölgelerden çekilmiş TEM görüntüleri



Şekil 4.5 Trimetil nanokitosanın boyut dağılımının belirlenmesinde kullanılan tüm TEM görüntüleri

TEM görüntülerindeki tüm tanecikler sayılarak tanecik çapları kaydedilmiştir (Toplam 190 tanecik sayılmıştır). Tanecik çapına karşı boyut dağılımı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.6 Trimetil nanokitosanın boyut dağılımı

Trimetil nanokitosanın % 60'ı 50-150 nm aralığındaki taneciklerden oluşmaktadır (Şekil 4.6). Tüm taneciklerin % 86'sı 250 nm'den küçüktür ve geri kalan taneciklerde % 6 oranında 300-350 nm büyüklüğüne rastlanmıştır. Amidi vd. (2006) yaptıkları çalışmada trimetil nanokitosanı aynı yöntemle (iyonik jelleşme) sentezlemiş ve SEM görüntüleri ile taneciklerin 20-200 nm aralığında olduğunu saptamışlardır. Chen vd. (2007) ise trimetil nanokitosanın TEM görüntülerinde 200-250 nm aralığında değişen tanecikler gözlemlemiştir. Trimetil nanokitosanın TEM sonuçlarına göre belirlenen tanecik büyüklüğü Amidi vd. (2006)'nin yaptıkları çalışma ile uyumludur.

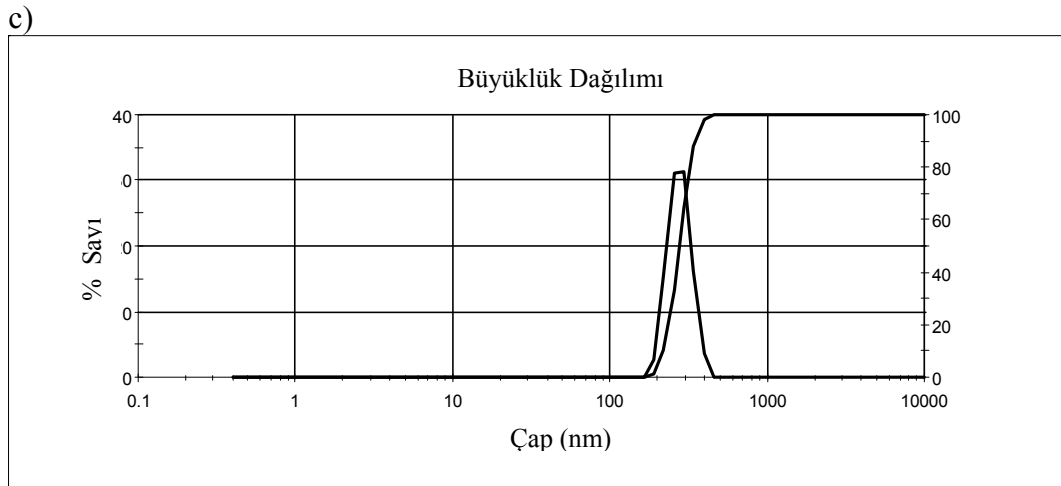
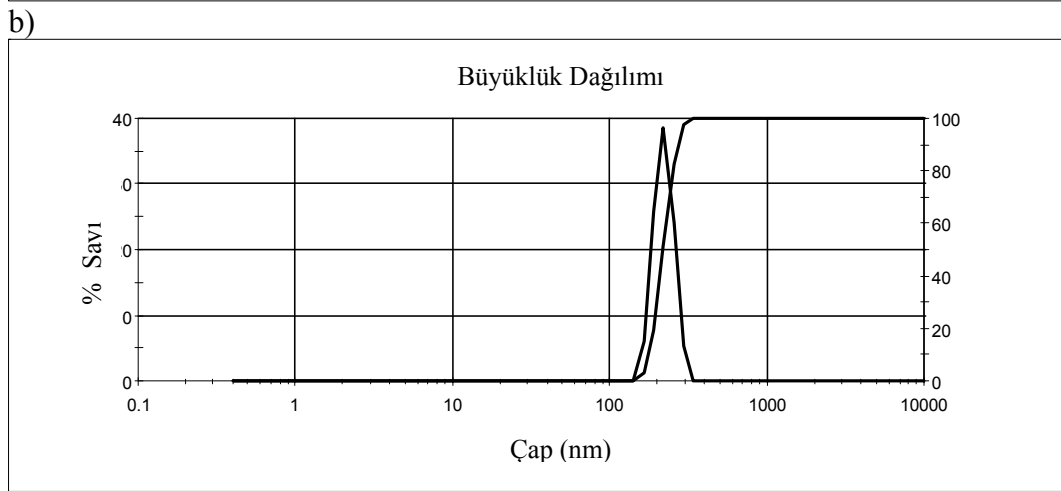
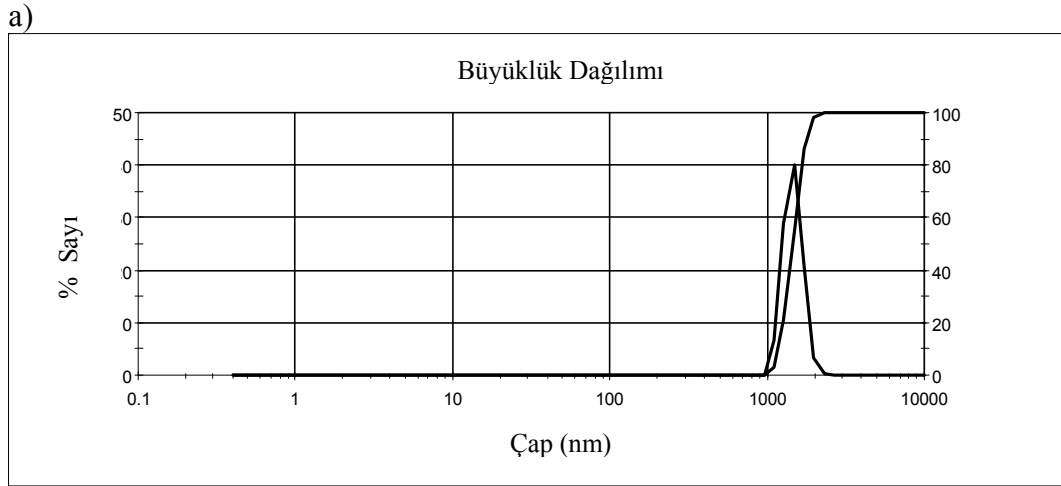
4.1.5 DLS analizi sonuçları

Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosa'nın büyüklük dağılımları Şekil 4.7'de verilmiştir. 10 dk süreyle ultrasonik banyo yardımıyla etanolde ses ötesi dalgalar verilmiş trimetil kitosa'nın büyüklük dağılım grafiği Şekil 4.7.a'da görülmektedir. Trimetil kitosa'nın % 29'u 1281 nm, %40'ı 1484 nm, %21'i 1718 nm, %7'si 1106 nm ve %3'ü 1990 nm olarak bulunmuştur. Taneciklerin % 97'si 1,1 mikron ile 1,7 mikron arasındadır. Trimetil kitosa'nın ortalama 1.4 mikron boyutunda bulunmuştur. Bu bulgu 1-3 mikron arasında bulunan trimetil kitosa'nın SEM sonucu ile uyumludur. Süreli yayınlarda trimetil kitosa'nın DLS analizi sonucu ile ilgili bir bulguya rastlanmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

5 dk süreyle ultrasonik prob yardımıyla etanolde ses ötesi dalgalar verilmiş trimetil nanokitosa'nın büyüklük dağılım grafiği görülmektedir (Şekil 4.7.b). Trimetil nanokitosa'nın %26'sı 190 nm, %39'u 220 nm, %24'ü 255 nm, %6'sı 164 nm ve %5'i 295 nm olarak bulunmuştur. Taneciklerin % 95'i 164 nm ile 255 nm arasındadır. Trimetil nanokitosa'nın etanolde ortalama 220 nm boyutunda bulunmuştur.

5 dk süreyle ultrasonik prob yardımıyla HEPES (N-2-Hidroksietil Piperazin-N-2-Etan Sülfonik Asit) tampon çözeltisinde ses ötesi dalgalar verilmiş trimetil nanokitosa'nın büyüklük dağılım grafiği görülmektedir (Şekil 4.7.c). Trimetil nanokitosa'nın %31'i 255 nm, %31'i 295 nm, %16'sı 342 nm, %15'i 164 nm, %4'ü 396 nm ve %3'ü 190 nm olarak bulunmuştur. Taneciklerin % 96'sı 164 nm ile 342 nm arasındadır. Trimetil nanokitosa'nın HEPES tampon çözeltisinde ortalama 295 nm boyutunda bulunmuştur.

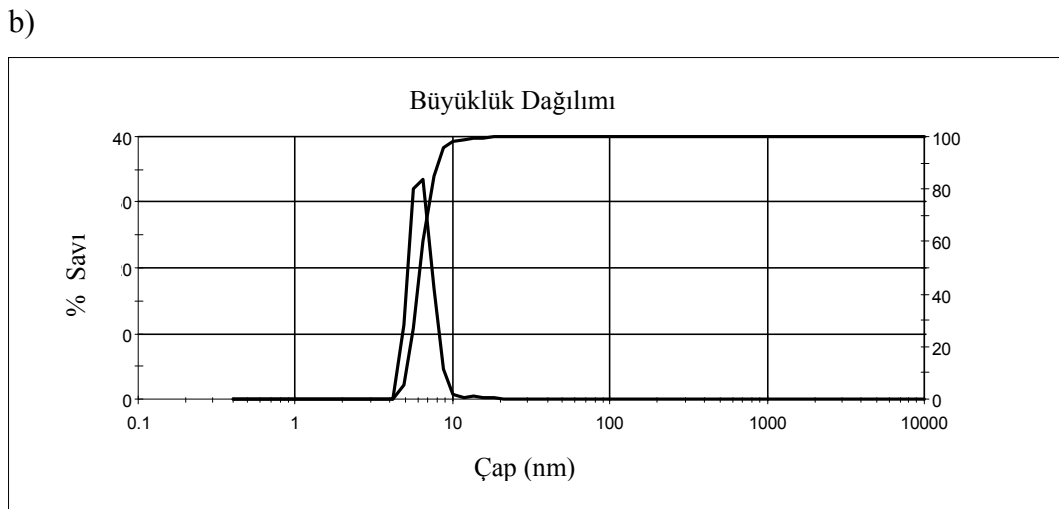
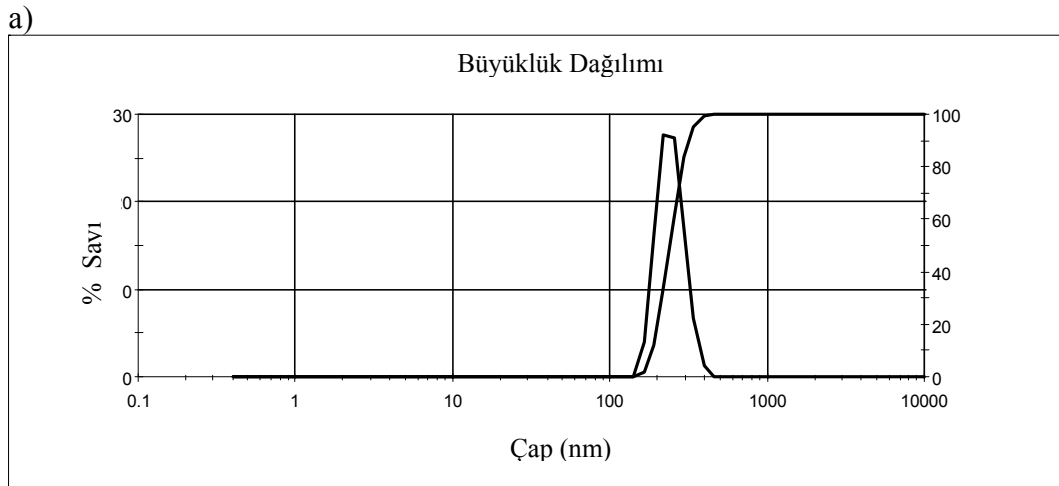
Trimetil kitosa'nın ve trimetil nanokitosa'nın etanolde ve HEPES'de DLS analizlerine ek olarak su ile de deneme yapılmıştır. Trimetil kitosa'nın ve trimetil nanokitosa'nın suda büyüklük dağılımları verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7.a.Trimetil kitosanın etanolde, b.Trimetil nanokitosanın etanolde, c.Trimetil nanokitosanın HEPES tampon çözeltisinde büyüklik dağılımı

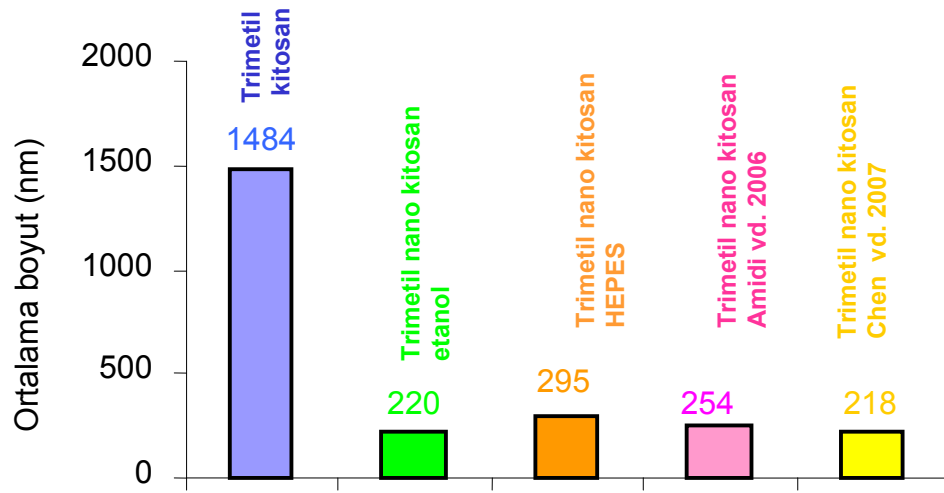
5 dk süreyle ultrasonik prob yardımıyla suda ses ötesi dalgalar verilmiş trimetil kitosanın büyüklük dağılım grafiği görülmektedir (Şekil 4.8.a). Trimetil kitosan suda ortalama 220 nm boyutunda bulunmuştur. Bu analiz bir kontrol analizi olarak düşünülmüştür. Trimetil kitosanın sudaki DLS analizinde sonucun nanoboyutta çıkması trimetil kitosanın suda çözündüğünü desteklemektedir.

5 dk süreyle ultrasonik prob yardımıyla suda ses ötesi dalgalar verilmiş trimetil nanokitosanın büyüklük dağılım grafiği görülmektedir (Şekil 4.8.b). Trimetil nanokitosan suda ortalama 6.5 nm boyutunda bulunmuştur. Bu analiz bir kontrol analizi olarak düşünülmüştür. Trimetil nanokitosanın sudaki DLS analizinde sonucun çok küçük olması trimetil nanokitosanın suda çözündüğünü desteklemektedir.



Şekil 4.8.a.Trimetil kitosanın, b.Trimetil nanokitosanın suda büyüklük dağılımı

Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosan DLS analiz sonuçlarının süreli yayınlarla karşılaştırılması Şekil 4.9’da verilmiştir. Amidi vd. (2006) yaptıkları çalışmada trimetil nanokitosanın boyutunu 254 nm olarak saptamıştır. Chen vd. (2007) ise yaptıkları çalışmada trimetil kitosandan (kuaternizasyon derecesi, % 37) trimetil nanokitosanı iyonik jelleşme tekniği ile sentezlemiş ve trimetil nanokitosanının boyutunu 218 nm olarak belirlemişlerdir. Bu doktora çalışmasında sentezlenen trimetil nanokitosanın ortalama boyutu sırasıyla etanolde 220 nm ve HEPESde 295 nm olarak saptanmıştır. Trimetil nanokitosana ait DLS bulgularının Amidi vd. 2006 ve Chen vd. 2007’in sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9 Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosanın tanecik ortalama boyutlarının (DLS) süreli yayınlarla karşılaştırılması

Trimetil nanokitosanın % 86’sı TEM sonuçlarına göre 250 nm’den küçük bulunmuştur. DLS sonuçlarına göre trimetil nanokitosanın ortalama parçacık büyüklüğü etanolde 220 nm olarak saptanmıştır. TEM ve DLS analiz sonuçları birbirlerine yakın değerlerdir.

4.2 İlaç Yüklü Örneklerin Karakterizasyon Bulguları

Suda iyi çözünen nanokitosana (trimetil nanokitosan) iki farklı yöntem (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) kullanarak suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ve karşılaştırma amacıyla aktif şekli olan suda çözünen *candesartan* yüklenmiştir. *Candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örnekleri HPLC, FTIR ve AFM analizleri ile karakterize edilmiştir. HPLC analizleri ile ilaç (*candesartan-cilexetil*) yüklü örneklerin yükleme etkinlikleri belirlenmiştir. FTIR analizleri ile suda iyi çözünen nanokitosan ile *candesartan-cilexetil* arasındaki etkileşimler incelenmiştir. AFM analizleri ile ise ilaç (*candesartan-cilexetil*) yüklü örneklerin boyutları saptanmıştır. Analizler karşılaştırma amacıyla *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örnekleri ile tekrarlanmıştır.

4.2.1 HPLC analizi sonuçları

4.2.1.1 *Candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan HPLC sonuçları

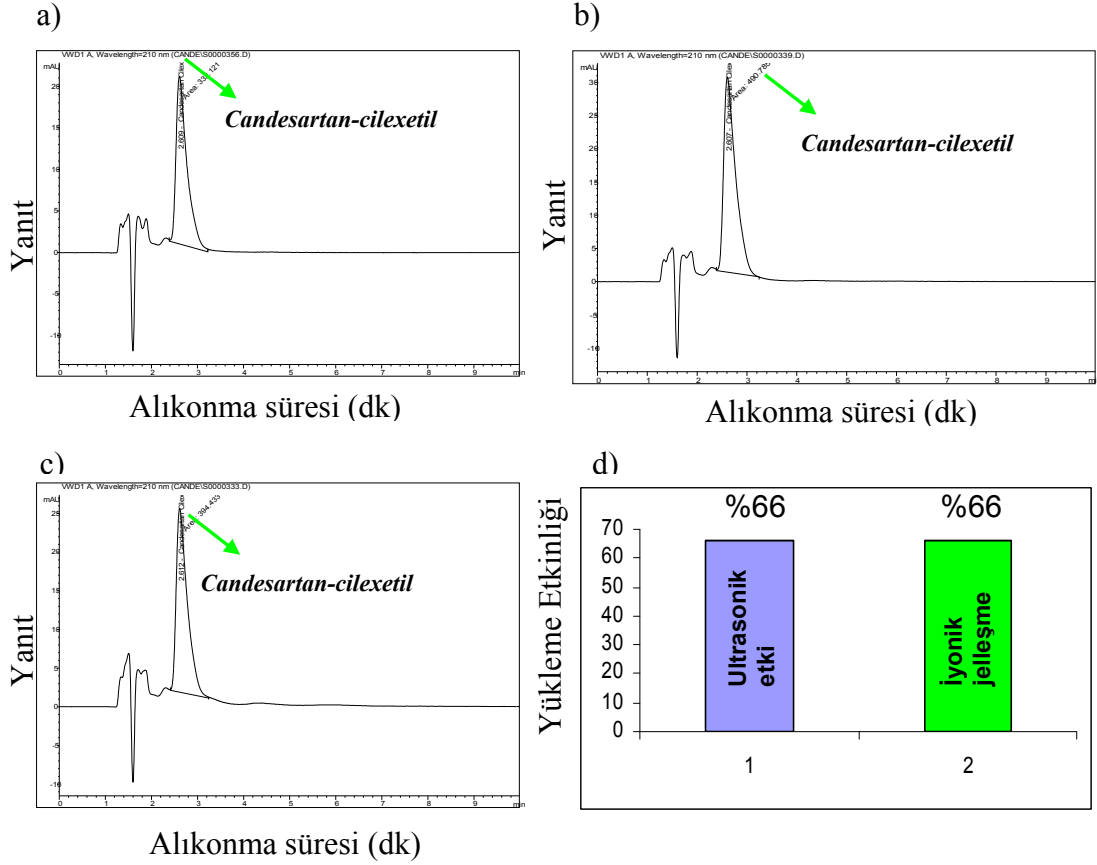
İki farklı yöntemle (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan HPLC kromatogramları ve yükleme etkinliği değerleri Şekil 4.10'da görülmektedir.

Her iki yöntem ile (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan kromatogramlarında aynı alıkonma süresinde *candesartan-cilexetil* piki belirlenmiştir.

Candesartan-cilexetil yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin yükleme etkinlikleri her iki yöntem ile (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) % 66 bulunmuştur (Şekil 4.10).

Ultrasonik etki ve iyonik jelleşme yöntemleri ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örnekleri HPLC ile analizlenmiş ve örneklerde bulunan *candesartan-cilexetil* miktarları ve *candesartan-cilexetil* yükleme değerleri Çizelge 4.3'

de verilmiştir (toplam örnek miktarı 6 mg, örneğe başlangıçta konulan *candesartan-cilexetil* miktarı ise 1 mg'dır).



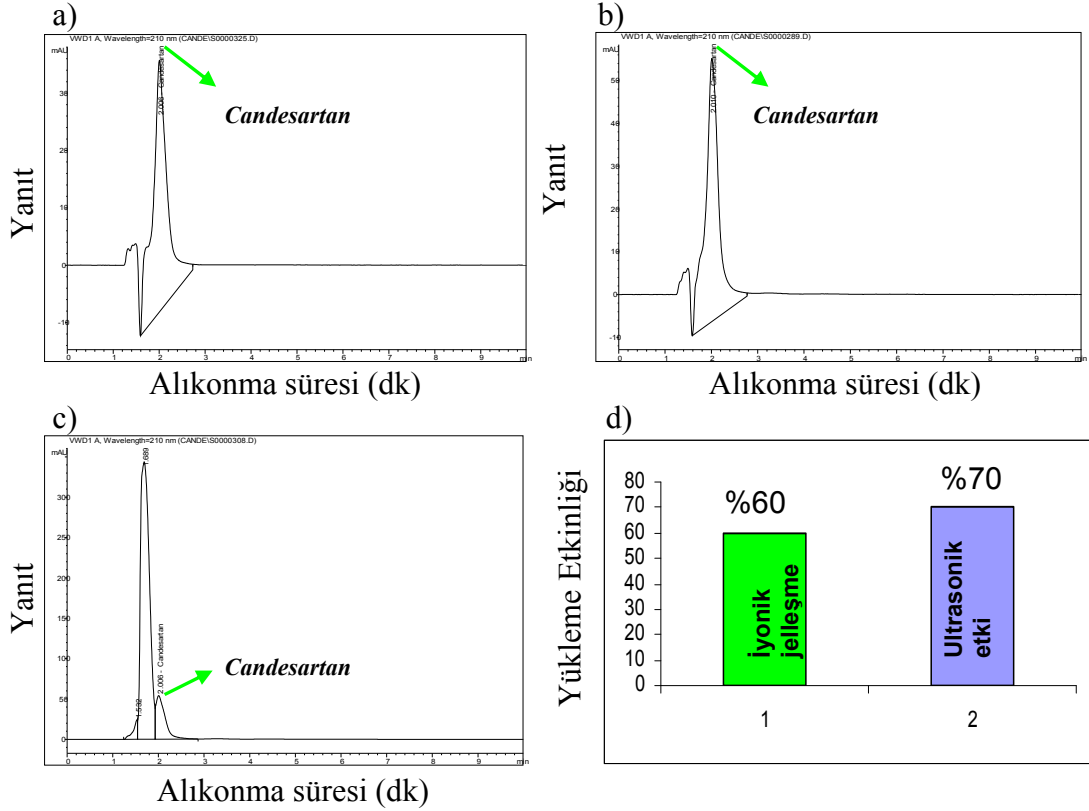
Şekil 4.10.a.*Candesartan-cilexetil*, b.Ultrasonik etki, c.İyonik jelleşme ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan kromatogramları ve d.yükleme etkinliği değerleri

Çizelge 4.3 % 20 ilaç yükleme ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneklerinde HPLC ile belirlenen *candesartan-cilexetil* miktarları ve *candesartan-cilexetil* yükleme değerleri

Örnek	mg <i>candesartan-cilexetil</i> /mg örnek	<i>Candesartan-cilexetil</i> yükleme (%w/w)
Ultrasonik etki ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan	0.12	14.4
Ultrasonik etki ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil kitosan	0.1	12
İyonik jelleşme yöntemi ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosan	0.1	12

4.2.1.2 *Candesartan* yüklü trimetil nanokitosan HPLC sonuçları

İki farklı yöntemle (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan HPLC kromatogramları ve yükleme etkinliği değerleri Şekil 4.11'de görülmektedir.



Şekil 4.11. a.*Candesartan*, b.Ultrasonik etki, c.İyonik jelleşme ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan kromatogramları, ve d.yükleme etkinliği değerleri

Her iki yöntem ile (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan kromatogramlarında aynı alıkonma süresinde *candesartan* piki belirlenmiştir.

Candesartan yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin HPLC bulguları incelendiğinde her iki yöntem ile (ultrasonik etki, iyonik jelleşme) elde edilen yükleme etkinliği değerlerinin % 60'dan büyük olduğu ve ultrasonik etki ile hazırlanan ilaç yüklü

örneklerin yükleme etkinliklerinin iyonik jelleşme ile hazırlananlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11).

Ultrasonik etki ve iyonik jelleşme yöntemleri ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örnekleri HPLC ile analizlenmiş ve örneklerde bulunan *candesartan* miktarları ve *candesartan* yükleme değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir (Toplam örnek miktarı 6 mg, örneğe başlangıçta eklenen *candesartan* miktarı ise 1 mg’dır).

Çizelge 4.4 % 20 *candesartan* yükleme ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örneklerinde HPLC ile belirlenen *candesartan* miktarları ve *candesartan* yükleme değerleri

Örnek	mg <i>candesartan</i> /mg örnek	<i>Candesartan</i> yükleme (%w/w)
Ultrasonik etki ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan	0.1	12
Ultrasonik etki ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil kitosan	0.18	20
İyonik jelleşme yöntemi ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan	0.1	12

Candesartan-cilexetil ya da *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örnekleri için *candesartan-cilexetil* ya da *candesartan* yükleme (%w/w), yükleme etkinliği (%) değerleri aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır.

Candesartan-cilexetil ya da *candesartan* yükleme = $\frac{\text{Yüklenen } \textit{candesartan-cilexetil} \text{ ya da } \textit{candesartan} \text{ miktarı}}{\text{Polimer miktarı}}$

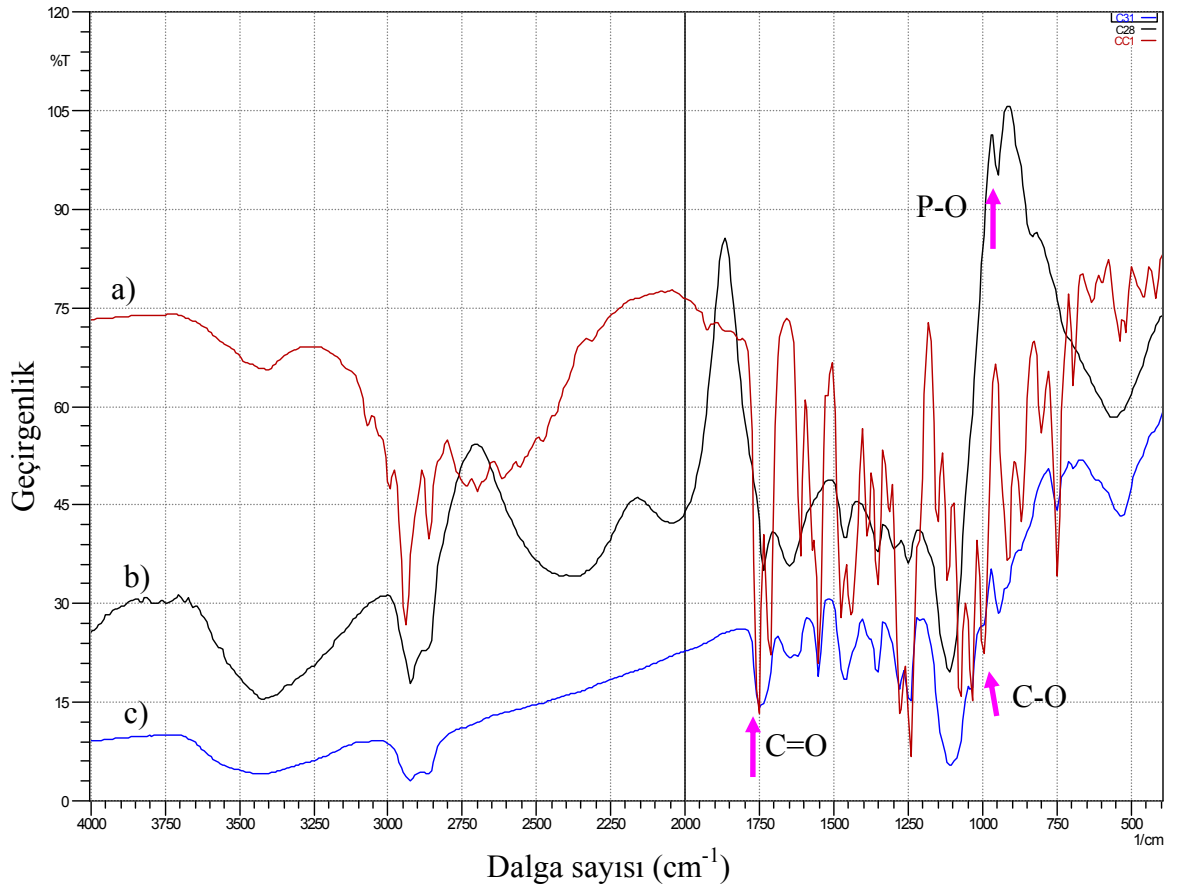
Yükleme etkinliği = $\frac{\text{Yüklenen } \textit{candesartan-cilexetil} \text{ ya da } \textit{candesartan} \text{ miktarı}}{\text{Başlangıçtaki } \textit{candesartan cilexetil} \text{ ya da } \textit{candesartan} \text{ miktarı}}$

4.2.2 FTIR analizi sonuçları

Candesartan-cilexetil yüklü trimetil nanokitosan ve karşılaştırma amacıyla *candesartan* (*candesartan-cilexetil*in aktif şekli) yüklü trimetil nanokitosan örnekleri FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. Trimetil nanokitosan ile *candesartan-cilexetil* ve *candesartan* arasındaki etkileşimler incelenmiştir.

4.2.2.1 *Candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan FTIR sonuçları

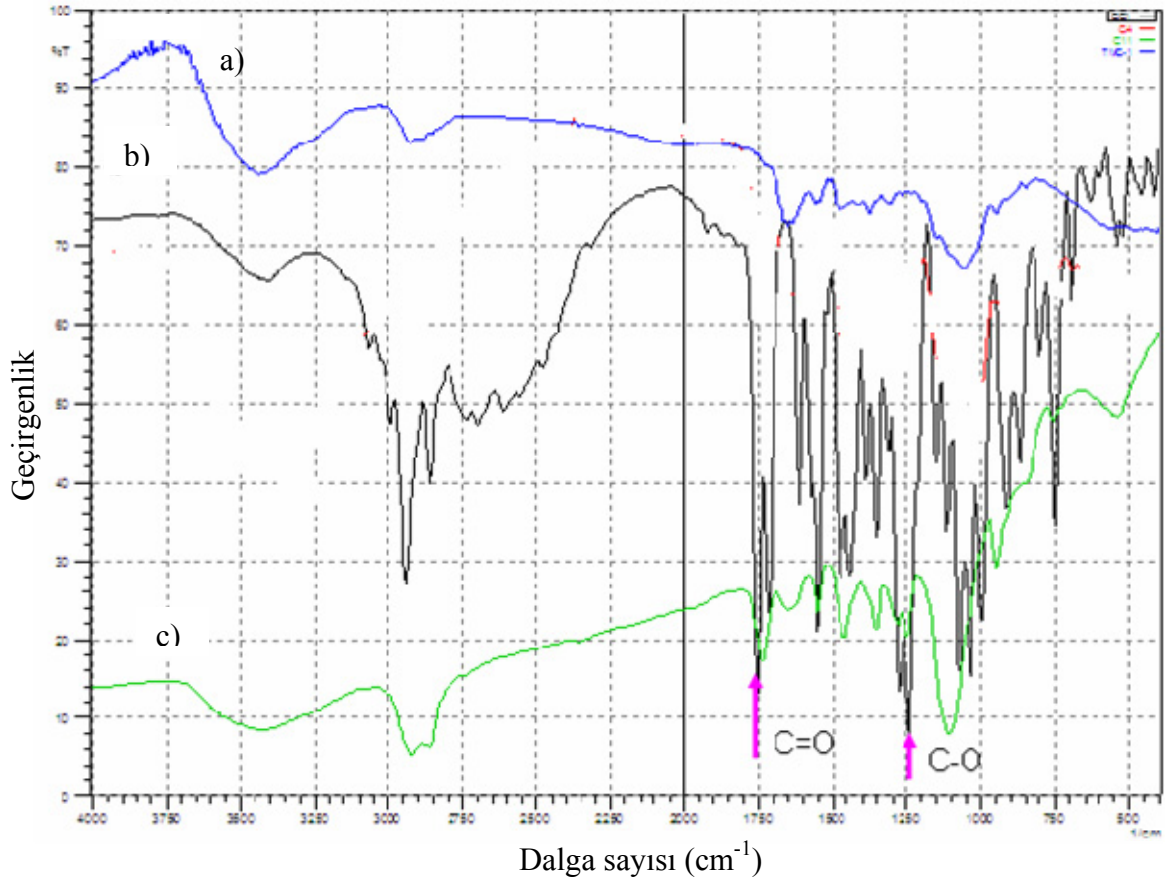
Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin FTIR spektrumları trimetil nanokitosan ve *candesartan-cilexetil* FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. a. *Candesartan-cilexetil*, b. Trimetil nanokitosan, c. Ultrasonik etki ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan FTIR analizi sonuçları

Ultrasonik etki ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosaan örneği FTIR spektrumunda trimetil nanokitosaan ve *candesartan-cilexetil* spektrumlarında 1750 cm^{-1} 'de gözlenen C=O piki saptanmış ve 1000 cm^{-1} 'de gözlenen C-O pikinin kaybolduğu belirlenmiştir. *Candesartan-cilexetil*in trimetil nanokitosaana bağlanacağı bir yer olmadığından *candesartan-cilexetil* trimetil nanokitosaana fiziksel olarak tutunmuştur (Şekil 4.12)

İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosaan örneğinin FTIR spektrumu trimetil kitosaan ve *candesartan-cilexetil* FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.13).



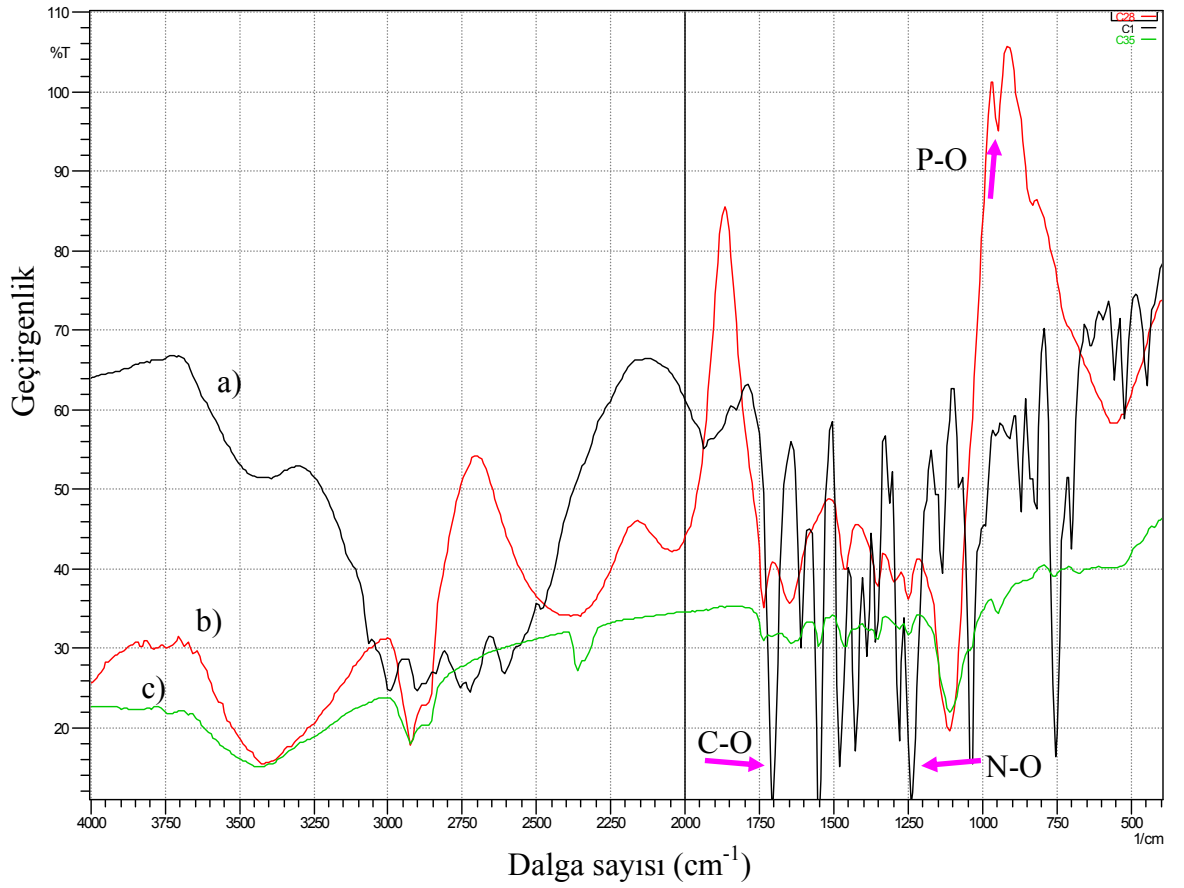
Şekil 4.13. a. Trimetil kitosaan, b. *Candesartan-cilexetil*, c. İyonik jelleşme ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosaan FTIR analizi sonuçları

İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü örneğin FTIR spektrumlarında *candesartan-cilexetil* ilacı spektrumunda 1250 cm^{-1} 'de gözlenen C-O

pik ve 1750 cm^{-1} 'de gözlenen C=O pik yüksekliklerinin azaldığı saptanmıştır. *Candesartan-cilexetilin* trimetil kitosan ile bağlanacağı bir yer olmadığından *candesartan-cilexetil* trimetil kitosana fiziksel olarak tutunmuştur (Şekil 4.13).

4.2.2.2 *Candesartan* yüklü trimetil nanokitosa FTIR sonuçları

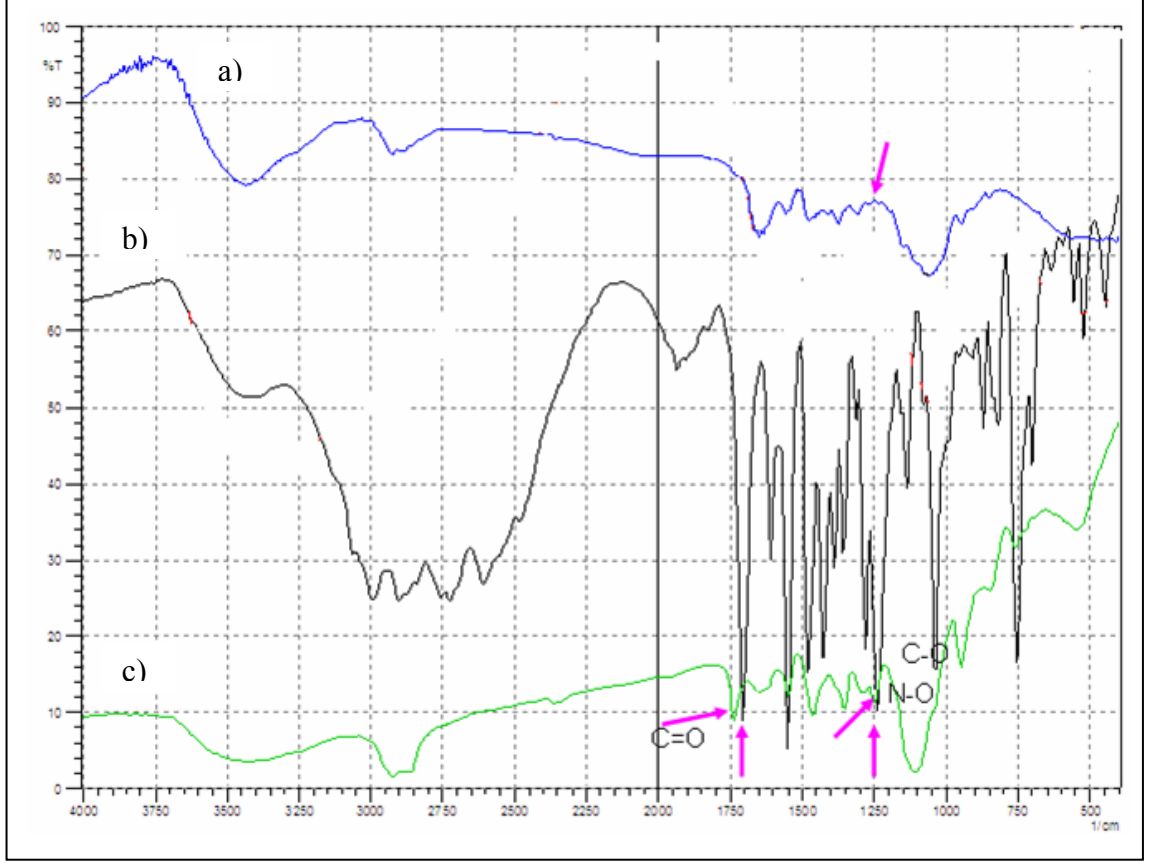
Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosa örneğinin FTIR spektrumu trimetil nanokitosa ve *candesartan* ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14.a.*Candesartan*, b.Trimetil nanokitosa, c.Ultrasonik etki ile *candesartan* yüklü trimetil nanokitosa FTIR analizi sonuçları

Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosa örneğinin FTIR spektrumunda trimetil nanokitosa ve *candesartan* spektrumlarında 1700 cm^{-1} 'de gözlenen C-O piki ve 1250 cm^{-1} 'de gözlenen N-O piki saptanmıştır. Bu nedenle *candesartan* trimetil nanokitosa fiziksel olarak tutunmuştur (Şekil 4.14).

İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin FTIR spektrumu trimetil kitosan ve *candesartan* FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15.a.Trimetil kitosan, b.*Candesartan*, c.İyonik jelleşme ile *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan FTIR analizi sonuçları

İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü örneklerde trimetil kitosandan farklı olarak 1250 cm⁻¹'de N-O gerilme piki saptanmıştır. 1750 cm⁻¹'de *candesartana* ait karbonil pik yüksekliğinin azaldığı saptanmıştır. İyonik jelleşme yönteminde trimetil kitosandaki N⁺ ile *candesartan*daki COO⁻ kimyasal kompleks oluşturmuştur (Şekil 4.15).

Candesartan'ın iyonik jelleşme yöntemi ile trimetil kitosana kimyasal olarak bağlandığı ultrasonik etki yöntemi ile ise trimetil nanokitosana ise fiziksel olarak tutunduğu

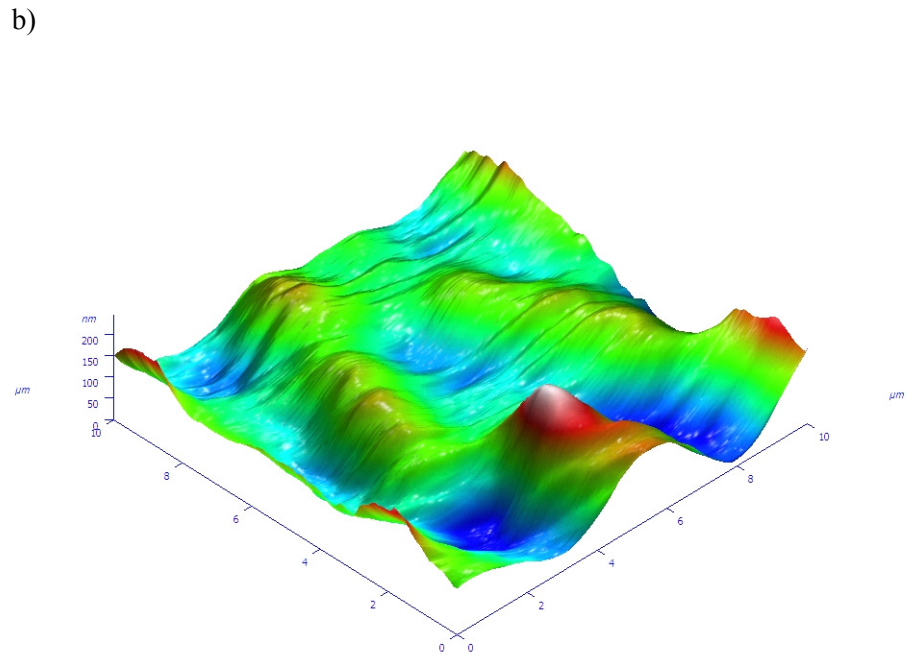
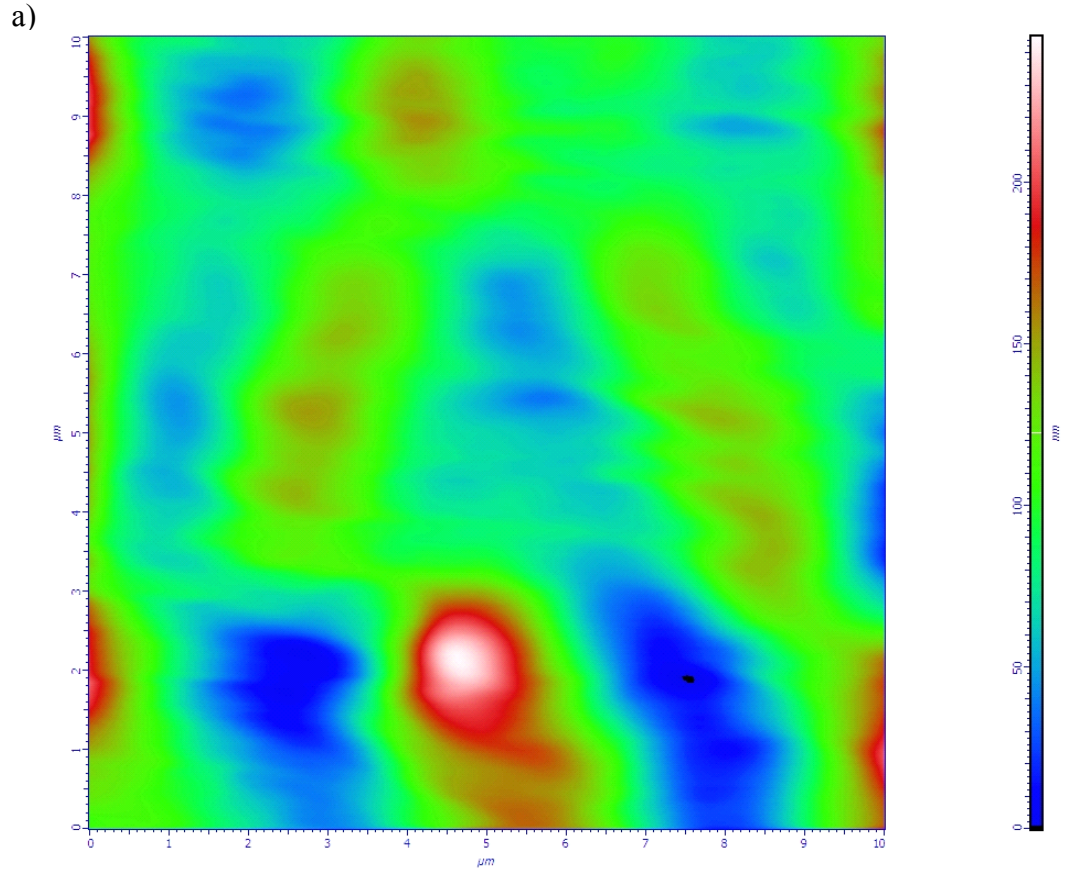
belirlenmiştir. *Candesartan-cilexetil* her iki yöntem (iyonik jelleşme, ultrasonik etki) ile trimetil kitosan ve trimetil nanokitosa fiziksel olarak tutunduğu saptanmıştır.

4.2.3 AFM analizi sonuçları

Candesartan-cilexetil ve *candesartan*'ın orijinal boyutları, *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosa ve karşılaştırma amacıyla *candesartan* yüklü trimetil nanokitosa örneklerinin boyutları AFM analizleri ile saptanmıştır.

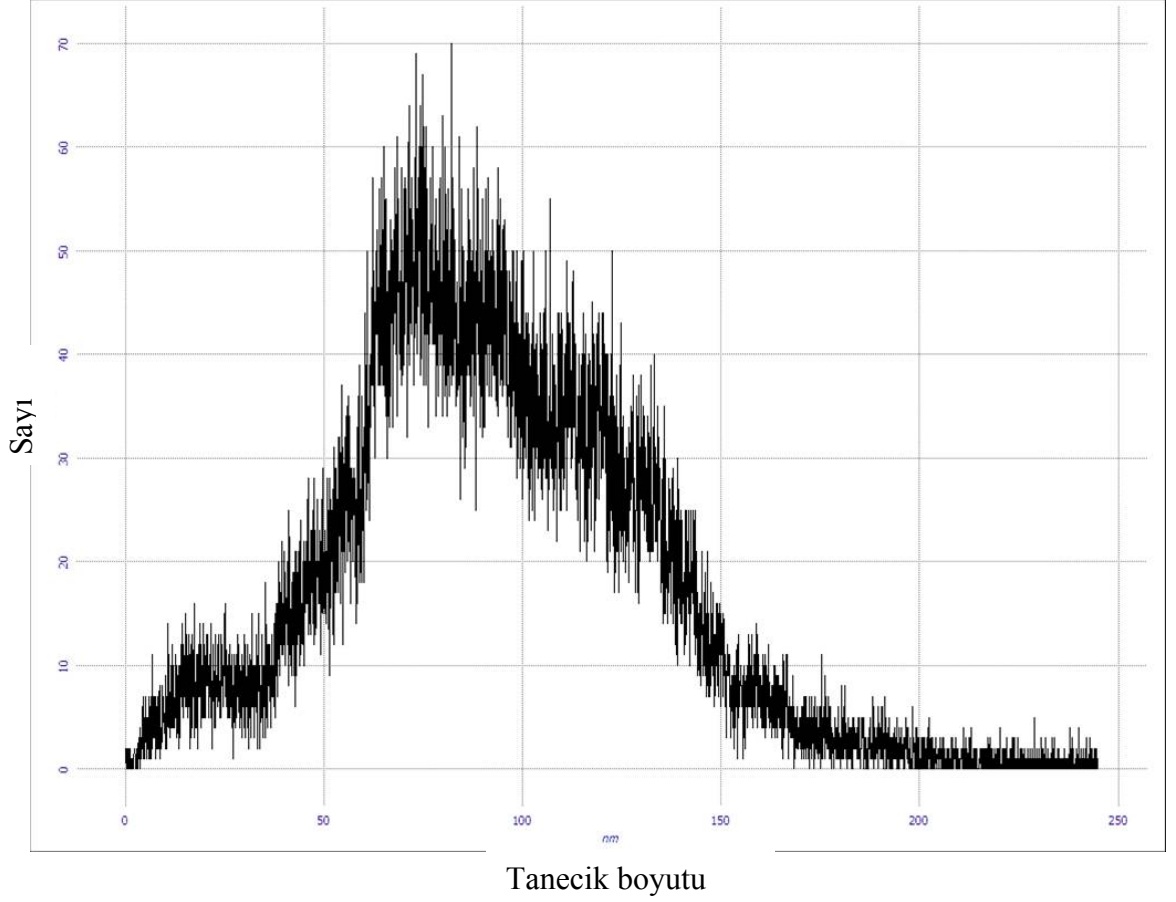
4.2.3.1 *Candesartan-cilexetil* ve *candesartan* AFM sonuçları

Candesartan-cilexetil iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri görülmektedir (Şekil 4.16). *Candesartan-cilexetil* tanecik boyutunun ortalama değerinin 92 nm olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16 *Candestartan-cilexetilin*: a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri

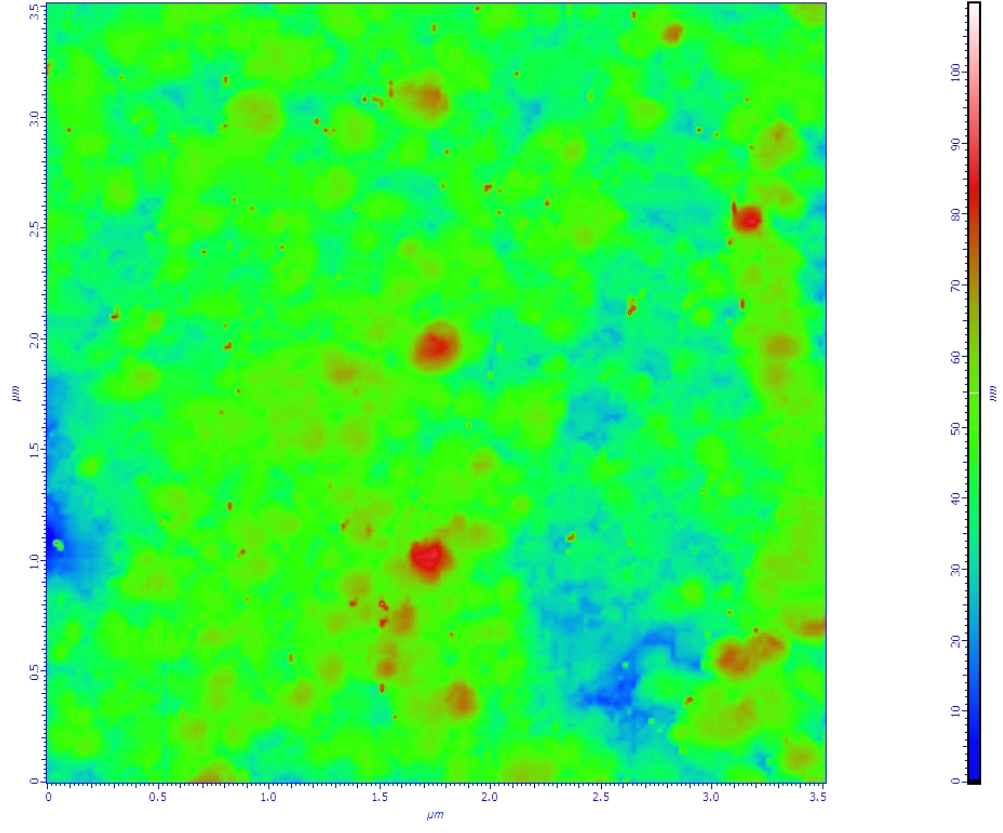
Candesartan-cilexetilin tanecik boyut dağılımı verilmiştir (Şekil 4.17). Örnekteki taneciklerin çoğunun 50-150 nm aralığında olduğu ve ortalama pürüzlülük değerinin 29.7 nm olduğu saptanmıştır.



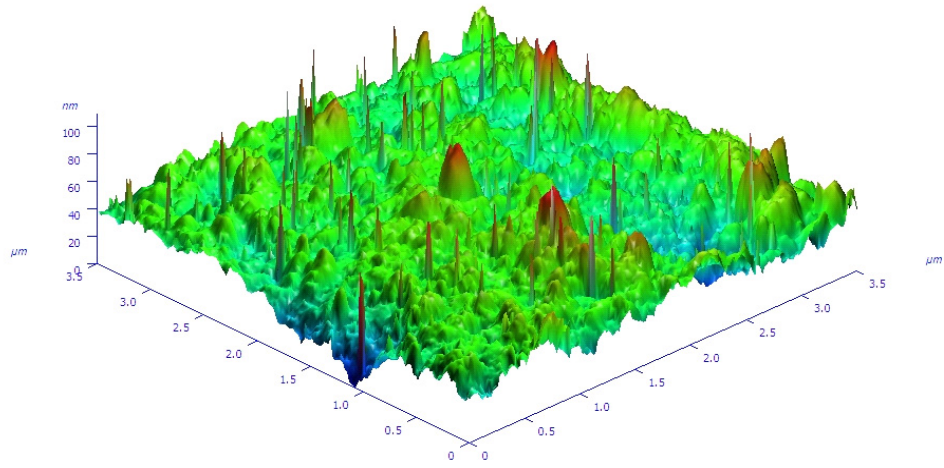
Şekil 4.17 *Candesartan-cilexetilin* tanecik boyut dağılımı

Candesartanın iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri görülmektedir (Şekil 4.18). *Candesartanın* tanecik boyutunun ortalama değerinin 44 nm olduğu belirlenmiştir.

a)

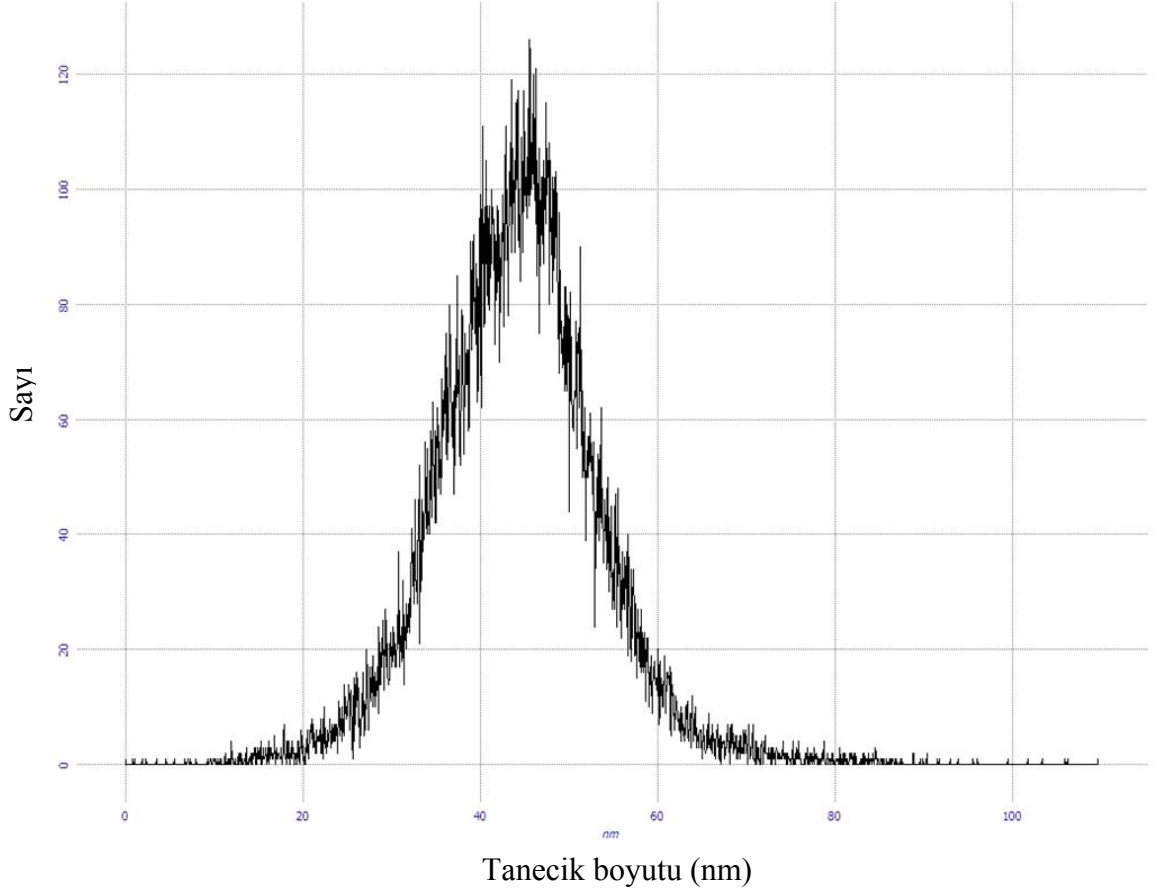


b)



Şekil 4.18 *Candestartan*ın: a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri

*Candesartan*ın tanecik boyut dağılımı verilmiştir (Şekil 4.19). Örnekteki taneciklerin çoğunun 20-60 nm aralığında olduğu ve ortalama pürüzlülük değerinin 6.9 nm olduğu saptanmıştır.

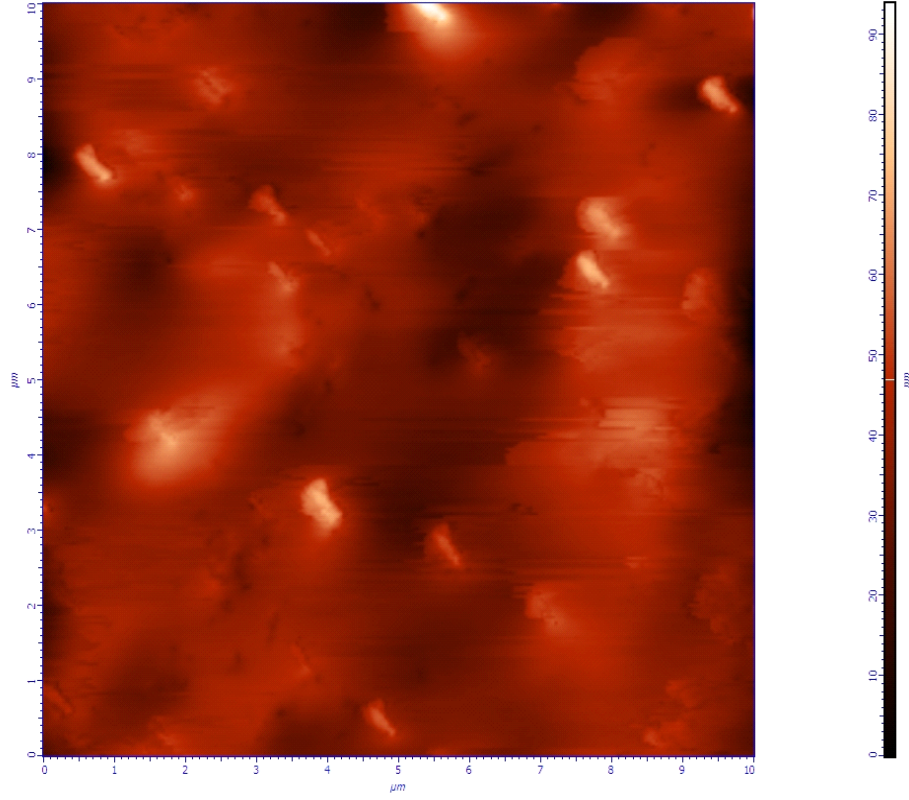


Şekil 4.19 *Candesartan*ın tanecik boyut dağılımı

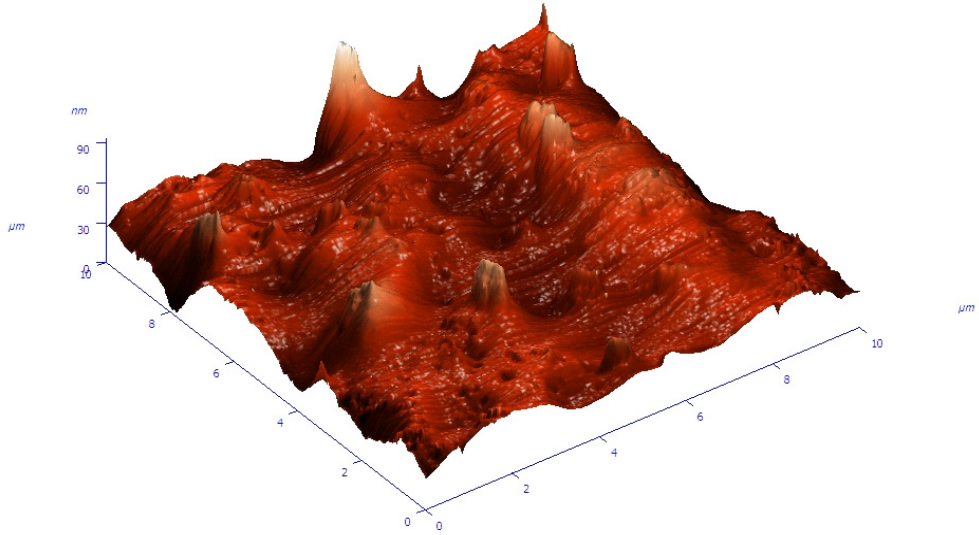
4.2.3.2 *Candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan AFM sonuçları

Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil kitosan örneğinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri görülmektedir (Şekil 4.20). Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyutunun ortalama değerinin ise 37 nm olduğu belirlenmiştir.

a)

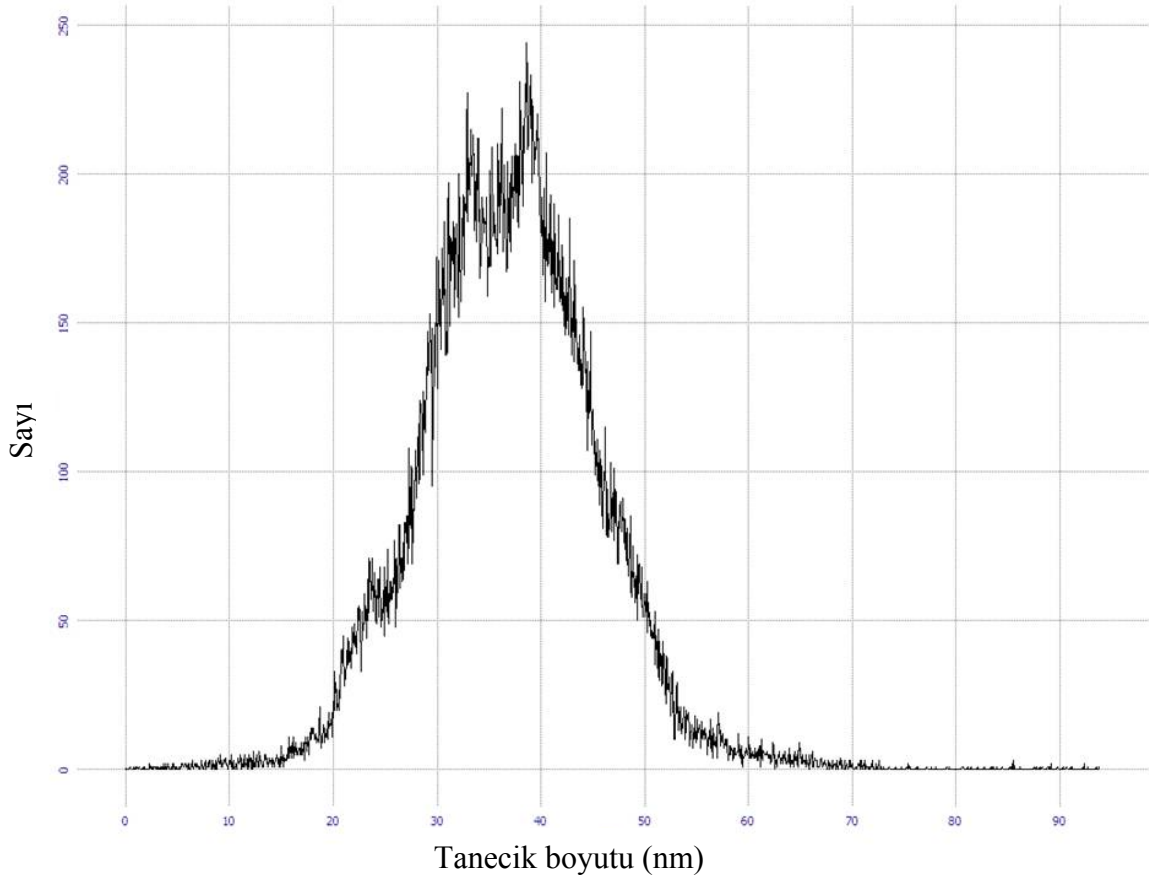


b)



Şekil 4.20 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil kitosan örneğinin: a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri

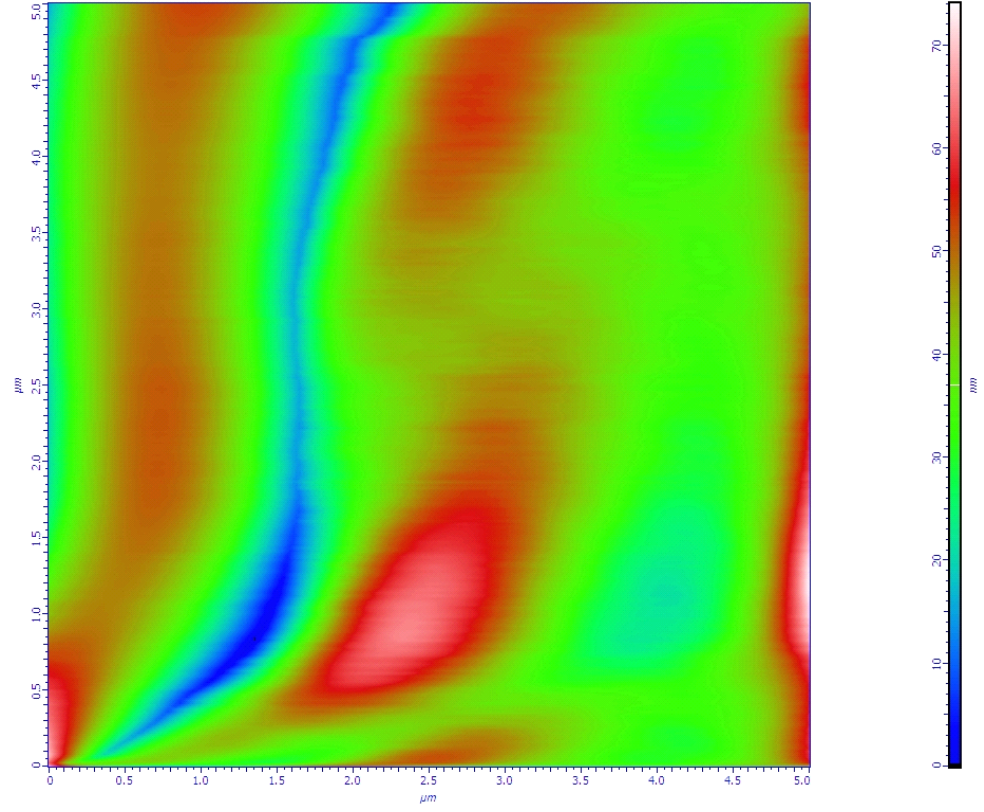
Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı verilmiştir (Şekil 4.21). Örnekteki taneciklerin çoğunun 35-40 nm aralığında olduğu ve ortalama pürüzlülük değerinin 6.5 nm olduğu saptanmıştır.



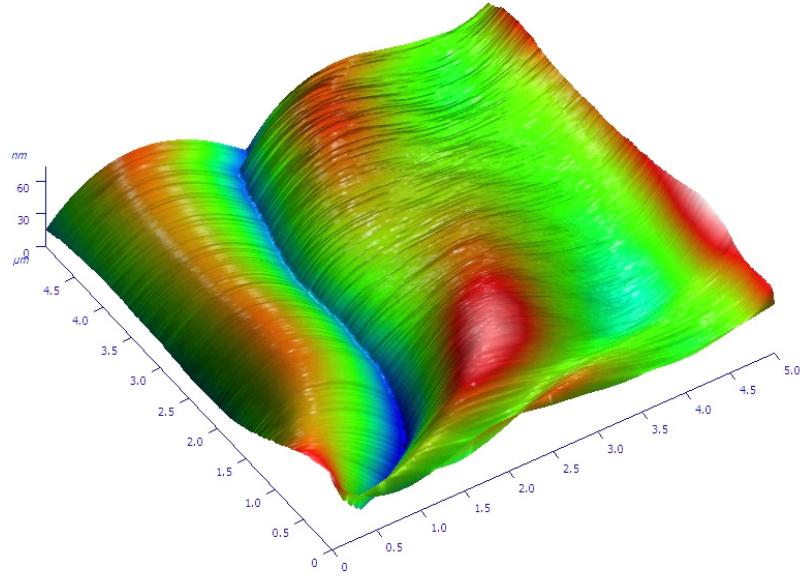
Şekil 4.21 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı

Ultrasonik etki ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri görülmektedir (Şekil 4.22). Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyutunun ortalama değerinin 39 nm olduğu belirlenmiştir.

a)

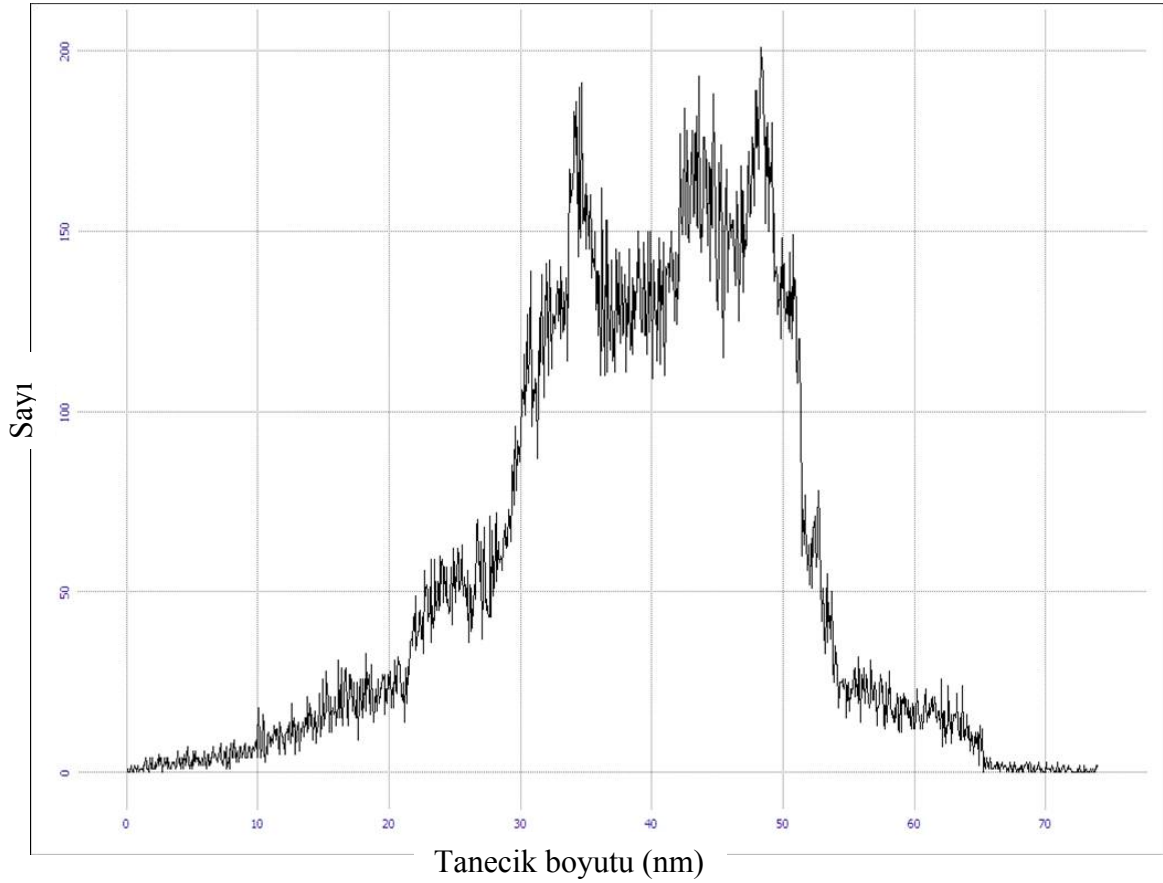


b)



Şekil 4.22 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan Örneğinin: a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri

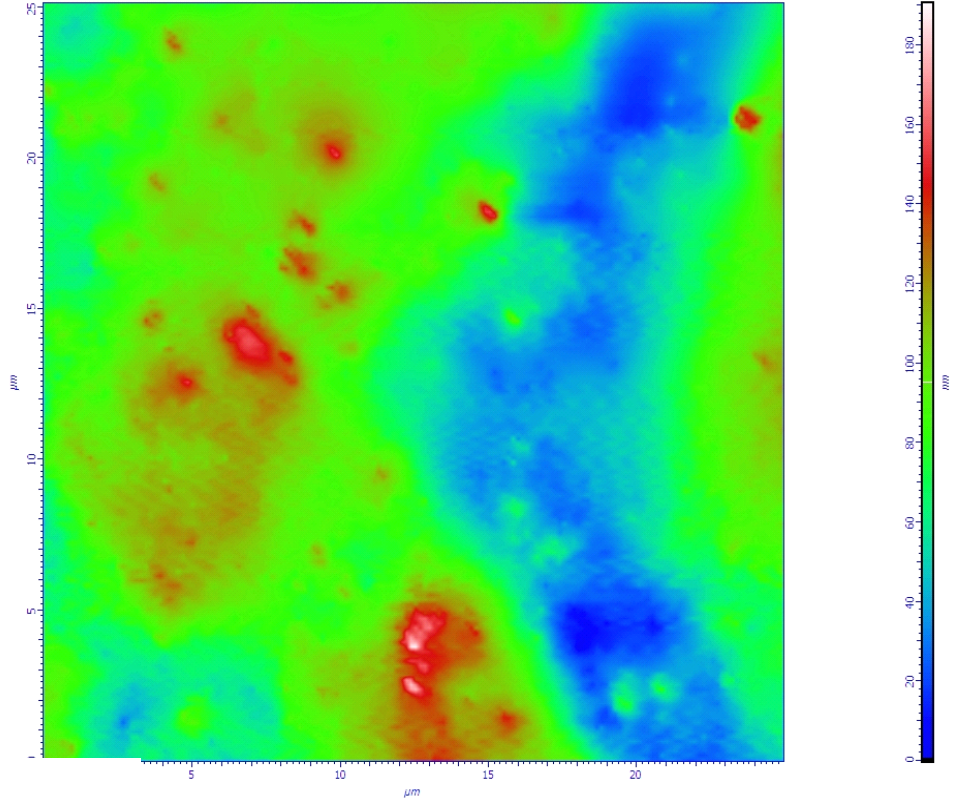
Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı verilmiştir (Şekil 4.23). Örnekteki taneciklerin çoğunun 35-50 nm aralığında olduğu ve ortalama pürüzlülük değerinin 8.4 nm olduğu saptanmıştır.



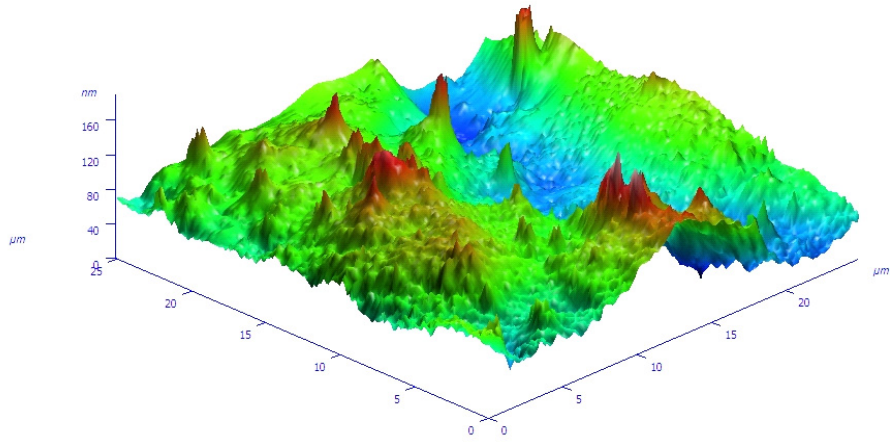
Şekil 4.23 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı

İyonik jelleşme tekniği ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri görülmektedir (Şekil 4.24). İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyutunun ortalama değerinin ise 76 nm olduğu belirlenmiştir.

a)

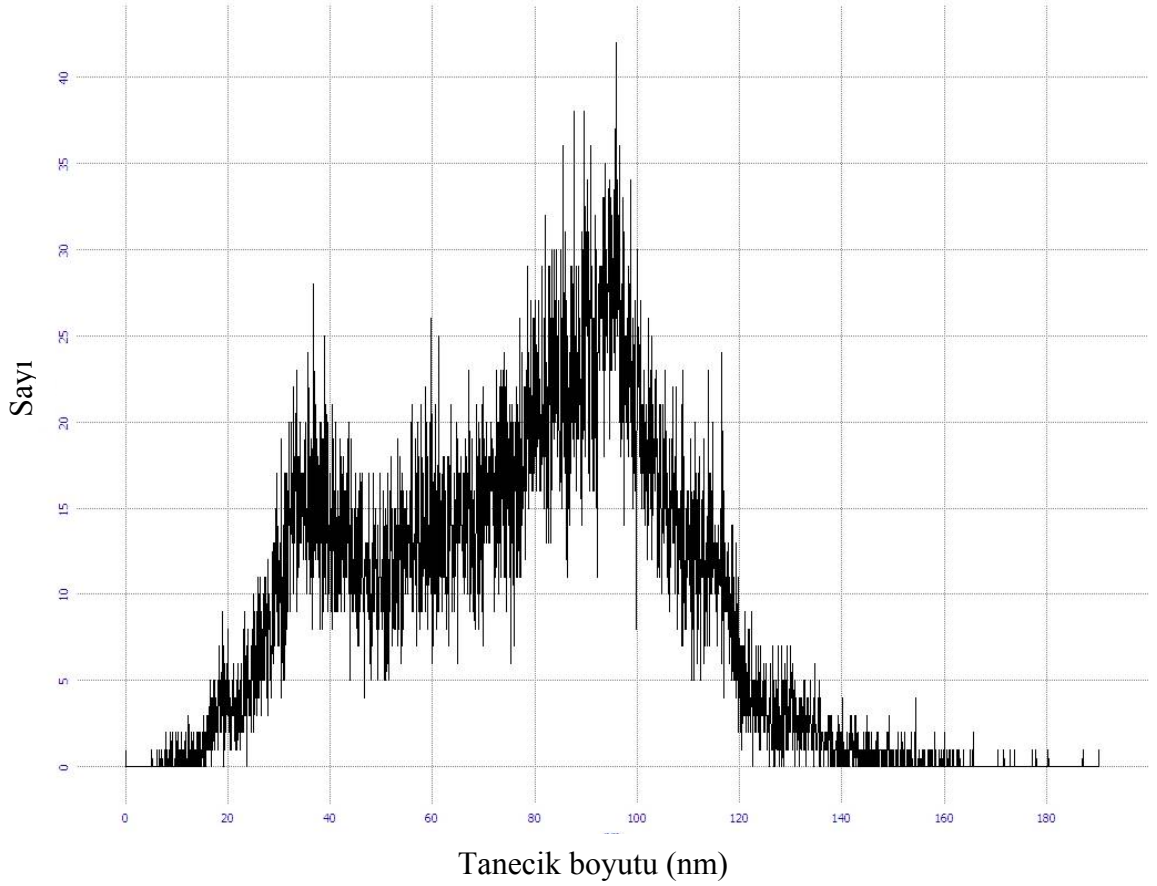


b)



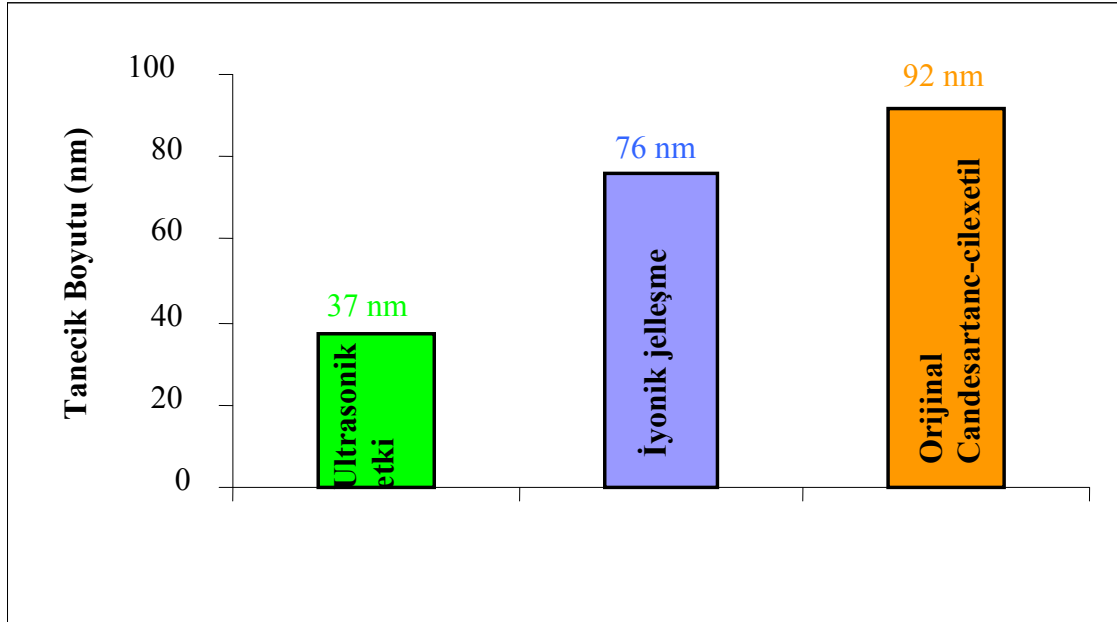
Şekil 4.24 İyonik jelleşme yöntemi ile *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin: a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri

İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı verilmiştir (Şekil 4.25). Örnekteki taneciklerin çoğunun 40-100 nm aralığında olduğu ve ortalama pürüzlülük değerinin 23.6 nm olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.25 İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı

Ultrasonik etki ve iyonik jelleşme yöntemleri ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü nanokitosan örnekleri tanecik boyutları orijinal *candesartan-cilexetil* ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.26).



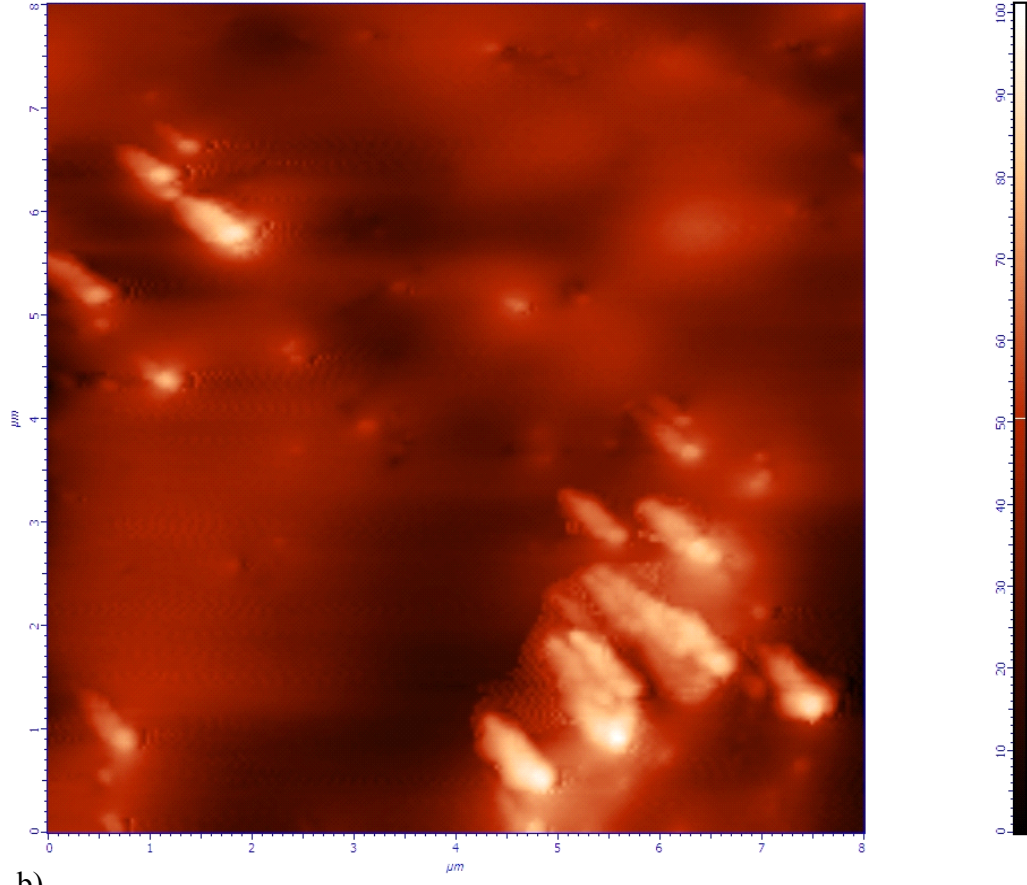
Şekil 4.26 *Candesartan-cilexetil* yüklü nanokitosan örnekleri tanecik boyutlarının karşılaştırılması

Candesartan-cilexetil ultrasonik etki yöntemi ile yüklendiğinde iyonik jelleşme ile yüklenmesine oranla daha küçük tane boyutu vermiştir (Şekil 4.26).

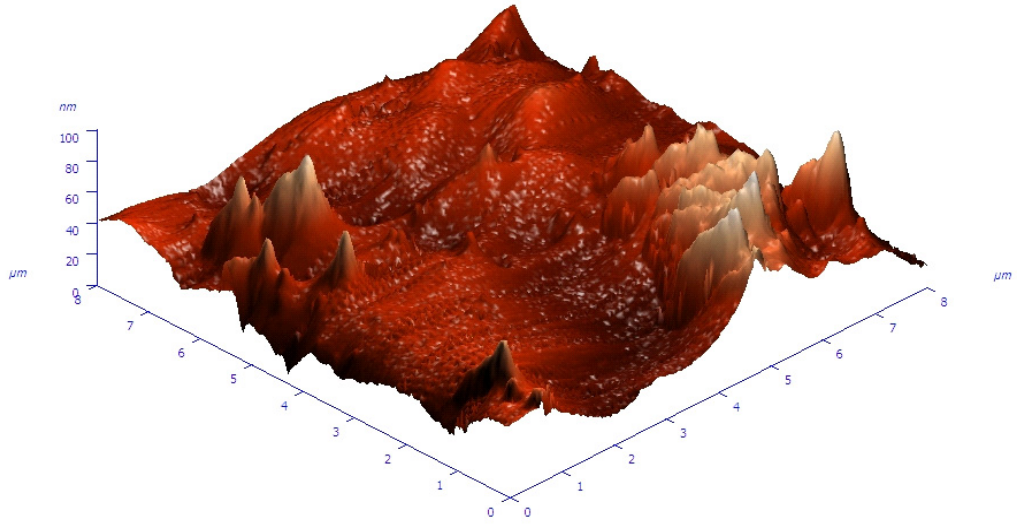
4.2.3.3 *Candesartan* yüklü trimetil nanokitosan AFM sonuçları

Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan* yüklü trimetil kitosan örneğinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri görülmektedir (Şekil 4.27). Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyutunun ortalama değerinin 38 nm olduğu belirlenmiştir.

a)

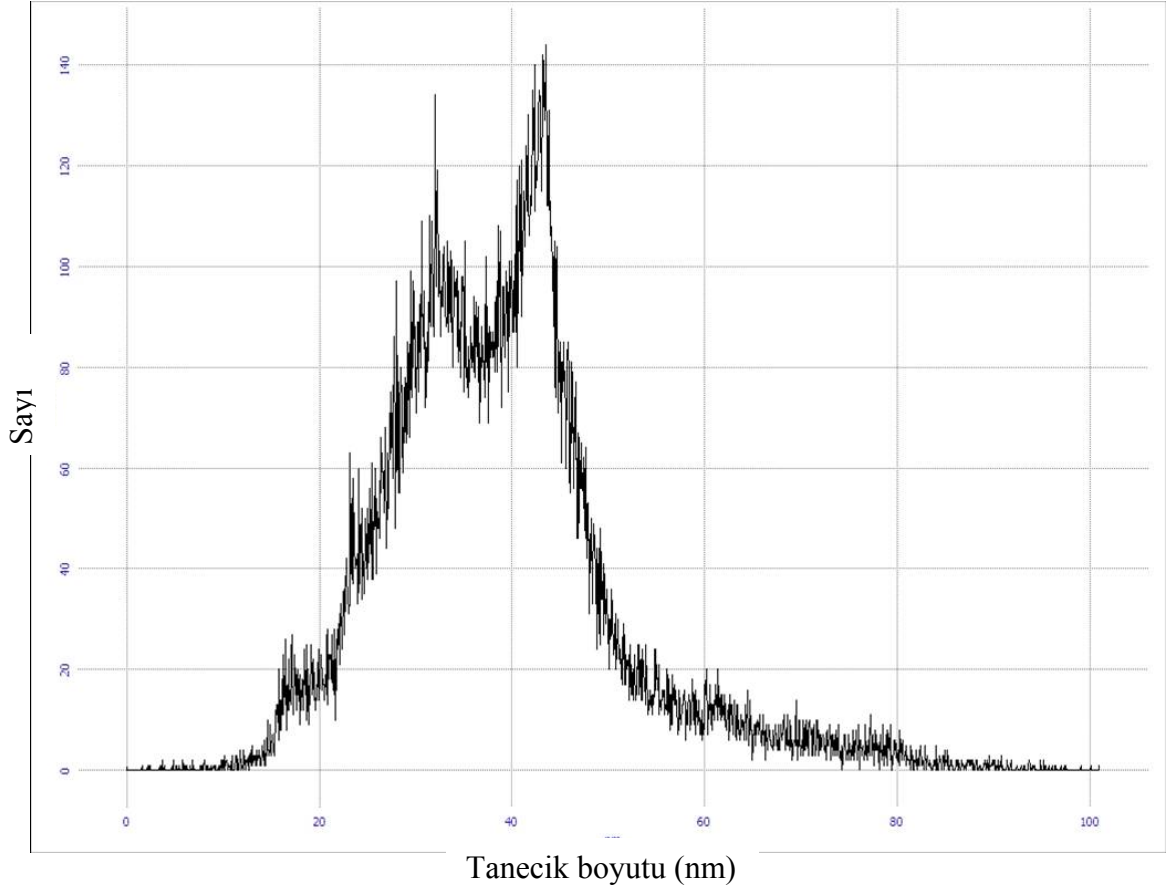


b)



Şekil 4.27 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan* yüklü trimetil kitosan örneğinin: a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri

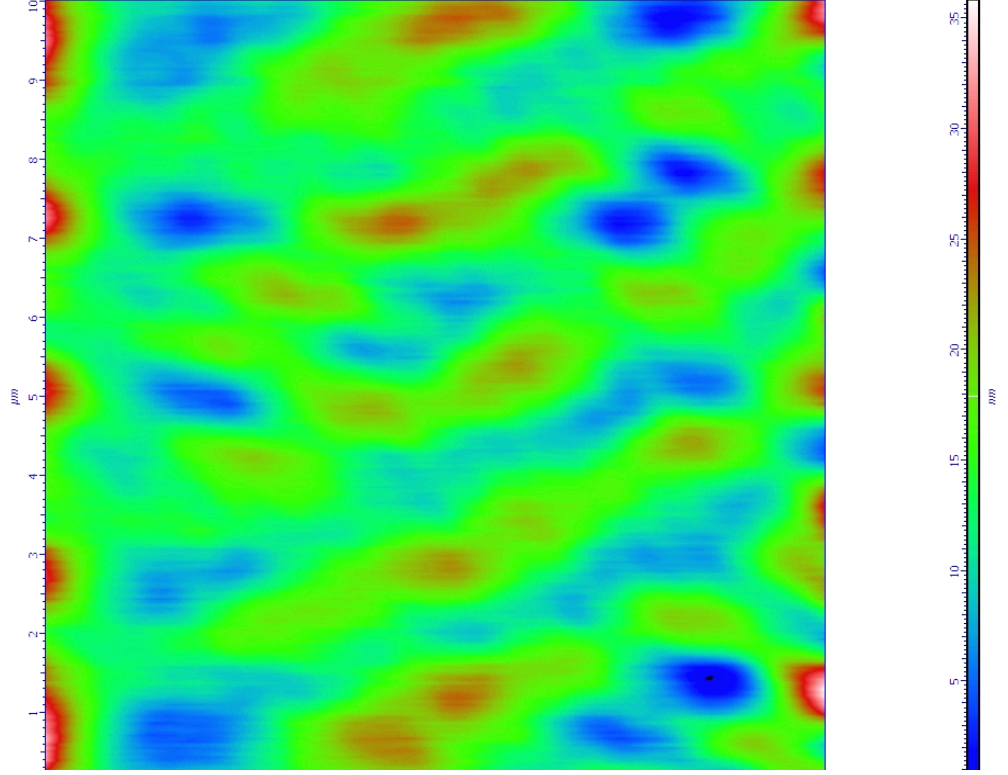
Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı verilmiştir (Şekil 4.28). Örnekteki taneciklerin çoğunun 35-45 nm aralığında olduğu ve ortalama pürüzlülük değerinin 8.9 nm olduğu saptanmıştır.



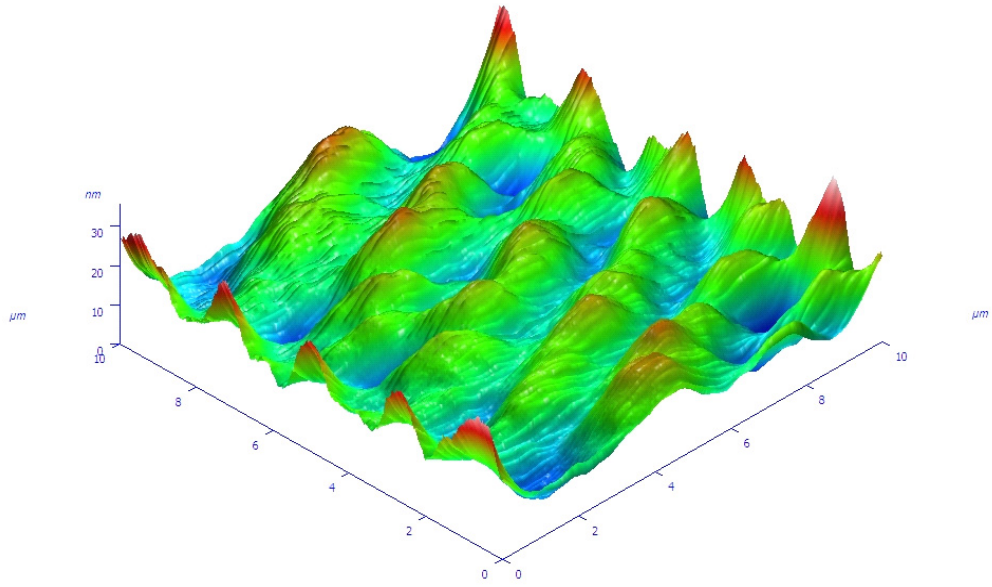
Şekil 4.28 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan* yüklü trimetil kitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı

Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan* yüklü trimetil nanokitosa örneğinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri görülmektedir (Şekil 4.29). Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosa örneğinin tanecik boyutunun ortalama değerinin 13 nm olduğu belirlenmiştir.

a)

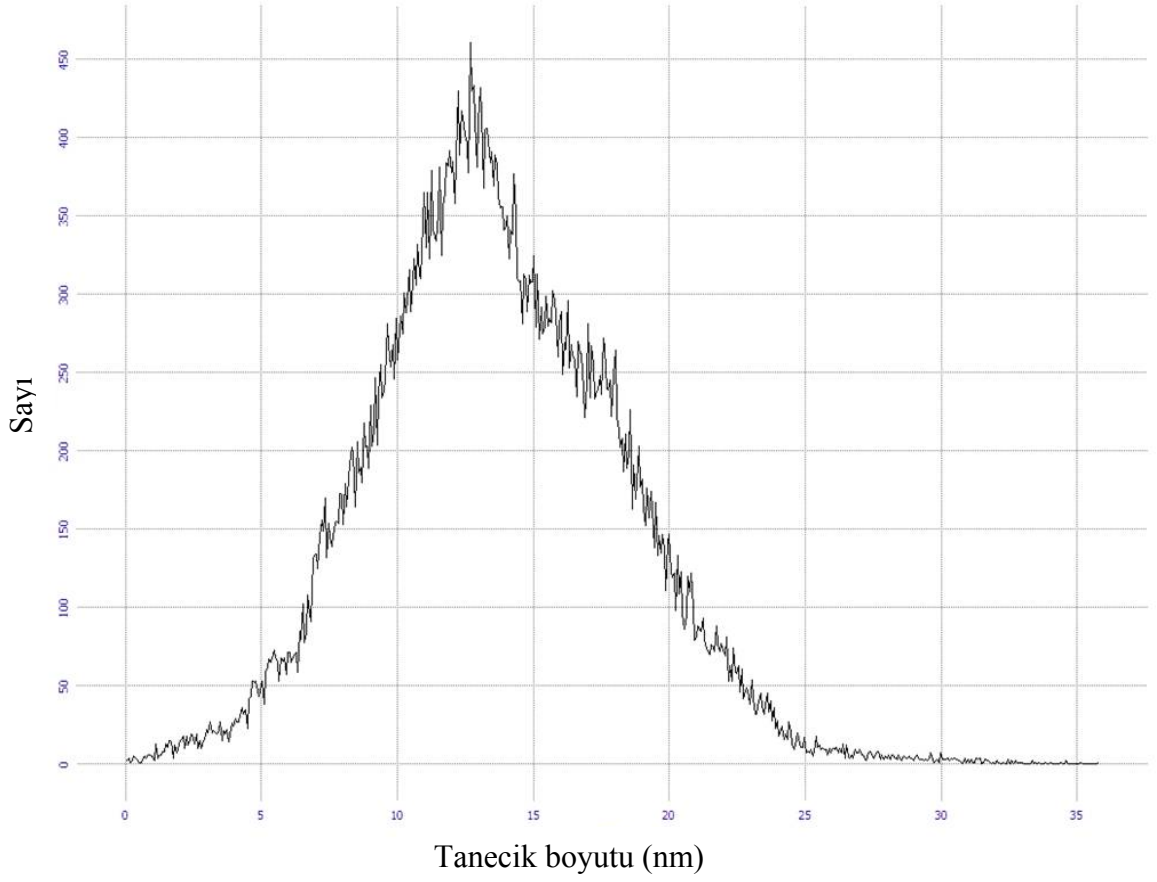


b)



Şekil 4.29 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin: a. iki boyutlu, b. üç boyutlu AFM görüntüleri

Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı verilmiştir (Şekil 4.30). Örnekteki taneciklerin çoğunun 10-15 nm aralığında olduğu ve ortalama pürüzlülük değerinin 3.5 nm olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.30 Ultrasonik etki yöntemi ile *candesartan* yüklü trimetil nanokitosan örneğinin tanecik boyut dağılımı

Candesartan yüklü örneklerin ortalama tane boyutu değerleri görülmektedir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 *Candesartan* yüklü örneklerin ortalama tane boyutu değerleri

Örnek	Ortalama tane boyutu
Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil kitosan	38 nm
Ultrasonik etki ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosan	13 nm
<i>Candesartan</i>	44 nm

Candesartan trimetil nanokitosa yüklendiğinde trimetil kitosa yüklenmesine oranla daha küçük tane boyutu elde edilmiştir.

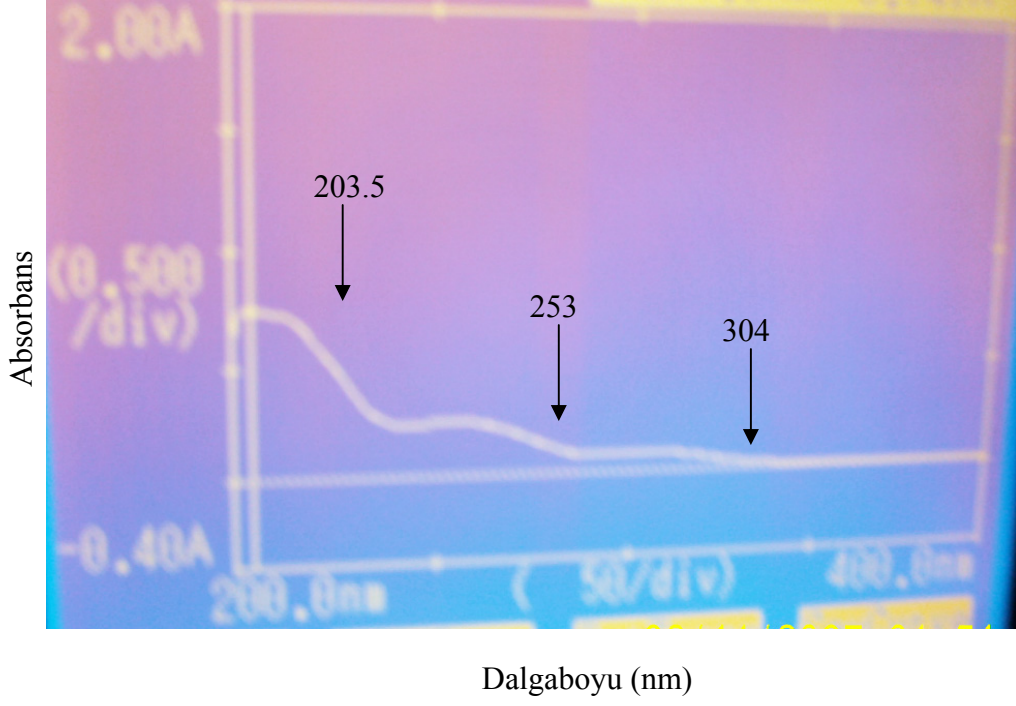
4.3 Nanokitosaın İlaç Çözünürlüğüne Etkisi

Trimetil nanokitosaın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi iki farklı analiz yöntemi ile (UV, HPLC) incelenmiştir. Karşılaştırma amacıyla trimetil kitosa, arap zankı ve ticari suda çözünür kitosa ile analizler tekrarlanmış ve sonuçlar trimetil nanokitosa ile elde edilen bulgular ile karşılaştırılmıştır.

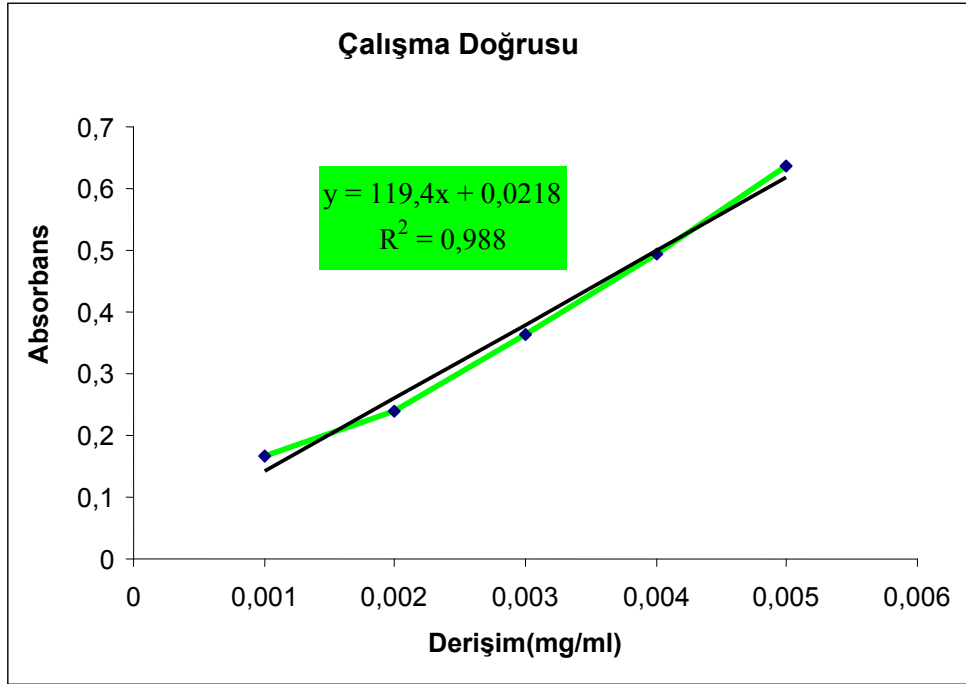
4.3.1 UV analizi sonuçları

*Candesartan-cilexetil*in spektrumu Şekil 4.31’de görülmektedir. *Candesartan-cilexetil* il 203.5, 253, 304 nm’de pikler vermiştir. Bu piklerden en yüksek absorbansa karşılık gelen dalga boyu 203.5 nm’dir. Katalog bilgilerine göre; *candesartan-cilexetil* 210 nm, 253 nm ve 304 nm’de pik vermektedir. *Candesartan-cilexetil*in UV spektrumu bulguları katalog bilgileri ile uyumludur; ancak düşük derişimli çözeltilerle çalışıldığından 210 nm’deki pik 203.5 nm’ye kaymıştır.

Farklı derişimlerdeki (0.005, 0.004, 0.003, 0.002, 0.001 mg/ml) *candesartan-cilexetil* çözeltilerinin absorbans değerleri UV ile 203.5 nm’de okunmuştur. Derişim değerlerine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiş ve *candesartan-cilexetil*in çalışma doğrusu çizilmiştir (Şekil 4.32).

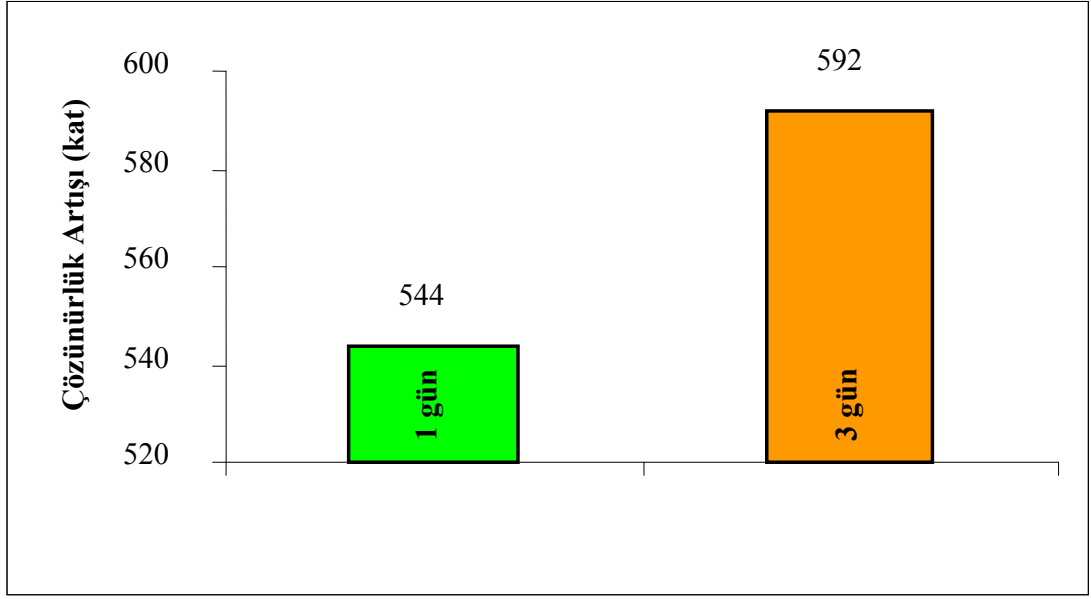


Şekil 4.31 Candесartan-cilexetilin metanolde UV spektrumu



Şekil 4.32 Candесartan-cilexetilin çalışma doğrusu

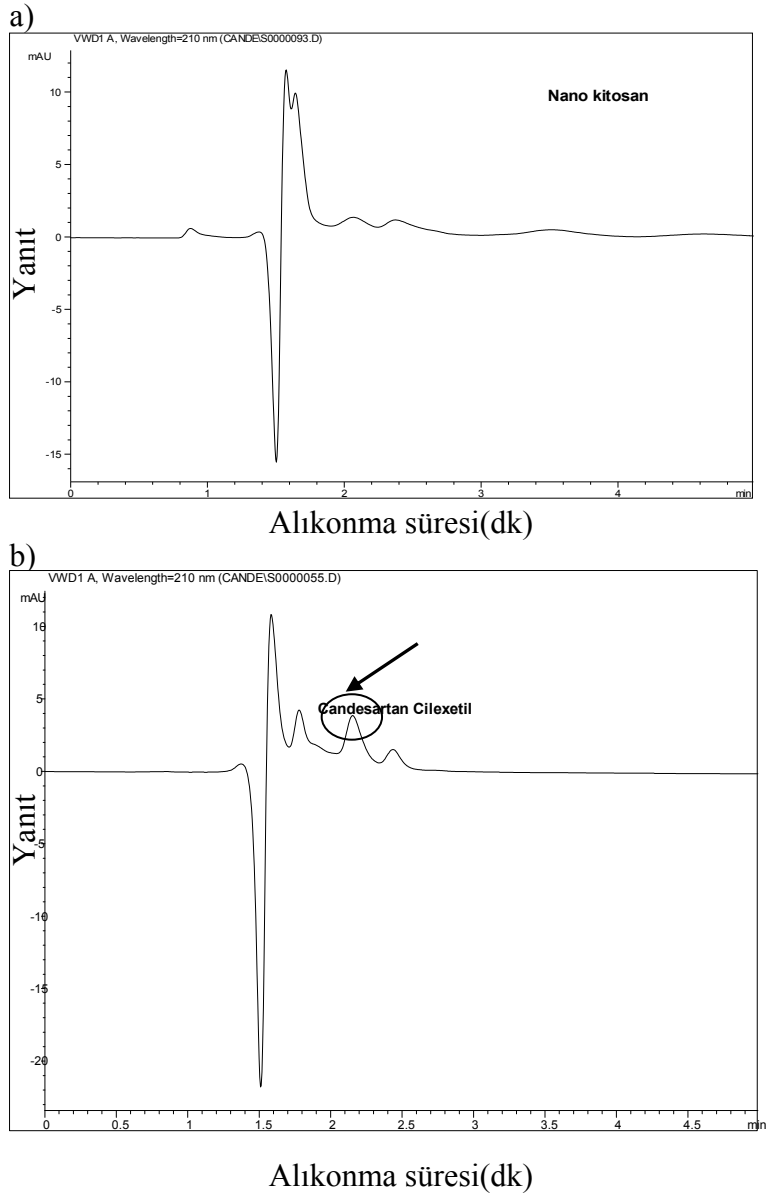
Trimetil nanokitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi incelenmiştir (Şekil 4.33). En yüksek trimetil nanokitosan miktarı ile (80 mg) *candesartan-cilexetil*in çözünürlüğünün sudaki çözünürlüğüne göre (2.5×10^{-4} mg/ml) 1 gün süreyle 544 kez arttığı, 3 gün süreyle ise 592 kez arttığı belirlenmiştir. *Candesartan-cilexetil* ve trimetil nanokitosanın etkileşim süresi ilacın çözünürlüğünü artırmıştır.



Şekil 4.33 Trimetil nanokitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi

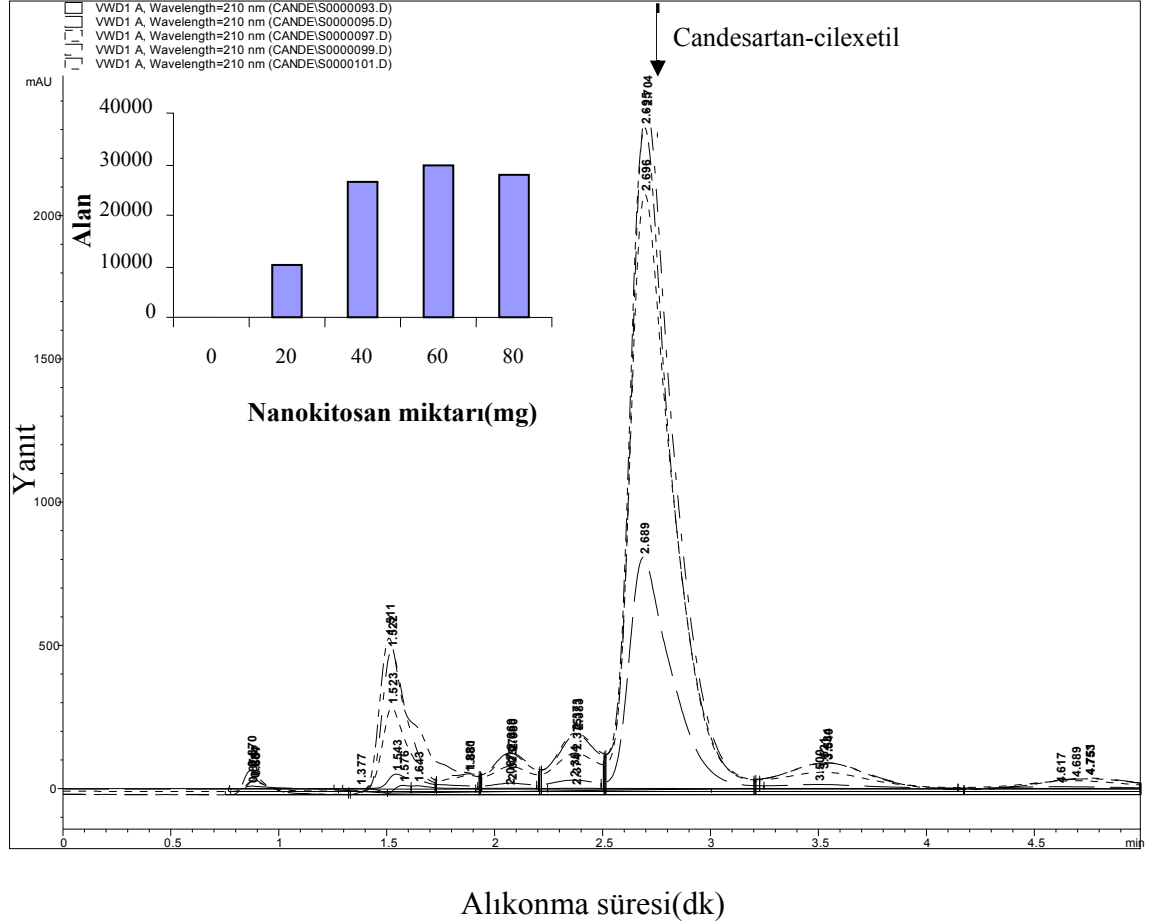
4.3.2 HPLC analizi sonuçları

Trimetil nanokitosan ve *candesartan-cilexetilin* sudaki kromatogramları Şekil 4.34'de görülmektedir. Trimetil nanokitosan 210 nm'de pik vermemiştir.



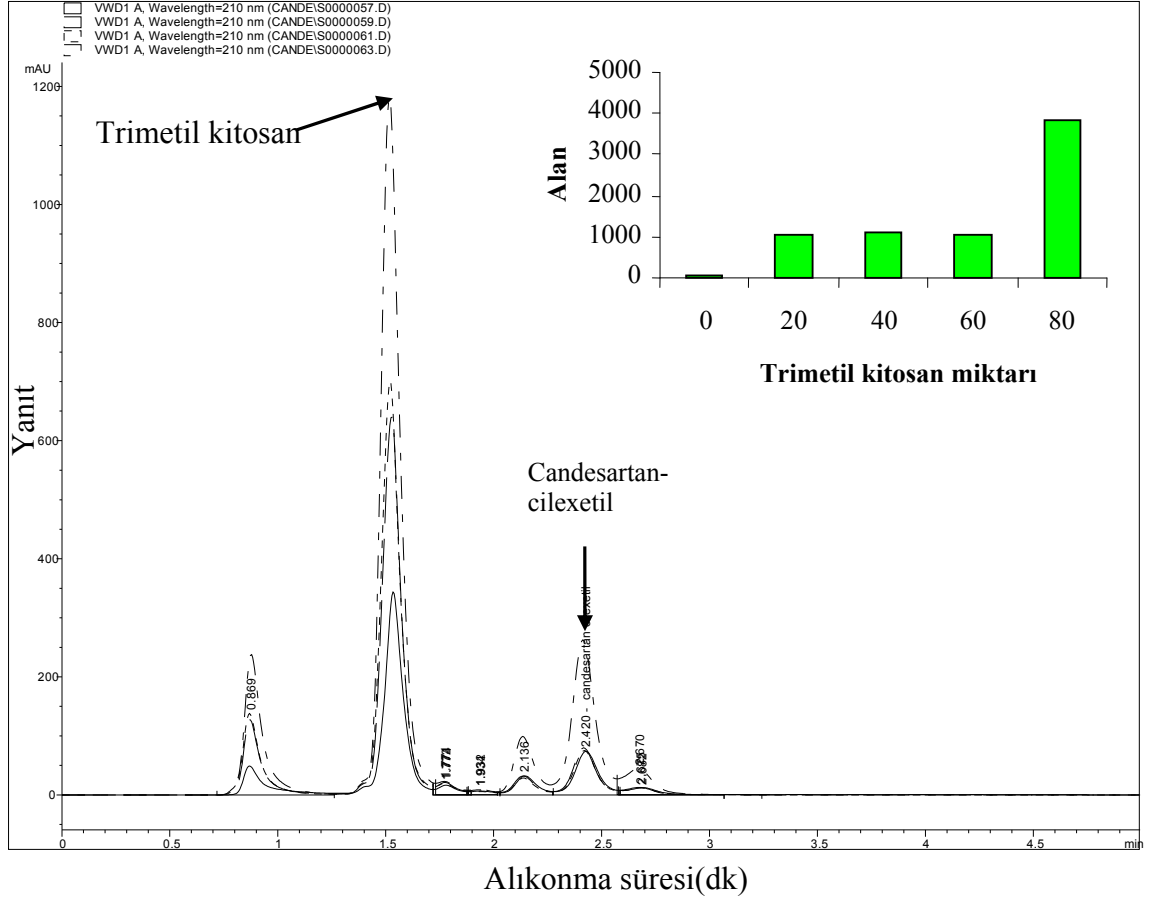
Şekil 4.34.a. Trimetil nanokitosan, b. *Candesartan-cilexetilin* sudaki kromatogramları

İlaç yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin kromatogramları Şekil 4.35’de görülmektedir. İlaç miktarı sabit olmak üzere trimetil nanokitosan miktarının artmasıyla ilaç pik alanının arttığı saptanmıştır. Bu sonuç trimetil nanokitosanın ilaç çözünürlüğünü artırdığını göstermiştir (Şekil 4.35).



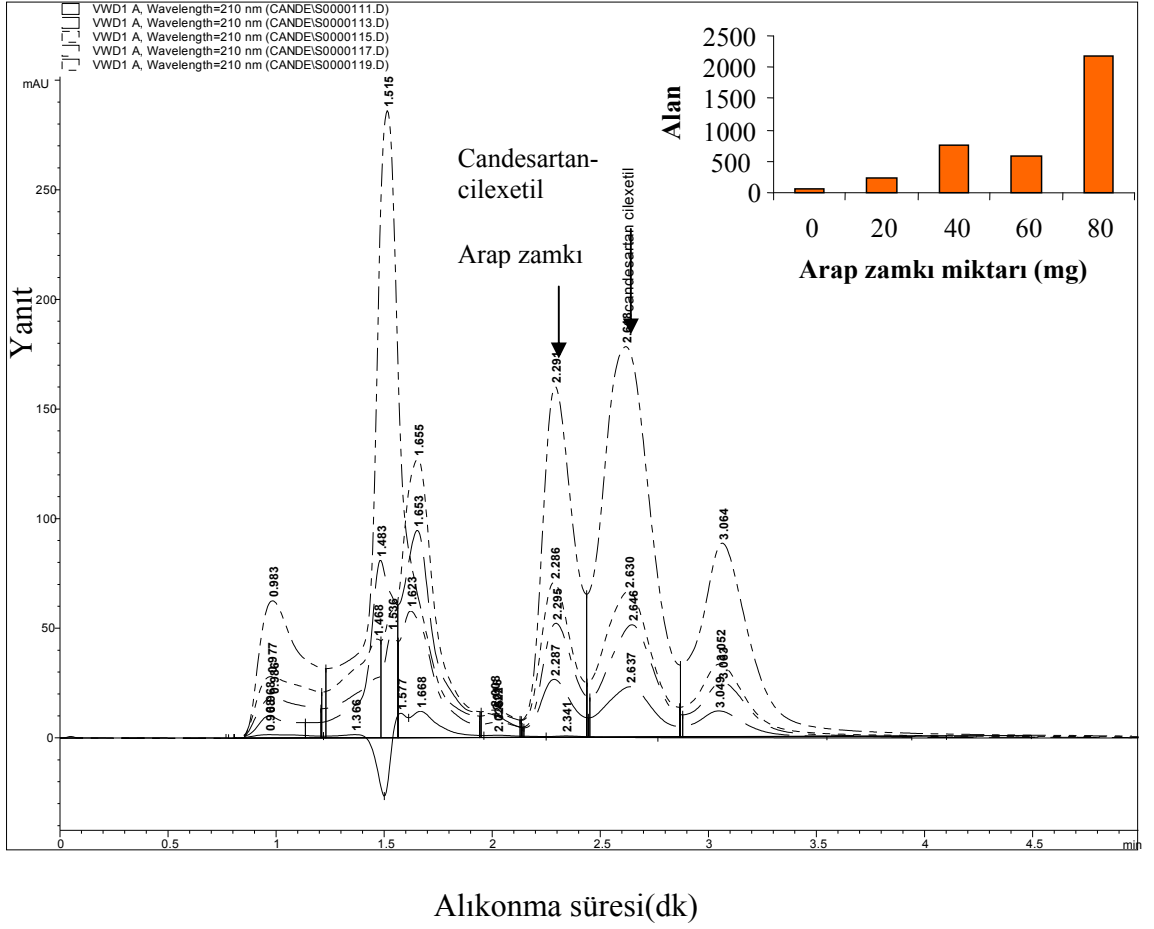
Şekil 4.35 İlaç yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin kromatogramları

İlaç yüklü trimetil kitosan örneklerinin kromatogramları Şekil 4.36’da görülmektedir. İlaç miktarı sabit olmak üzere trimetil kitosan miktarının artmasıyla ilaç pik alanının arttığı saptanmıştır. Bu sonuç trimetil kitosanın ilaç çözünürlüğünü artırdığını göstermiştir (Şekil 4.36).



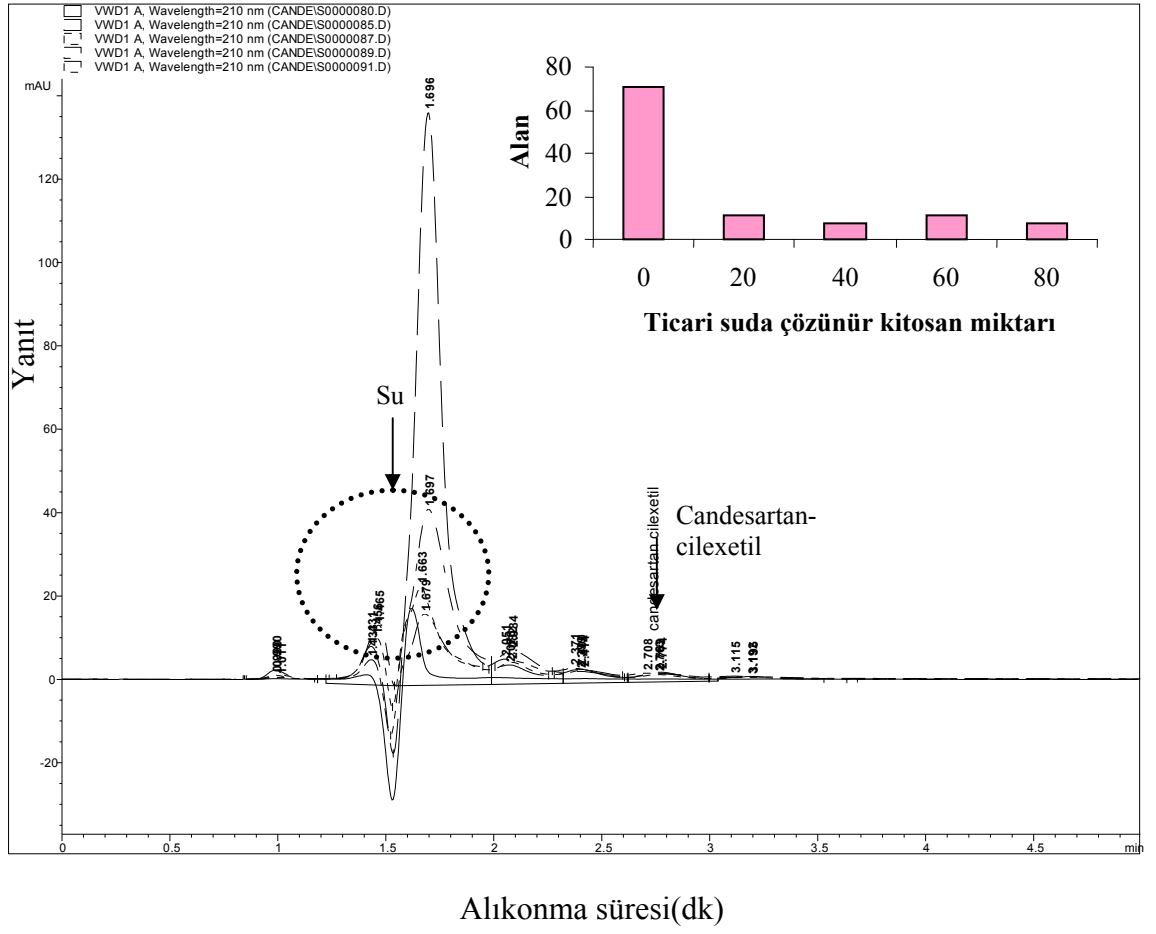
Şekil 4.36 İlaç yüklü trimetil kitosan örneklerinin kromatogramları

İlaç yüklü arap zankı örneklerinin kromatogramları Şekil 4.37’de görülmektedir. İlaç miktarı sabit olmak üzere arap zankı miktarının artmasıyla ilaç pik alanının arttığı saptanmıştır. Bu sonuç arap zankının ilaç çözünürlüğünü artırdığını göstermiştir (Şekil 4.37).



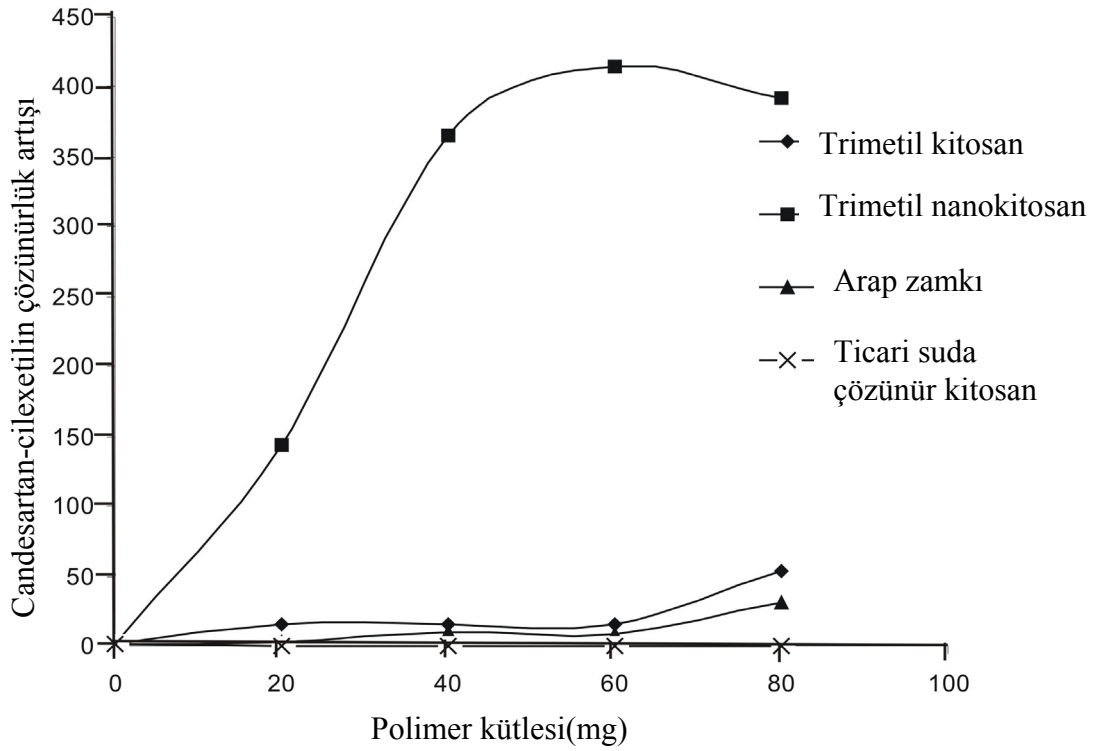
Şekil 4.37 İlaç yüklü arap zamkı örneklerinin kromatogramları

İlaç yüklü ticari suda çözünür kitosan örneklerinin kromatogramları Şekil 4.38’de görülmektedir. İlaç miktarı sabit olmak üzere ticari suda çözünür kitosan miktarının artmasıyla ilaç pik alanının azaldığı saptanmıştır. Bu sonuç ticari suda çözünür kitosanın ilaç çözünürlüğünü artırmadığını göstermiştir (Şekil 4.38).



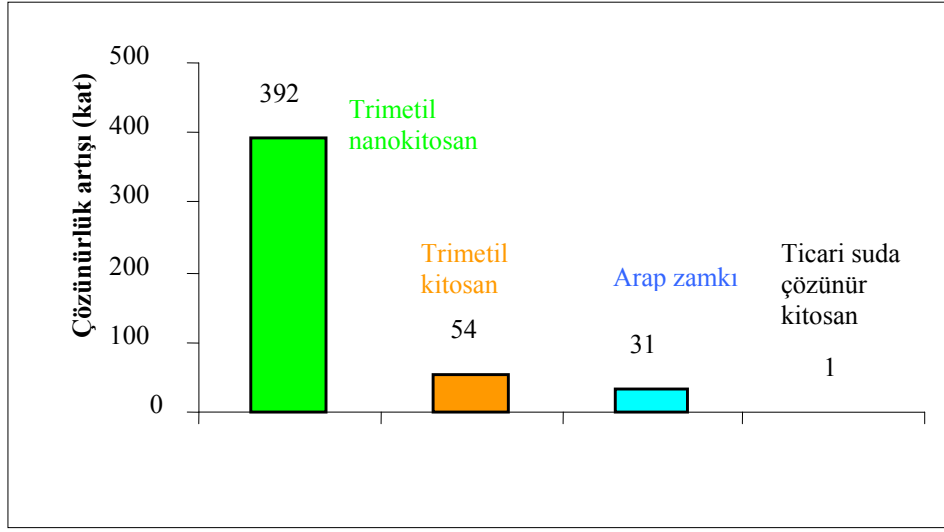
Şekil 4.38 İlaç yüklü ticari suda çözünür kitosan örneklerinin kromatogramları

Trimetil nanokitosanın *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğünü artırmada trimetil kitosana ve arap zankına göre 10 kat daha etkin olduğu saptanmıştır. Ticari suda çözünür kitosanın ise *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğünü artırmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39 HPLC sonuçlarından elde edilen çözünürlük artış miktarlarının karşılaştırılması

HPLC ile yapılan çözünürlük deneyi sonuçlarına göre suda çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğünü artırmada sıralamanın trimetil nanokitosan>trimetil kitosan>arap zamkı>ticari suda çözünür kitosan şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.40).



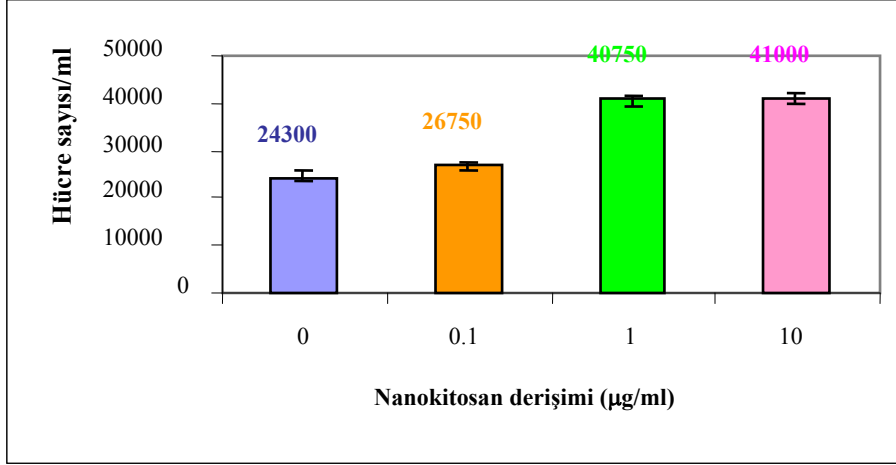
Şekil 4.40 *Candesartan-cilexetilin* çözünürlüğünü artırmada sıralama

UV çözünürlük deneylerinden elde edilen süzüntüde metanol varlığı UV sonuçlarının HPLC sonuçlarına göre daha yüksek çıkmasına neden olmuştur. Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosan karşılaştırıldığında kitosanın boyutu azaldıkça ilacın çözünürlüğünün arttığı belirlenmiştir.

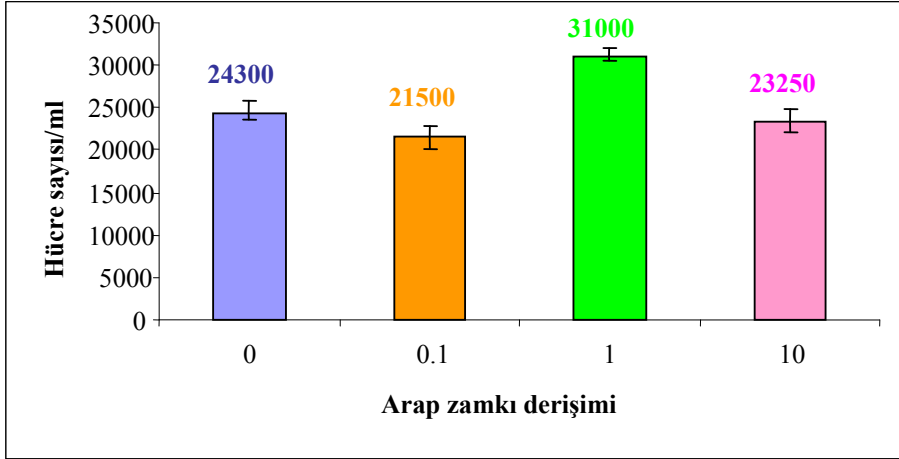
4.4 Nanokitosanın hücre canlılığına etkisi

Nanokitosan ve arap zamkının 37°C’de 3 h inkübasyonu sonucunda kalp kası hücre canlılığına etkisi Şekil 4.41’de görülmektedir.

a)



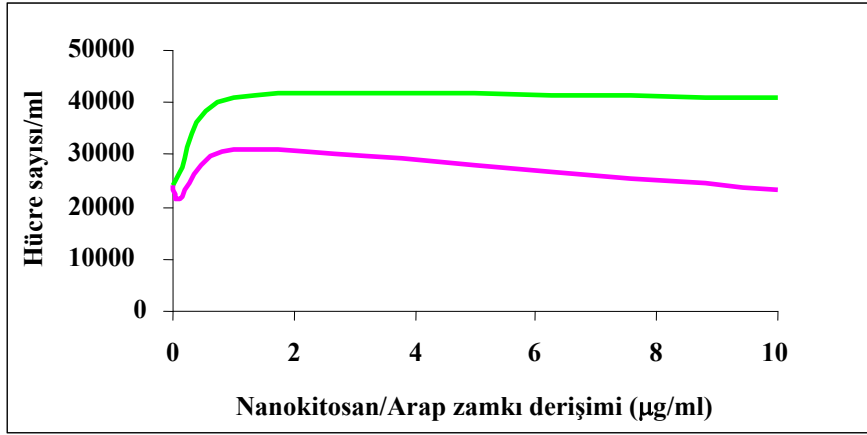
b)



Şekil 4.41.a. Nanokitosan, ve b. arap zamkının hücre canlılığına etkisi

Nanokitosan; hücrenin süreye bağlı canlılığının korunmasını olumlu etkilemiştir (Şekil 4.41). Amidi vd. (2006)’nin çalışmasında trimetil nanokitosanın Calu-3 hücrelerine toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Trimetil nanokitosan ile hücre canlılığı deneyi sonuçları Amidi vd. 2006 ile uyumludur. Trimetil nanokitosanın hücre canlılığına

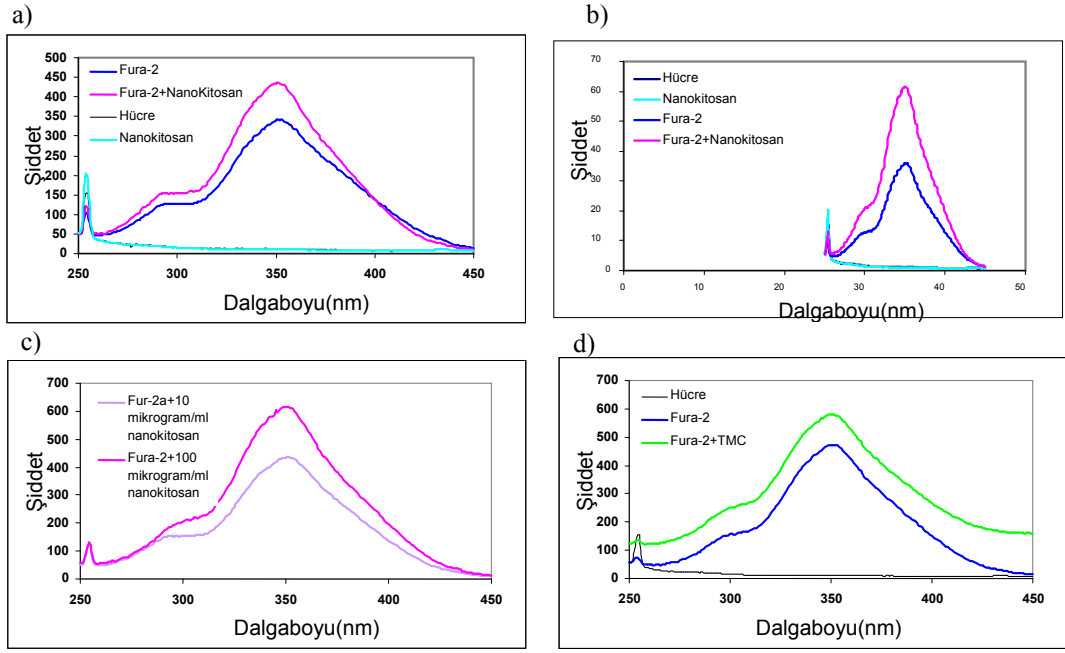
etkisinin arap zamkının hücre canlılığına etkisine göre daha iyi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.42 Nanokitosan ve arap zamkının hücre canlılığına etkisinin karşılaştırılması

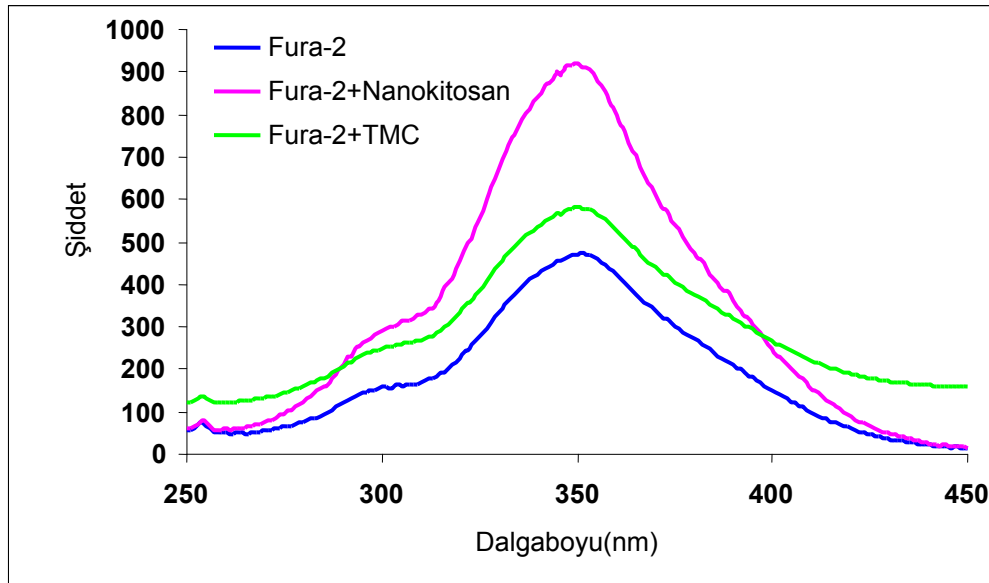
4.5 Nanokitosanın Hücreye Floresan boya (Fura-2) Girişine Etkisi

Hücreye giremeyen bir floresan boyanın (Fura-2) hücreye (memeli fibroblast kültür hücresi; LTK8) girişine trimetil nanokitosan (10 µg/ml ve 100 µg/ml) ve trimetil kitosan (100 µg/ml) etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.43'de gösterilmiştir. Tüm örnekler izolasyon sıvısı içindedir ve eşit miktarda hücre içermektedir. Hücreler direk nanokitosana maruz kaldıklarında ya da tek başına olduklarında floresan ışığa gözlenmemiştir. Hücre ve nanokitosan-hücre süspansiyonu Fura-2 ile boyandığında nanokitosan-hücre süspansiyonunda hücreye fazla floresan boya yüklendiği saptanmıştır (Şekil 4.43.a). 100 µg/ml nanokitosan derişimi ile ise yaklaşık 2 kat Fura-2 yüklendiği gözlenmiştir (Şekil 4.43.b). Nanokitosan derişiminin artması hücreye floresan boya yüklenmesini artırmıştır (Şekil 4.43.c). Hücre ve trimetil kitosan-hücre süspansiyonu Fura-2 ile boyandığında trimetil kitosanın hücreye Fura-2 yüklenmesini etkilemediği saptanmıştır (Şekil 4.43.d).



Şekil 4.43. a.10 µg/ml nanokitosanın, b.100 µg/ml nanokitosanın, c.nanokitosan derişiminin, d.100 µg/ml trimetil kitosanın hücreye floresan boya (Fura-2) girişine etkisi

Trimetil nanokitosanın ve trimetil kitosanın hücreye floresan boya girişine etkisi karşılaştırılmıştır (Şekil 4.44) Trimetil nanokitosan Fura-2 boyasının hücreye yüklenmesini kolaylaştırmıştır.



Şekil 4.44 Trimetil kitosanın (100 µg/ml) ve trimetil nanokitosanın (100 µg/ml) Fura-2'nin hücreye girişine etkilerinin karşılaştırılması

5. SONUÇLAR

Bu doktora çalışmasında; trimetil nanokitosanın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sırasıyla suda iyi çözünen nanokitosan sentezi ve karakterizasyonu, ilaç yükleme ve ilaç yüklü örneklerin karakterizasyonu, nanokitosanın ilaç çözünürlüğüne etkisinin saptanması, nanokitosanın hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi, nanokitosanın hücreye Fura-2 floresan boyasının girişine etkisinin incelenmesi aşamalarından oluşmaktadır.

I. Suda İyi Çözünen Nanokitosan Karakterizasyon Bulguları

- 1) FTIR analizi ile kitosana metil gruplarının bağlandığı belirlenmiştir.
- 2) NMR analizi ile kitosana trimetil grubunun bağlandığı saptanmıştır. Sentezlenen trimetil kitosanın kuaternizasyon derecesi % 60 olarak hesaplanmıştır.
- 3) SEM analizi ile trimetil kitosanın boyutunun 1-3 µm arasında olduğu belirlenmiştir.
- 4) TEM analizi ile trimetil nanokitosan taneciklerinin %86'sının 250 nm'den küçük olduğu saptanmıştır.
- 5) DLS analizi ile trimetil kitosanın etanoldeki ortalama boyutunun 1.4 µm, trimetil nanokitosanın ortalama boyutunun ise etanolde 220 nm, HEPES'de 295 nm olduğu belirlenmiştir. Bu değerler yapılan TEM ve SEM sonuçları ile uyumludur.

II. İlaç Yüklü Örneklerin Karakterizasyon Bulguları

- 1) Ultrasonik etki ve iyonik jelleşme yöntemleri ile sentezlenen ilaç yüklü örneklerin yükleme etkinlikleri HPLC analizi ile % 66 olarak bulunmuştur.
- 2) Ultrasonik etki ve iyonik jelleşme yöntemleri ile sentezlenen ilaç yüklü örneklerde *candesartan-cilexetilin* trimetil nanokitosan ve trimetil kitosana fiziksel olarak tutunduğu FTIR analizi ile belirlenmiştir.

3) *Candesartan-cilexetil* yüklü trimetil nanokitosan örneklerinde ultrasonik etki yönteminin iyonik jelleşme yöntemine göre küçük parçacık boyutu verdiği AFM analizi ile belirlenmiştir.

III. Nanokitosanın ilaç çözünürlüğüne etkisi

- 1) UV analizi sonuçlarına göre kitosan ile *candesartan-cilexetil* ilacının etkileşim süresi arttıkça ilacın çözünürlüğü artmıştır.
- 2) UV analizi ve HPLC analizi sonuçlarına göre kitosan miktarı arttıkça ve kitosan boyutu azaldıkça ilacın çözünürlüğü artmıştır.
- 3) UV analizi ve HPLC analizi sonuçlarına göre suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğünü artırmada sıralamanın trimetil nanokitosan>trimetil kitosan>arap zankı> ticari suda çözünür kitosan şeklinde olduğu belirlenmiştir.
- 4) Suda çözünen nanokitosanın suda iyi çözünmeyen *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğünü artırdığı (yaklaşık 400 kat) saptanmıştır.

IV. Hücre canlılığı sonuçları

- 1) Suda çözünen nanokitosanın hücrenin süreye bağlı canlılığının korunmasını olumlu etkilediği belirlenmiştir.
- 2) Trimetil nanokitosanın hücre canlılığına etkisinin arap zankı ile karşılaştırıldığında daha iyi olduğu görülmüştür.

V. Nanokitosanın hücreye Fura-2 boyasının girişine etkisi

- 1) Trimetil nanokitosan Fura-2 boyasının hücreye yüklenmesini sağlamıştır.
- 2) Nanokitosan derişiminin artması hücreye Fura-2 yüklenmesini artırmıştır. 100 µg/ml nanokitosan derişimi ile yaklaşık 2 kat floresan boya yüklendiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Amidi, M., Romeijn, S. G., Borchard, G., Junginger, H. E., Hennink W. E. and Jiskoot, W. 2006. Preparation and characterization of protein-loaded *N*-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, 111, 107–116.
- Amidi, M., Romeijn, S. G., Verhoef, J. C., Junginger, H. E., Bungener, L., Huckriede, A., Crommelin, D. J. A. and Jiskoot, W. 2007. *N*-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse. *Vaccine*, 25, 144–153.
- Anonymous. 2009. Web Sitesi: [http:// www.rxlist.com/cgi/generic/candesar.htm](http://www.rxlist.com/cgi/generic/candesar.htm), Erişim Tarihi: 11 Eylül 2009
- Anonymous. 2010. Web Sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Candesartan>, Erişim Tarihi: 12 Şubat 2010
- Avadi, M. R., Zohuriaan-Mehr, M. J., Younessi, P., Amini, M., Tehrani, M. R. and Shafiee, A. 2003. Optimized Synthesis and Characterization of *N*-Triethyl Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 18, 469-479.
- Bodmeier, R. and Paeratakul, O. 1989. Spherical Agglomerates of Water-Insoluble Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78, 11, 964-967
- Britto, D., Campana-Filho, S. P. and Assis, O. B. G 2005. Mechanical Properties of *N,N,N*-trimethylchitosan Chloride Films. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, 2 142-145
- Britto, D. and Assis, B.G.O. 2007. A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 69, 305-310
- Cagigal, E., Gonza´lez, L., Alonso, R. M. and Jime´nez, R. M. 2001. pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 477–486
- Chen, F., Zhang, Z. and Huang, Y. 2007. Evaluation and modification of *N*-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 336, 166–173
- Chung, Y., Kuo, C. and Chen, C. 2005. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*, 96, 1473–1482
- Ding, Y., Xia, X. and Zhang, C. 2006. Synthesis of metallic nanoparticles protected with *N,N,N*-trimethyl chitosan chloride via a relatively weak affinity. *Nanotechnology*, 17, 4156–4162

- Duman, S. S. ve Şenel, S. 2004. Kitosan ve veteriner alandaki uygulamaları. *Veteriner Cerrahi Dergisi* 10(3-4), 62-72
- Francis, M. F., Cristea, M., Yang, Y. and Winnik, F. M. 2005. Engineering Polysaccharide-Based Polymeric Micelles to Enhance Permeability of Cyclosporin A Across Caco-2 Cells. *Pharmaceutical Research*, 22, 2, 209-219
- Hamman, J. H. and Kotze, A. F. 2001. Effect of the Type of Base and Number of Reaction Steps on the Degree of Quaternization and Molecular Weight of *N*-Trimethyl Chitosan Chloride. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(5), 373–380
- Hamman, J. H., Stander, M. and Kotze, A. F. 2002. Effect of the degree of quaternisation of *N*-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 235–242
- He, W., Du, Y., Dai, W., Wu, Y. and Zhang, M. 2006. Effects of *N*-trimethyl Chitosan Chloride as an Absorption Enhancer on Properties of Insulin Liquid Suppository In Vitro and In Vivo. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 3, 1140-1146.
- Jintapattanakit, A., Mao, S., Kissel, T. and Junyaprasert, V. B. 2008. Physicochemical properties and biocompatibility of *N*-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 2 563-571.
- Kean, T., Roth, S. and Thanou, M. 2005. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 103, 643-653
- Kim, D., Jeong, Y., Choi, C., Roh, S., Kang, S., Jang, M. and Nah, J. 2006a. Pharmaceutical Nanotechnology Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 319, 130–138.
- Kim, D-G, Choi, C., Jeong, Y., Jang, M., Nah, J., Kang, S. and Bang, M. 2006b. All-*trans* Retinoic Acid-Associated Low Molecular Weight Water-Soluble Chitosan Nanoparticles Based on Ion Complex. *Macromolecular Research*, 14, 1, 66-72.
- Lee, J., Cho, E. C. and Cho, K. 2004. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. *Journal of Controlled Release*, 94, 323– 335
- Li, D., Liu, L., Tian, K., Liu, J. and Fan, X. 2007. Synthesis, biodegradability and cytotoxicity of water-soluble isobutylchitosan. *Carbohydrate Polymers*, 67, 40–45
- Mao, Z., Ma, L., Yan, J., Yan, M., Gao, C. and Shen, J. 2007. The gene transfection

- efficiency of thermoresponsive N,N,N-trimethyl chitosan chloride-g-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer. *Biomaterials*, 28, 4488–4500.
- Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G. G. and Cooper E. R. 2003. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 113–120
- Miao, J., Chen, G., Gao, C., Lin, C., Wang, D. and Sun, M. 2006. Preparation and characterization of *N,O*-carboxymethyl chitosan (NOCC)/polysulfone (PS) composite nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 280, 478–484.
- Miyabayashi, T., Okuda, T., Motohashi, M., Izawa, K. and Yashiki, T. 1996. Quantitation of a new potent angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, and its metabolites in human serum and urine. *Journal of Chromatography B*, 677, 123-132
- Plessis, L. H., Lubbe, J. Strauss, T. and Kotzé, A.F. 2010. Enhancement of nasal and intestinal calcitonin delivery by the novel Pheroid™ fatty acid based delivery system, and by *N*-trimethyl chitosan chloride. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 1-2, 181-186.
- Ozdemir, S., Ugur, M., Gürdal, H. and Turan, B. 2005. Treatment with AT1 receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca²⁺ transients and contractile function of rat myocardium, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435, 166–174.
- Portero, A., Remunan-Lopez, C. and Vila-Jato, J. L. 1998. Effect of chitosan and chitosan glutamate enhancing the dissolution properties of the poorly water soluble drug nifedipine. *International Journal of Pharmaceutics*, 175, 75-84
- Qutab, S. S., Razzaq, S. N., Ashfaq, M., Shuja, Z. A. and Khan, I. U. 2007. Simple and sensitive LC–UV method for simultaneous analysis of hydrochlorothiazide and candesartan cilexetil in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*, 19, 119-129
- Satturwar, P., Edine, M. N., Ravenelle, F. and Leroux, J. C. 2007. pH-responsive polymeric micelles of poly(ethylene glycol)-b-poly(alkyl(meth)acrylate-co-methacrylic acid): Influence of the copolymer composition on self-assembling properties and release of *candesartan- cilexetil*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 379–387
- Sayın, B., Somavarapu, S., Li, X. W., Thanou, M., Sesardic, D., Alpar, H. O. and Şenel, S. 2008. Pharmaceutical Nanotechnology Mono-*N*-carboxymethyl chitosan (MCC) and *N*-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 363, 1-2, 139-148
- Serajuddin, A. T. M. 1999. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: Early

- promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(10), 1058-1066
- Sieval, A. B., Thanou, M., Kotze, A.F., Verhoef, J. C., Brussee, J. and Junginger, H. E. 1998. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, 36, 157-165.
- Stenhoff, H., Lagerström, P. and Andersen, C. 1999. Short communication
Determination of candesartan cilexetil, candesartan and a metabolite in human plasma and urine by liquid chromatography and fluorometric detection. *Journal of Chromatography B*, 731, 411–417
- Snyman, D., Hamman, J. H., Kotze, J. S., Rollings, J. E. and Kotze, A. F. 2002. The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, 50 (2), 145-150.
- Subba Rao, D. V., Radhakrishnanand, P., Suryanarayana, M. V. and Himabindu, V. 2007. A Stability-Indicating LC Method for Candesartan Cilexetil. *Chromatographia*, 66, 499–507
- Thanou, M., Verhoef, J. C., Romeijn, S. G., Nagelkerke, J. F., Merkus, F. W. H. M and Junginger, H. E. 1999. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International Journal of Pharmaceutics*, 185, 73–82
- Thanou, M., Verhoef, J. C., Marbach, P. and Junginger, H. E. 2000a. Intestinal Absorption of Octreotide: N-Trimethyl Chitosan Chloride (TMC) Ameliorates the Permeability and Absorption Properties of the Somatostatin Analogue In Vitro and In Vivo. *J. Pharm. Sci.*, 89, 951–957.
- Thanou, M., Florea, B. I., Langemeyer, M. W. E., Verhoef, J. C. and Junginger, H. E. 2000b. N-Trimethylated Chitosan Chloride (TMC) Improves the Intestinal Permeation of the Peptide Drug Buserelin In Vitro (Caco-2 Cells) and In Vivo (Rats). *Pharmaceutical Research*, 17, 1.
- Thanou, M., Verhoef, J. C., Verheijden, J. H. M. and Junginger, H. E. 2001. Intestinal Absorption of Octreotide Using Trimethyl Chitosan Chloride: Studies in Pigs. *Pharmaceutical Research*, 18, 6, 823-828
- Turan, B. 2002. Anjiotensin Reseptör Antagonistlerinin Deneysel Diyabetik Sıçan Kalbi Elektriksel Aktivitelerine Etkileri, BAP Projesi Kesin Raporu, Proje No: 2001-08-09-061, 1-19
- Vila, A., Sanchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Jato, J. L. V. and Alonso, M. J. 2004. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 123–131.

- Yang, T., Chou, C. and Li, C. 2002. Preparation, water solubility and rheological property of the N-alkylated mono or disaccharide chitosan derivatives. *Food Research International*, 35, 707–713.
- Yao, Z., Zhang, C., Ping, Q. and Yu, L. 2007. A series of novel chitosan derivatives: Synthesis, characterization and micellar solubilization of paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*, 68, 781–792
- Yaras, N., Bilginoglu, A., Vassort, G. and Turan, B. 2007. Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca^{2+} release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: 912-920
- Yokoyama, M., Opanasopit, P., Okano, T., Kawano, K. and Maitani, Y. 2004. Polymer Design and Incorporation Methods for Polymeric Micelle Carrier System Containing Water-insoluble Anti-cancer Agent Camptothecin. *Journal of Drug Targeting*, 12, 6, 373-384
- Zhang, C., Qineng, P. and Zhang, H. 2004. Self-assembly and characterization of paclitaxel-loaded *N*-octyl-*O*-sulfate chitosan micellar system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39, 69–75
- Zhang, C., Qu, G., Sun, Y., Wu, X., Yao, Z., Guo, Q., Ding, Q., Yuan, S., Shen, Z., Ping, Q. and Zhou, H. 2008. Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of *N*-octyl-*O*-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel. *Biomaterials*, 29, 9, 1233-1241
- Zhou, X., Hu, Y., Tian, Y. and Hu, X. 2009. Effect of *N*-trimethyl chitosan enhancing the dissolution properties of the lipophilic drug cyclosporin A. *Carbohydrate Polymers*, 76, 2, 285-290

EKLER

- EK 1 a. Trimetil kitosanın etanolde, b. Trimetil nanokitosanın etanolde, c. Trimetil nanokitosanın HEPES tampon çözeltisinde büyüklük dağılım değerleri
- EK 2. a. Trimetil kitosanın, b. Trimetil nanokitosanın suda büyüklük dağılım değerleri
- EK 3 *Candesartan-cilexetil/candesartan* yüklü örneklerin en büyük tane boyutu değerleri
- EK 4 Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosanın tanecik ortalama boyutlarının ve PDI değerlerinin (DLS) süreli yayınlarla karşılaştırılması
- EK 5 Trimetil kitosanın kromatogramı
- EK 6 Trimetil nanokitosanın kromatogramı
- EK 7 Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil kitosan
- EK 8 Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil kitosan
- EK 9 Trimetil kitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi
- EK 10 Trimetil kitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi
- EK 11 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne arap zamkı etkisi
- EK 12 Ticari suda çözünür kitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi
- EK 13 1 ve 3 gün süre ile UV ile yapılan çözünürlük deneylerinden elde edilen artış miktarlarının karşılaştırılması
- EK 14 İlaç yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin sudaki çözeltisi analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri
- EK 15 İlaç yüklü trimetil kitosan örneklerinin sudaki çözeltisi analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri
- EK 16 Arap zamkı maddesinin kromatogramı

EK 17 İlaç yüklü arap zamkı örneklerinin sudaki çözeltisi analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri

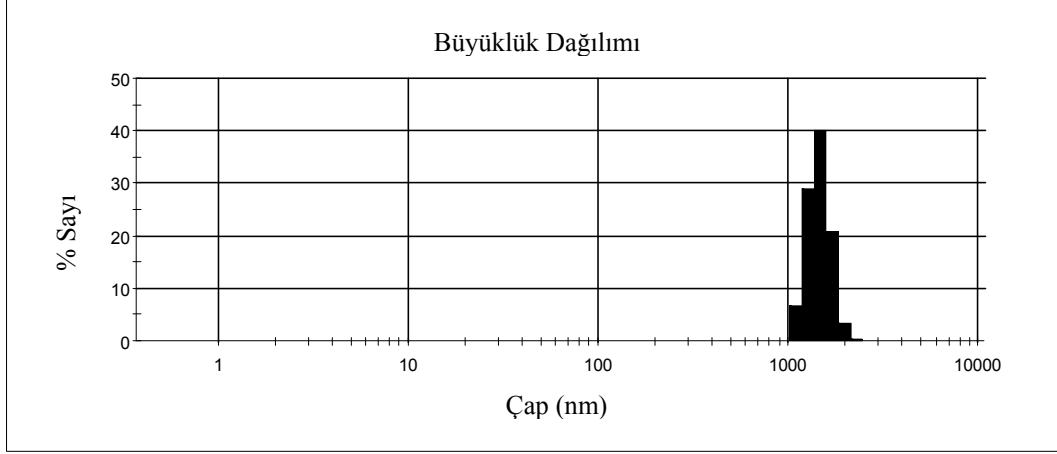
EK 18 Ticari suda çözünür kitosanın kromatogramı

EK 19 İlaç yüklü ticari suda çözünür kitosan örnekleri suda analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri

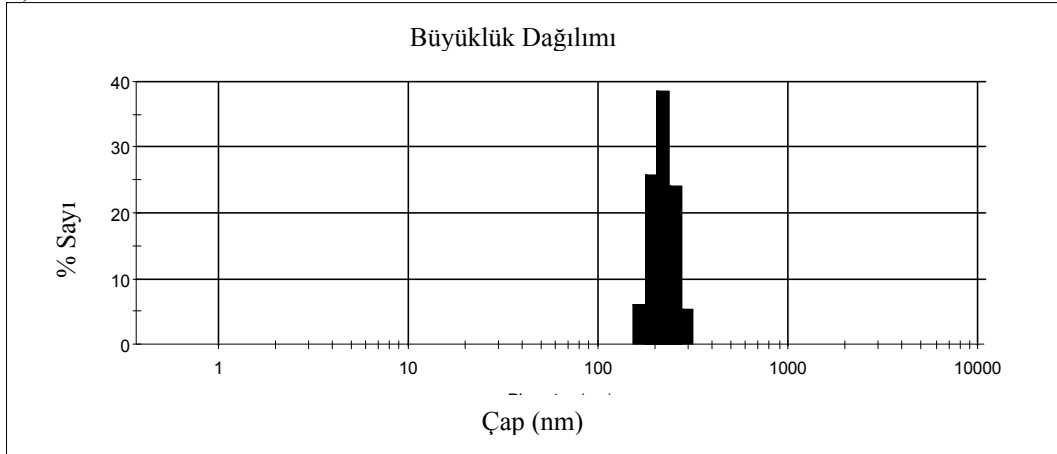
EK 20 UV sonuçları ve HPLC sonuçlarının karşılaştırılması

EK 1. a. Trimetil kitosanın etanolde, b. Trimetil nanokitosanın etanolde, c. Trimetil nanokitosanın HEPES tampon çözeltisinde büyüklük dağılım değerleri

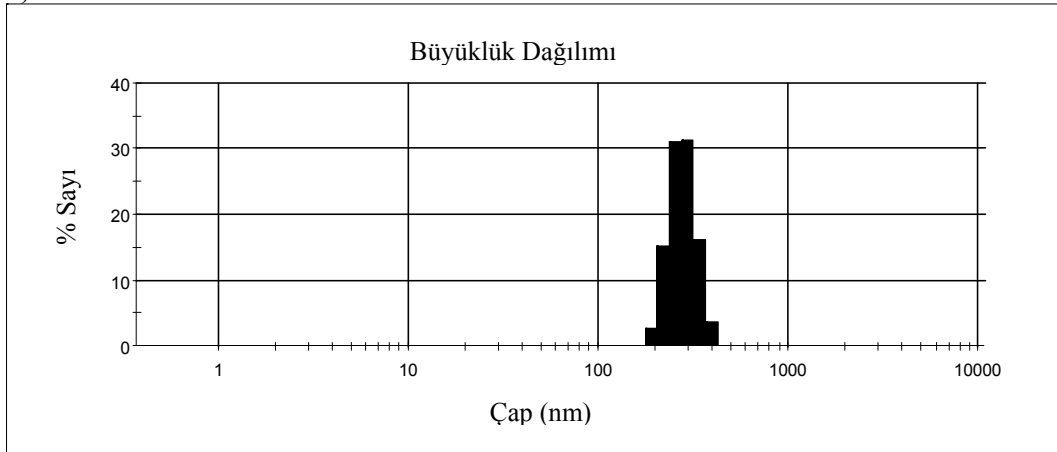
a)



b)

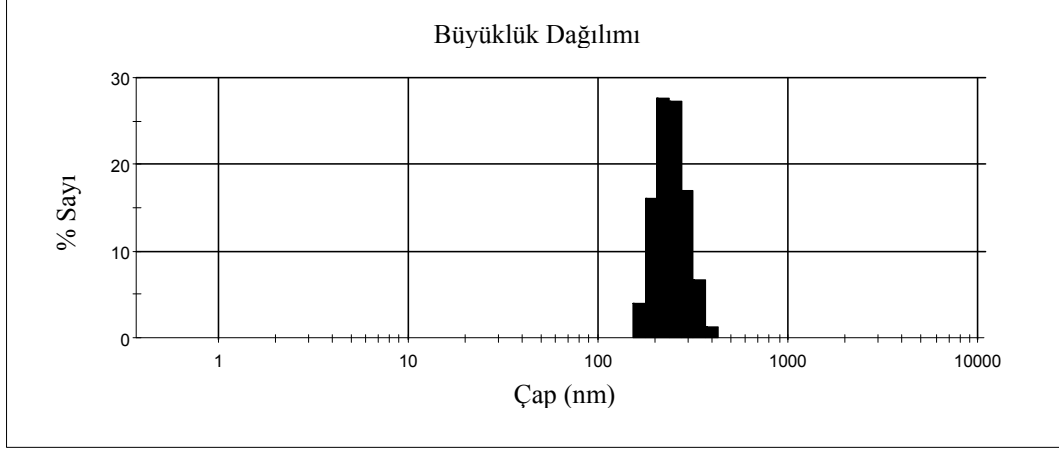


c)

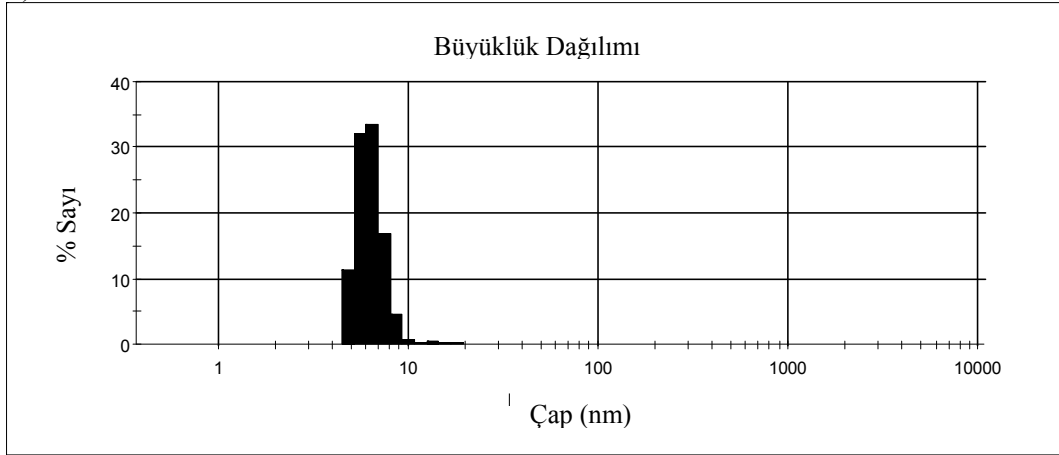


EK 2. a. Trimetil kitosanın, b. Trimetil nanokitosanın suda büyüklük dağılım değerleri

a)



b)



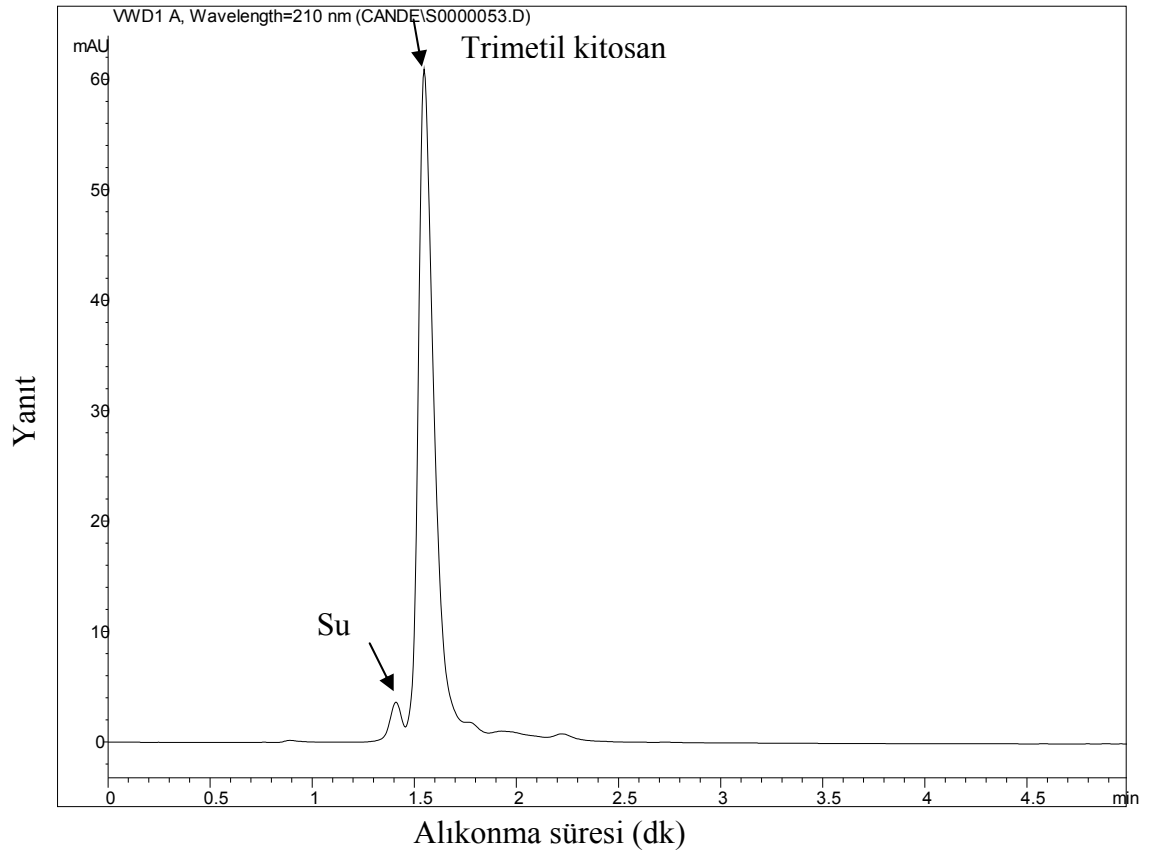
EK 3 *Candesartan-cilexetil/candesartan* yüklü örneklerin en büyük tane boyutu değerleri

Örnek	En büyük tane boyutu
Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil kitosan	93 nm
Ultrasonik etki ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosa	73 nm
İyonik jelleşme tekniği ile <i>candesartan-cilexetil</i> yüklü trimetil nanokitosa	190 nm
<i>Candesartan-cilexetil</i>	244 nm
Ultrasonik etki yöntemi ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil kitosa	100 nm
Ultrasonik etki ile <i>candesartan</i> yüklü trimetil nanokitosa	35 nm
<i>Candesartan</i>	109 nm

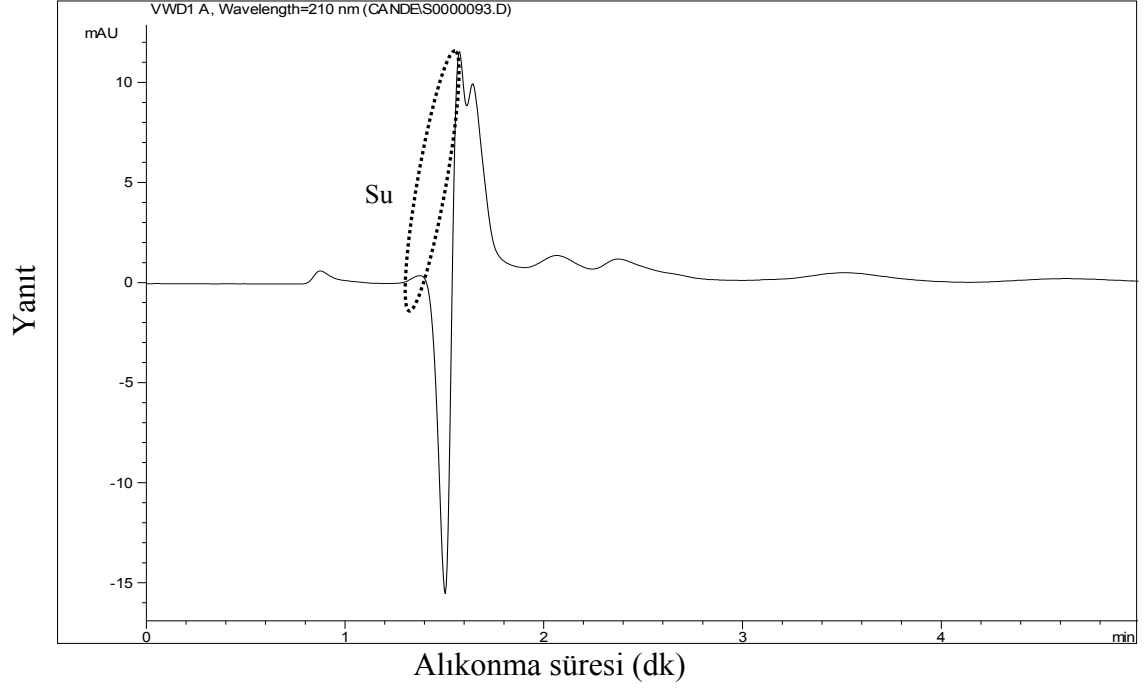
EK 4 Trimetil kitosan ve trimetil nanokitosanın tanecik ortalama boyutlarının ve PDI değerlerinin (DLS) süreli yayınlarla karşılaştırılması

Deney ve süreli yayınların karşılaştırması	Ortalama boyut	PDI
Amidi vd. 2006 TMC nanotaneciği	254 +/-9 nm	0.157
Chen vd. 2007 DQ33 DQ37 TMC nanotaneciği	240 +/-10 nm 218 +/-9 nm	0.215 0.193
TMC+etanol+Ultrasonik banyo	1484 nm	0.43
NanoTMC+etanol+Ultrasonik prob	220 nm	0.61
NanoTMC+HEPES+Ultrasonik prob	295 nm	0.71
TMC+su+Ultrasonik prob 1-3 mikron SEM sonucu	220 nm	0.53
NanoTMC+su	7.5 nm	0.44
Nano TMC+su+Ultrasonik prob	6.5 nm	0.72

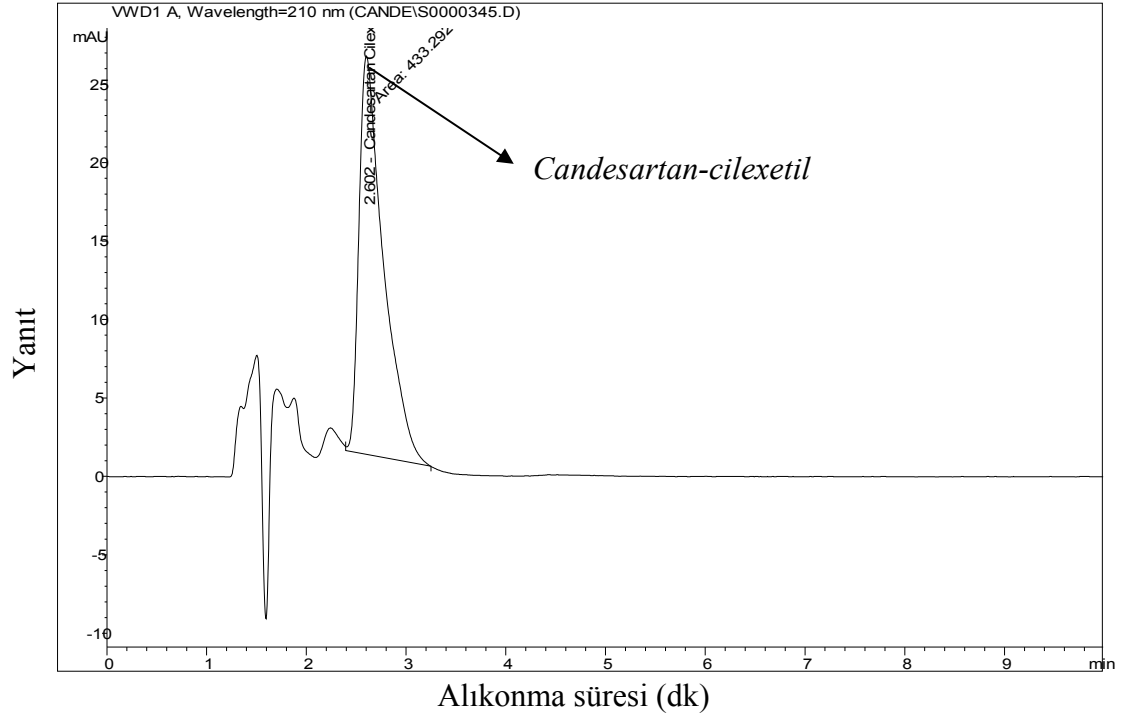
EK 5 Trimetil kitosanın kromatogramı



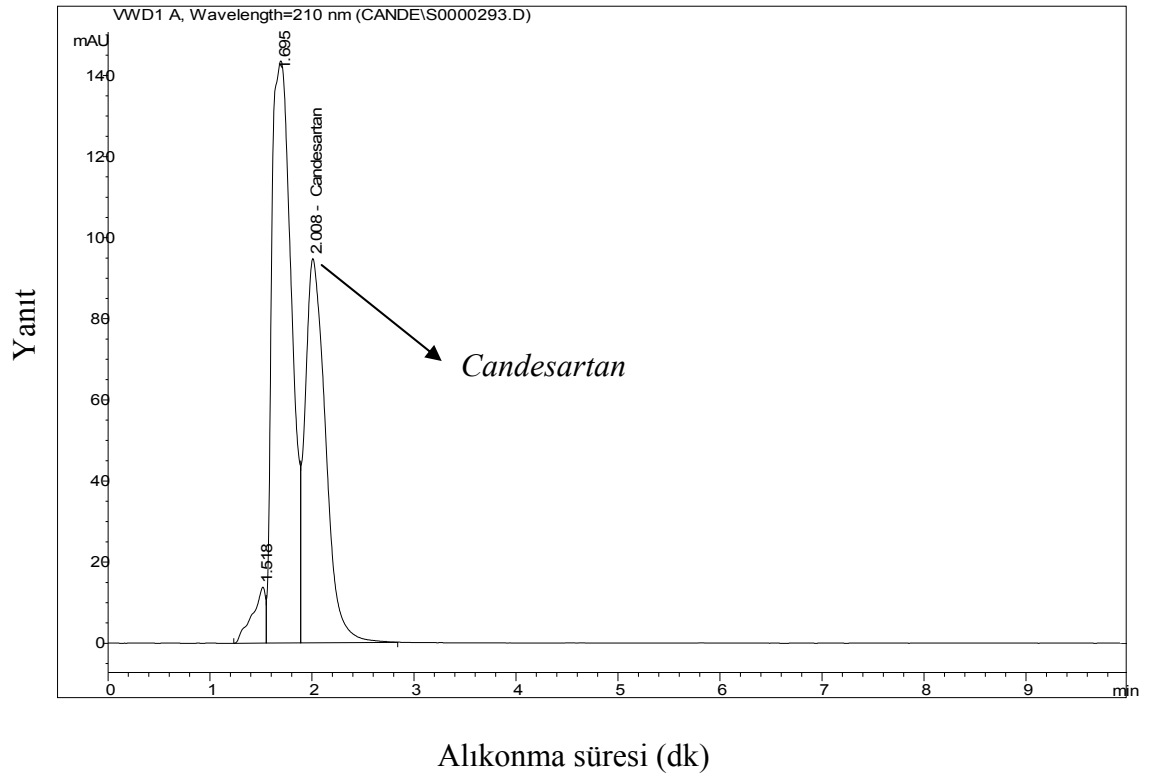
EK 6 Trimetil nanokitosanın kromatogramı



EK 7 Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan-cilexetil* yüklü trimetil kitosan



EK 8 Ultrasonik etki yöntemi ile hazırlanan *candesartan* yüklü trimetil kitosan



EK 9 Trimetil kitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi

Trimetil kitosan miktarı (mg)	Absorbans 1 gün	Absorbans 3 gün	Çözünürlük 1 gün	Çözünürlük 3 gün
80	0,389	0,520	0,128	0,172
60	0,334	0,362	0,108	0,112
40	0,151	0,315	0,048	0,100
20	0,022	0,177	0,0040	0,048
0	0,010	0,016	0,0032	0,0032
Artış			512	688

EK 10 Trimetil kitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi

Trimetil nanokitosan miktarı (mg)	Absorbans 1 gün	Absorbans 3 gün	Çözünürlük 1 gün	Çözünürlük 3 gün
80	0,437	0,455	0,136	0,148
60	0,263	0,381	0,1	0,12
40	0,210	0,245	0,068	0,08
20	0,102	0,147	0,032	0,048
0	0,010	0,016	0,0032	0,003
Artış			544	592

EK 11 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne arap zamkı etkisi

Arap zamkı miktarı (mg)	Absorbans 1 gün	Absorbans 3 gün	Çözünürlük 1 gün	Çözünürlük 3 gün
80	0,096	0,154	0,035	0,048
60	0,093	0,106	0,035	0,036
40	0,017	0,042	0,0032	0,008
20	0,012	0,040	0,0032	0,008
0	0,010	0,027	0,0032	0,004
Artış			140	192

EK 12 Ticari suda çözünür kitosanın 1 ve 3 gün süreyle *candesartan-cilexetil* ilacının çözünürlüğüne etkisi

Ticari suda çözünür kitosan miktarı (mg)	Absorbans 1 gün	Absorbans 3 gün	Çözünürlük 1 gün	Çözünürlük 3 gün
80	0,161	0,154	0,052	0,048
60	0,136	0,130	0,044	0,044
40	0,116	0,112	0,036	0,036
20	0,059	0,104	0,016	0,0064
0	0,010	0,019	0,0016	0,0032
Artış			208	192

EK 13 1 ve 3 gün süre ile UV ile yapılan çözünürlük deneylerinden elde edilen artış miktarlarının karşılaştırılması

	1 gün Artış	3 gün Artış
TMC	512	688
NTMC	544	592
Arap zankı	140	192
Ticari suda çözünür kitosan	208	192

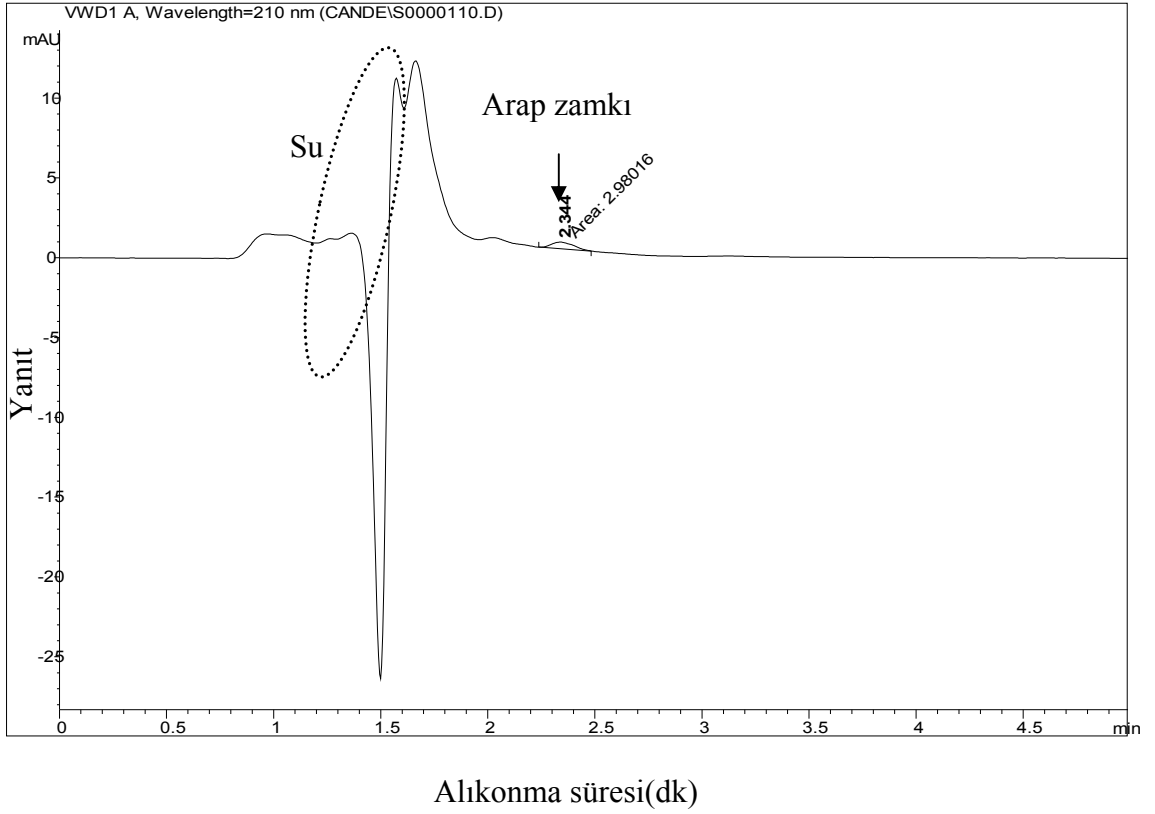
EK 14 İlaç yüklü trimetil nanokitosan örneklerinin sudaki çözeltisi analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri

Trimetil nanokitosan miktarı (mg)	İlacın alıkonma süresi	Alan
0	2.1	71
20	2.7	10359
40	2.7	26284
60	2.7	29748
80	2.7	28120
Artış		392

EK 15 İlaç yüklü trimetil kitosan örneklerinin sudaki çözeltisi analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri

Trimetil kitosan miktarı(mg)	İlacın alıkonma süresi	Alan
0	2.1	71
20	2.4	1052
40	2.4	1123
60	2.4	1052
80	2.4	3862
Artış		54

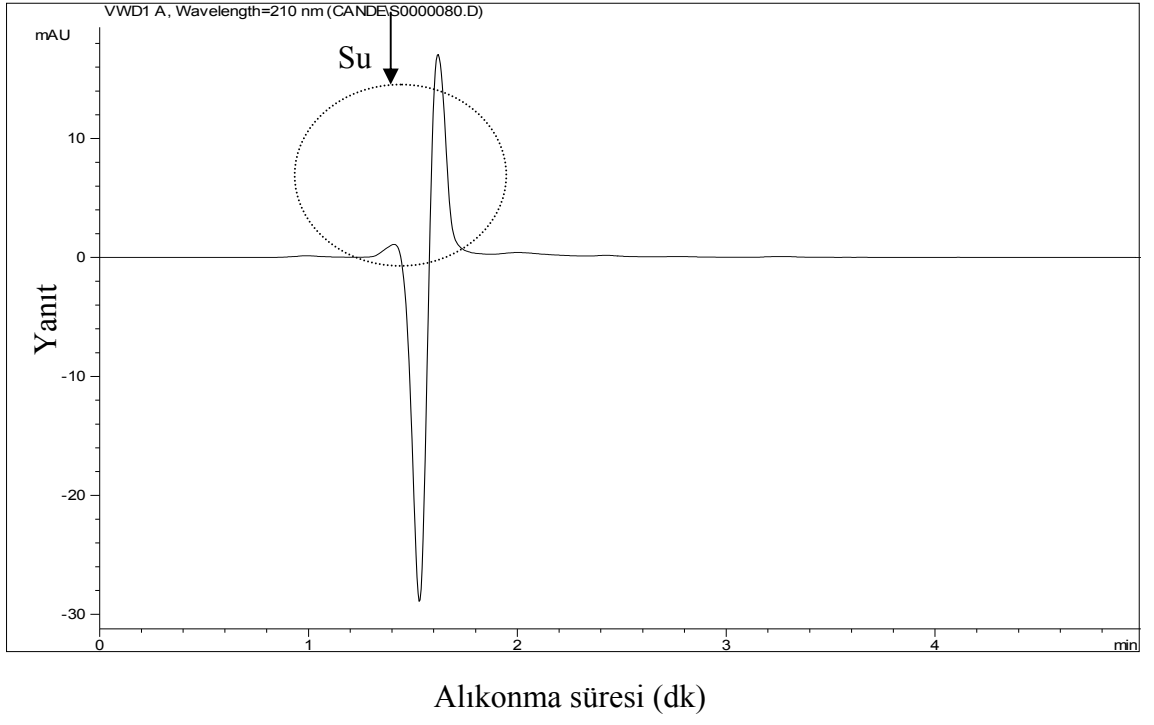
EK 16 Arap zamkı maddesinin kromatogramı



EK 17 İlaç yüklü arap zankı örneklerinin sudaki çözeltisi analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri

Arap zankı (mg)	İlacın alıkonma süresi	Alan
0	2.1	71
20	2.3	242
40	2.3	750
60	2.3	579
80	2.3	2193
Artış		31

EK 18 Ticari suda çözünür kitosanın kromatogramı



EK 19 İlaç yüklü ticari suda çözünür kitosan örnekleri suda analizlendiğinde ilacın alıkonma süresi ve alan değerleri

Ticari suda çözünür kitosan (mg)	İlacın alıkonma süresi	Alan
0	2.1	71
20	2.7	11
40	2.7	7.9
60	2.7	11.3
80	2.7	7.9
Artış		Azalma

EK 20 UV sonuçları ve HPLC sonuçlarının karşılaştırılması

	UV (1 gün) Artış	HPLC Artış
NTMC	544	392
TMC	512	54
Arap zankı	140	31
Ticari suda çözünür kitosan	208	Azalma

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aylin GEÇER

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi: 09.01.1979

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce-Almanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara F. K. M. Anadolu Lisesi (1997)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği
Bölümü (2001)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya
Mühendisliği Anabilim Dalı (2005)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü-Araştırma Görevlisi
(2002-Halen)

Yayımları (SCI ve diğer)

Makaleler

1. Geçer, A., Yıldız, N., Kavak, D., Çalimli, A., 2009 ''*Comparison of chitosan apatite composites synthesized by different methods*'', Polymer Composites, 30 (3), 288-295. (SCI-Core)

2. Geçer, A., Yıldız, N., Erol, M., Çalimli, A., 2008. ''*Synthesis of chitin calcium phosphate composite in different growth media*'', Polymer Composites, 29 (1), 84-9.1 (SCI-Core)

Uluslar arası Bildiriler

1. Geçer, A., Yıldız, N., Turan B., Çalimli A, "The Particle Size Determination of Candesartan-Cilexetil and Candesartan Loaded Nanoparticles" 6th Chemical Engineering Conference For Collaborative Research in Eastern Mediterranean Countries (EMCC-6), 7th-12th March 2010, Antalya. Kabul edildi.

2. Geer, A., Yıldız, N., Turan B., alımlı A, “Ultrasonic Loading Technique for Candesartan has better Efficiency than Ionic Gellation”, 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy (2nd ICDDT 2010), 1-4 February 2010, Dubai.

3. Geer, A., Yıldız, N., Turan B., alımlı A, “*The Examination of Candesartan-Cilexetil Loaded Trimethyl Chitosan Nanoparticles by HPLC, FTIR and AFM Analyses*”, BIOTECH, METU, 27-30 September 2009, Ankara, Turkey.

4. Geer, A., Yıldız, N., Turan, B., alımlı, A., Candesartan Cilexetil and Candesartan Loaded Trimethyl Chitosan Nanoparticles, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 23-26 June 2009, University of Ankara, Faculty of Pharmacy, Ankara.

5. Geer, A., Kavak, D., Yıldız, N., Erol, M., alımlı, A., “Growth of Calcium Phosphate on Chitin and Chitosan”, EuroNanoForum 2005 Nanotechnology and the Health of EU Citizen in 2020, 6-9 September 2005, EICC, Edinburgh, Scotland

Ulusal Tebliğler

1.Geçer, A., Sayar, Ş., Sayar, K. Yıldız, N., Uğur, M., Turan, B., alımlı, A., “Nanokitosanın Hücreye Floresan Boya Girişine Etkisi ” , 9. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK9), 22-25 Haziran 2010, Gazi Üniversitesi, Ankara. Kabul edildi.

2.Geçer, A., Yıldız, N., Turan, B., alımlı, A., Enhancing the Solubility of Candesartan-Cilexetil Using Trimethyl Chitosan Nanoparticle, Gum Arabic and Commercial Water Soluble Chitosan, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 08 - 12 Haziran 2009, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

3. Geçer, A., Kavak, D., Yıldız, N., Erol, M., ve alımlı, A., Micro and Nano Sized Bio Materials, NanoTR-I Nanotechnology and Nanoscience I, Bilkent, 2005.

4. Geçer, A., Kavak, D., Salgın, U., Yıldız, N., Erol, M., alımlı, A., Ktin/Kitosan Lifler Üzerine Kalsiyum Fosfat Birikiminin İncelenmesi, VI. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 7-10 Eylül 2004, Ege Üniversitesi, İzmir.

5. Geçer, A., Kavak, D., Salgın, U., Güngünoğlu, H., Aktürk, S., Erol, M., Yıldız, N., alımlı, A., Biyoseramik Kompozitlerin Sentezi ve Karakterizasyonu, XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, 2004, Kars

6. Geçer, A., Salgın, U., Yıldız, N., Erol, M. ve alımlı, A., Kitin Kalsiyum Fosfat Biyoseramik Kompozitinin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu, XIII. Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, (TIBP-PZT-7), Çanakale

7. alımlı A., Yıldız N., Salgın U. ve Geçer A., Biyoseramikler, Avrupa Birliği 6. ereve Programı, Nanoteknoloji, Akıllı Malzemeler, Yeni Üretim Süreçleri Kongresi, 7 Temmuz 2002, Bilkent Üniversitesi, Ankara