

**KUERSETİN'İN SİKLODEKSTRİN  
NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI ve  
*İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Kadri GÜLEÇ**

Eskişehir, 2016

**KUERSETİN'İN SİKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİNİN  
HAZIRLANMASI veİN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Kadri GÜLEÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı**

**Nanoteknoloji Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Haziran, 2016**

*Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi BAP Komisyonunca kabul edilen  
1502S059 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**Kadri Güleç'in "Kuersetin'in Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi"** başlıklı tezi 30/06/2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca İleri Teknolojiler Anabilim Dalı Nanoteknoloji Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<b>Unvanı Adı-Soyadı</b>	<b>İmza</b>
<b>Üye (Tez Danışmanı) :</b>	<b>Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL</b>	.....
<b>Üye</b>	<b>: Doç. Dr. Timuçin UĞURLU</b>	.....
<b>Üye</b>	<b>: Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR</b>	.....

**Prof. Dr. Nedim DEĞİRMENCİ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

### KUERSETİN'İN SIKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİNİN

### HAZIRLANMASI ve *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Kadri GÜLEÇ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Nanoteknoloji Bilim Dalı,

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Haziran, 2016

Danışman: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Polifenolik bir flavonoid olan kuersetin (Qu), bitki orijinli antioksidanların en etkililerinden biridir. Klinik denemelerde potansiyel kullanımı olmasına rağmen, kararlılık problemleri, sudaki çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının düşük olması uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı metil- $\beta$ -siklodekstrin (M- $\beta$ -CD)'le kompleksasyonu ile Qu'nun sudaki çözünürlüğünün, çözünme hızının, antioksidan ve antikanser aktivitesinin artırılmasıdır. Kompleksler dondurarak kurutma ve evaporasyon yöntemleri ile hazırlanmıştır. Formülasyonların karakterizasyonu DSC, XRD,  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR, SEM, enkapsülasyon etkinliği, in vitro salım analizleri ile değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivite çalışmaları DPPH testleri ile yürütülmüştür. Komplekslerin servikal adenokarsinoma hücre hattı (HeLa) ve ovaryum karsinoma hücre hattı (SKOV-3) üzerindeki sitotoksik analizleri ve HeLa hücre hattı ile akış sitometrisi ve Hoechst boyaması analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları komplekslerin sudaki çözünürlüğünün, in vitro salım hızının ve antioksidan aktivitesinin saf Qu'ya göre sırasıyla 254 kat, ~3 kat ve %10 oranında arttığını göstermiştir. Sitotoksik açıdan, hazırlanan formülasyonların hücre tipine göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. L3 formülasyonunun HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkinin diğer formülasyonlara göre daha düşük konsantrasyonda yüksek sitotoksik etki göstermesine karşın, SKOV-3 hücre hattında L4 formülasyonunun daha sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analizlerin istatistikî sonuçları elde edilmiş, birbirlerine ve süreye göre anlamlılıkları bulunmuştur. Formülasyonların kararlılık çalışmalarında farklı saklama koşullarında ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $40\pm 1^\circ\text{C}$ ) üç ay bekletme sonucunda L3 formülasyonunun daha kararlı olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Kuersetin, Metil- $\beta$ -Siklodekstrin, Antioksidan aktivite, İnküzyon kompleks, HeLa hücre hattı

## ABSTRACT

### PREPARATION and *IN VITRO* EVALUATION OF QUERCETIN CYCLODEXTRIN NANOPARTICLES

Kadri GÜLEÇ

Department of Advanced Technologies, Program in Nanotechnology,

Anadolu University, Graduate School of Science, June, 2016

Supervisor: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Quercetin (Qu), a polyphenolic flavonoid, is one of the most effective plant originated antioxidants. Despite the potential use of Qu in clinical trials, low water solubility, stability problems and the scarcity of cellular bioavailability limit its applications. The purpose of thesis study was to enhance aqueous solubility, dissolution rate, antioxidant and anticancer activity of Qu by complexation with Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD). Complexes were prepared by freeze-drying and evaporation method. The characteristics of the complexes were evaluated by DSC, XRD,  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR, SEM, encapsulation efficacy, *in-vitro* dissolution rate analyses. Antioxidant activity studies on complexes carried out with DPPH tests. Cytotoxicity assay of the complexes was performed by cervical adenocarcinoma cell line (HeLa) and ovary carcinoma cell line (SKOV-3). Hoechst staining and flow cytometry analysis were performed by HeLa cells line. Analyses results showed that the aqueous solubility, dissolution rate and antioxidant activity of the complex were increased 254-fold, ~3-fold and 10 % respectively compared to the pure Qu. Cytotoxic point of view, it was determined to vary the prepared formulations according to the type of cell line. Although the formulation of L3 showed high cytotoxic effects at low concentrations according to other formulations by HeLa cell line, it was found to be cytotoxic L4 formulations by SKOV-3 cell line. The results of the analysis obtained were analysed statistically and the meaningfulness was found according to each other and duration. L3 formulation stability was found to be stable at different storage conditions during the three months of storage.

**Key Words:** Quercetin, Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Antioxidant activity, Inclusion complex, HeLa cells

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başlarken tanışmam ve danışmanlığımı kabul ederek kendimi bu konuda çok şanslı saymama neden olan, eğitimim boyunca sabır ve anlayışla desteğini esirgemeyen, fikirleri ve tecrübeleriyle ufkumu genişleten, yaptığım hatalarda bile bir anne hoşgörüsüyle motive edip, güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda beni dinleyen ve yol gösteren, bana bilimi bir kat daha fazla sevdiren sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e,

Tez çalışmamın hücre kültürü bölümünde bilgisini, deneyimlerini esirgmeden bana yol gösteren, hoşgörülü, güler yüzlü ve özverili hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin İNCESU'ya,

Araştırma laboratuvarlarını kullanma fırsatı veren Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a, Eczacılık Biyoteknoloji ABD Başkanı Yrd. Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na ve öğretim elemanı Arş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Çalışmalarım süresince hiçbir yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım, Yrd. Doç. Dr. Ebru BAŞARAN, Yrd. Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e ve yeni anne olacak Arş. Gör. Dr. Gülsel YURTDAŞ KIRIMLIOĞLU'na, çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Umay Merve GÜVEN ve Arş. Gör. Ahmet Alper ÖZTÜRK'e ve her fırsatta yardıma koşup yetişemediğim her konuda destek olan Ecz. Fawaz Al HEİBSHY'ye,

Bilgi ve tecrübeleriyle önerilerini sunan, her konuda desteğiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren abi kadar yakın gördüğüm değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat Sami BERKMAN'a,

Berber çalışırken büyük keyif aldığım, en zor zamanlarımda bile varlıklarıyla benim yanımda olan, çalışmalarım sırasında her türlü yardımı sağlayan, laboratuvarında çalışmalarım bitene kadar sabırla bekleyip yardım eden, beni yalnız bırakmayan değerli çalışma arkadaşlarım, Elif APAYDIN'a, Nur İpek ÖNDER MERT'e, Ahmet MERT'e, Aysun AYRIM'a, Mesut ŞEN'e ve Arş. Gör. Yüksel ÖĞÜNÇ'e,

Sevgisini ve ilgisini her zaman üzerimde hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan hayattaki en büyük destekçim olan kardeşlerime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

*Aileme...*

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

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

Kadri GÜLEÇ



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	i
<b>JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI</b>	ii
<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>TEŞEKKÜR</b>	v
<b>ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ</b>	vii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	viii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xiii
<b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>1.1. Kanser</b>	1
<b>1.2. Apoptoz</b>	3
<b>1.3. Servikal Kanser ve HeLa (İnsan Servikal Karsinoma) Hücreleri</b>	4
<b>1.4. Ovaryum Kanseri ve SKOV-3 Hücreleri</b>	4
<b>1.5. Antioksidanlar</b>	5
<b>1.6. Fenolik Maddeler</b>	7
<b>1.7. Flavonoidler</b>	7
<b>1.8. Kuersetin</b>	11
<b>1.8.1. Kuersetin bileşiğine ait fiziksel özellikler</b>	12
<b>1.9. Siklodekstrin</b>	14
<b>1.10. İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanma Yöntemleri</b>	17
<b>1.10.1. Birlikte çöktürme yöntemi</b>	17
<b>1.10.2. Püskürterek kurutma/dondurarak kurutma(Liyofilizasyon)</b>	18
<b>1.10.3. Nötralizasyon yöntemi</b>	18
<b>1.10.4. Çimento (Slurry) yöntemi</b>	18

1.10.5.	Pasta yöntemi	18
1.10.6.	Nemli karıştırma ve ısıtma yöntemi	19
1.10.7.	Ekstrüzyon yöntemi	19
1.10.8.	Öğütme yöntemi	19
1.11.	İnklüzyon Komplekslerinin Analiz Yöntemler	19
1.11.1.	Katı durumda inklüzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler	20
1.11.2.	Çözelti halinde inklüzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler	20
2.	MATERYAL	21
2.1.	Çalışmada Kullanılan Maddeler	21
2.2.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar	21
2.3.	Hücre Hattı	22
3.	YÖNTEM	23
3.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Validasyon Çalışmaları	23
3.1.1.	Doğrusallık (Linearity)	23
3.1.2.	Doğruluk (Accuracy)	24
3.1.3.	Kesinlik (Precision)	24
3.1.4.	Seçicilik (Specificity)	24
3.1.5.	Duyarlılık (Sensitivity)	25
3.2.	Çözünürlük Çalışmaları	26
3.2.1.	Qu'nun saf su ortamındaki çözünürlük tayini	26
3.2.2.	Qu'nun 1:4 etanol: su ortamındaki çözünürlük tayini	26
3.2.3.	Qu/M-β-CD'nin faz çözünürlük tayini	26
3.3.	İnklüzyon Komplekslerinin Hazırlanması	27
3.3.1	Modifiye liyofilizasyon yöntemi	27
3.3.2	Evaporasyon yöntemi	27
3.3.3	Plasebo formül	28
3.4.	Yükleme Etkinliği	28
3.5.	Zeta Potansiyeli	28
3.6.	Fizikokimyasal Karakterizasyon	28

3.6.1.	Parçacık büyüklüğü ve PDI (Polidisperslik indisi)	29
3.6.2.	DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetri)	29
3.6.3.	XRD (X-ışını kırınımı)	29
3.6.4.	FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi)	29
3.6.5.	<sup>1</sup> H-NMR (Proton nükleer manyetik rezonans)	29
3.6.6.	FESEM (Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu)	30
3.7.	<i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	30
3.8.	Çözünme Profillerinin Benzerliğinin Araştırılması	30
3.9.	Antioksidan Aktivite Testi	30
3.10.	Kararlılık Çalışmaları	31
3.11.	Hücre Kültürü Çalışmaları	31
3.11.1.	MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)	32
3.11.2.	Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile apoptozun belirlenmesi	33
3.11.3.	Hoechst boyama	34
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	35
4.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Validasyon Çalışmaları	35
4.1.1.	Doğrusallık (Linearity)	35
4.1.2.	Doğruluk (Accuracy)	36
4.1.3.	Kesinlik (Precision)	37
4.1.4.	Seçicilik (Specificity)	38
4.1.5.	Duyarlılık (Sensitivity)	38
4.2.	Çözünürlük Çalışmaları	39
4.3.	Faz Çözünürlük Çalışmaları	39
4.4.	İnklüzyon Kompleksleri	40
4.5.	Zeta Potansiyeli	41
4.6.	Fizikokimyasal Karakterizasyon	43
4.6.1.	Parçacık büyüklüğü ve PDI (Polidisperslik indisi)	43
4.6.2.	DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetri)	46
4.6.3.	XRD (X-ışını kırınımı)	48

4.6.4.	FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi)	49
4.6.5.	<sup>1</sup> H-NMR (Proton nükleer manyetik rezonans)	50
4.6.6.	FESEM	53
4.7.	<i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	54
4.8.	Çözünme Profillerinin Benzerliğinin Araştırılması	55
4.9.	Antioksidan Aktivite Testi	55
4.10.	Kararlılık Çalışmaları	56
4.11.	Hücre Kültürü Çalışmaları	57
4.11.1.	MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)	57
4.11.2.	Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile apoptozun belirlenmesi	65
4.11.3.	Hoechst boyama	66
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	69
	KAYNAKÇA	
	TEZ İLE İLGİLİ YAYINLAR	
	ÖZGEÇMİŞ	

## TABLULAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.1.</b> Flavonoidlerin ana grupları, bileşikleri ve besin kaynağı	<b>9</b>
<b>Tablo 1.2.</b> Flavonoid elde etme yöntemleri	<b>11</b>
<b>Tablo 1.3.</b> CD türevleri	<b>17</b>
<b>Tablo 3.1.</b> HPLC çalışma koşulları	<b>23</b>
<b>Tablo 4.1.</b> Saf Qu'nun HPLC analizi ile elde edilen mAU değerleri	<b>36</b>
<b>Tablo 4.2.</b> Saf Qu'nun HPLC ile % geri kazanım değerleri	<b>37</b>
<b>Tablo 4.3.</b> Saf Qu'nun keskinlik için 1 µg/mL konsantrasyonunda elde edilen mAU değerleri	<b>37</b>
<b>Tablo 4.4.</b> Saf Qu'nun keskinlik için 37.5 µg/mL konsantrasyonunda elde edilen mAU değerleri	<b>38</b>
<b>Tablo 4.5.</b> Saf Qu'nun keskinlik için 75 µg/mL konsantrasyonunda elde edilen mAU değerleri	<b>38</b>
<b>Tablo 4.6.</b> Saf Qu ile komplekslerdeki Qu'nun sudaki çözünürlüğü ve yükleme etkinliği	<b>41</b>
<b>Tablo 4.7.</b> 4 °C saklama koşulu altında L1, L3 ve L4 formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm)	<b>44</b>
<b>Tablo 4.8.</b> 25 °C saklama koşulu altında L1, L3 ve L4 formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm)	<b>44</b>
<b>Tablo 4.9.</b> 40 °C saklama koşulu altında L1, L3 ve L4 formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm)	<b>44</b>
<b>Tablo 4.10.</b> Qu'nun aromatik protonlarının kimyasal kaymaları	<b>52</b>
<b>Tablo 4.11.</b> M-β-CD'nin inklüzyon kompleks sonrası H3 ve H5 protonlarının kimyasal kaymaları	<b>53</b>
<b>Tablo 4.12.</b> Farklı ortamlardaki Qu, PM, L1, L3, L4 için 3 ay sonunda bozunmadan kalan % Qu miktarları	<b>57</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>	
<b>Şekil 1.1.</b>	Kanser oluşum şeması	2
<b>Şekil 1.2.</b>	Fenilalaninden flavonoid oluşumu	7
<b>Şekil 1.3.</b>	Basit flavonoid yapısı (Flavon çekirdeği)	8
<b>Şekil 1.4.</b>	Flavonoidlerin iskelet yapıları	9
<b>Şekil 1.5.</b>	Kuersetin molekül yapısı (A) ve antioksidan kısımları (B)	12
<b>Şekil 1.6.</b>	Kuersetin'inin <i>vitro</i> farmakolojik etkileri şeması	13
<b>Şekil 1.7.</b>	$\alpha$ , $\beta$ ve $\gamma$ -CD'ler	15
<b>Şekil 1.8.</b>	CD'lerin fizikokimyasal özellikleri	15
<b>Şekil 1.9.</b>	Ana CD'ler ve türevlerinin sentez yolları	16
<b>Şekil 3.1.</b>	MTT bileşiğinin formazan kristallerine dönüşümü	32
<b>Şekil 3.2.</b>	Apoptozun akım sitometrisi ile analizi	33
<b>Şekil 4.1.</b>	Saf Qu'ya ait kromatogram	35
<b>Şekil 4.2.</b>	Saf Qu'ya ait doğru grafiği	36
<b>Şekil 4.3.</b>	Seçicilik ile ilgili kromatogramlar	39
<b>Şekil 4.4.</b>	Faz çözünürlük diyagramı	40
<b>Şekil 4.5.</b>	Komplekslerin farklı koşullardaki zeta potansiyeli değerleri	42
<b>Şekil 4.6.</b>	L1 formülasyonunun zeta potansiyeli verilerinin istatistiksel analizi	42
<b>Şekil 4.7.</b>	L3 formülasyonunun zeta potansiyeli verilerinin istatistiksel analizi	43
<b>Şekil 4.8.</b>	L4 formülasyonunun zeta potansiyeli verilerinin istatistiksel analizi	43
<b>Şekil 4.9.</b>	L1, L3, L4 formülasyonlarının 4 °C, 25 °C ve 40 °C ortamlarındaki partikül büyüklüğü	45
<b>Şekil 4.10.</b>	L1 formülasyonunun partikül büyüklüğü verilerinin istatistiksel analizi	45
<b>Şekil 4.11.</b>	L3 formülasyonunun partikül büyüklüğü verilerinin istatistiksel analizi	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 4.12.</b> L4 formülasyonunun partikül büyüklüğü verilerinin istatistiksel analizi	<b>46</b>
<b>Şekil 4.13.</b> Qu, PM ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin DSC termogramları	<b>47</b>
<b>Şekil 4.14.</b> Qu, PM ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin X-ışını difraktometreleri	<b>49</b>
<b>Şekil 4.15.</b> Qu, PM ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin FT-IR spektrumları	<b>49</b>
<b>Şekil 4.16.</b> Qu ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları	<b>51</b>
<b>Şekil 4.17.</b> CD ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları	<b>52</b>
<b>Şekil 4.18.</b> Qu, PM ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin FESEM görüntüleri	<b>53</b>
<b>Şekil 4.19.</b> Qu, PM ve inklüzyon komplekslerinin pH 1.2 ortamındaki çözünme profilleri	<b>54</b>
<b>Şekil 4.20.</b> Qu ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin antioksidan aktiviteleri	<b>56</b>
<b>Şekil 4.21.</b> 4 $^{\circ}\text{C}$ , 25 $^{\circ}\text{C}$ , 40 $^{\circ}\text{C}$ saklama ortamlarında saf Qu, PM ve L1, L3, L4'de bozunmadan kalan % Qu miktarları	<b>57</b>
<b>Şekil 4.22.</b> Qu, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 24 saat sonrası HeLa hücresi ile % hücre canlılığı	<b>58</b>
<b>Şekil 4.23.</b> Qu, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı	<b>59</b>
<b>Şekil 4.24.</b> Saf Qu'nun 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>60</b>
<b>Şekil 4.25.</b> L1 formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>60</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 4.26.</b> L3 formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>60</b>
<b>Şekil 4.27.</b> L4 formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>61</b>
<b>Şekil 4.28.</b> Plasebo formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>61</b>
<b>Şekil 4.29.</b> SS formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>61</b>
<b>Şekil 4.30.</b> Qu, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı	<b>62</b>
<b>Şekil 4.31.</b> Saf Qu'nun 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>63</b>
<b>Şekil 4.32.</b> L1 formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>63</b>
<b>Şekil 4.33.</b> L3 formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>63</b>
<b>Şekil 4.34.</b> L4 formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>64</b>
<b>Şekil 4.35.</b> Plasebo formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>64</b>
<b>Şekil 4.36.</b> SS formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi	<b>64</b>
<b>Şekil 4.37.</b> Qu ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 24 saat sonrası akım sitometrisi	<b>66</b>
<b>Şekil 4.38.</b> Qu, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri Hoechst boyaması görüntüleri	<b>67</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Qu</b>	: Kuersetin
<b>CD</b>	: Siklodekstrin
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
<b>HeLa</b>	: Servikal Adenokarsinoma Hücre Hattı
<b>SKOV-3</b>	: Ovaryum Kanseri Hücre Hattı
<b>ICH</b>	: Uluslararası Harmonizasyon Komitesi International Conference on Harmonization
<b>USP</b>	: Birleşik Devletler Farmakopesi United States Pharmacopeia
<b>BSS</b>	: Bağlı Standart Sapma
<b>DSC</b>	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Differential Scanning Calorimeter
<b>X-RD</b>	: X-Işını Kırınım X-Ray Diffraction
<b>FT-IR</b>	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Fourier Transform Infrared Spectroscopy
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Proton Nuclear Magnetic Resonance
<b>FESEM</b>	: Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu Field Emission Scanning Electron Microscope
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
<b>M-β-CD</b>	: Metil-Beta-Siklodekstrin
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponu Çözeltisi
<b>PDI</b>	: Polidisperslik İndisi Polydispersity Index

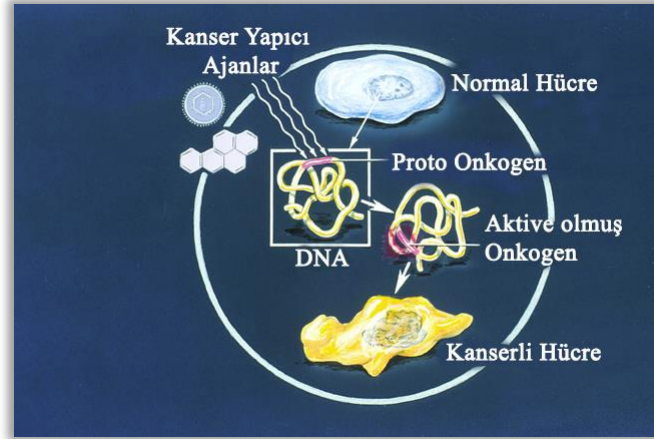
## 1. GİRİŞ

### 1.1. Kanser

Kanser terimi, ilk defa tıbbın babası olarak anılan, Yunan hekim Hippocrates (MÖ 460-370) tarafından “Carcinos” ve “Carcinoma” ile ifade edilmiştir (http-1). Kanser ile eş anlamlı sayılan neoplazma, normal vücut hücrelerine göre, bir organ veya dokusunda ortaya çıkan, hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz bir şekilde bölünüp çoğalması durumudur. Kontrolsüz çoğalan bu hücreler bir araya gelerek tümör adı verilen kitleleri meydana getirirler. Normal vücut hücreleri bir düzen içinde büyür, bölünerek çoğalır ve ölürler. Yaşamın erken dönemlerinde, kişi gelişmesini tamamlayana kadar, normal hücreler hızla bölünerek çoğalırlar. Gelişme tamamlanınca normal hücreler yalnız yıpranan veya ölen hücrelerin yerini almak veya travmada tamir işlemini gerçekleştirmek için bölünür ve çoğalırlar. Buna karşılık kanser hücrelerinin çoğalması sürekli olduğundan, tümör kitleleri de devamlı büyürler(Boyle ve Levin, 2008).

Kötü huylu olarak nitelendirilen neoplazmalar yüksek derecede değişim gösterirler. Kanser hücreleri çevre dokuları istila ederek buraları tahrip ederler. Ayrıca kana ve lenf sıvısına katılarak, kan ve lenf yoluyla vücudun diğer kısımlarına yayılır ve yeni tümör odaklarının oluşmasına yol açarlar. Başka doku ve organlarda oluşan bu tümör odakları “metastaz” olarak isimlendirilir. Buralarda da kanser hücreleri çoğalmaya ve tümör odakları büyümeye devam ederler. Metastaz, invaziv kanser hücrelerinin vücuttaki diğer organlara yayılması olayıdır ve kanser vakalarının % 90’ının ölüm ile sonuçlanmasına neden olmaktadır. Kanser teşhisi konan hastaların % 50’sinin ise metastaza sahip olduğu gösterilmiştir (Apaydın, 2016).

Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle kanser günümüzün en önemli sağlık sorunudur. Tanı olanaklarının gelişmesi ve sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilmektedir. 2012 yılında dünya üzerinde 14.1 milyon yeni kanser vakası meydana gelirken, bunların yaklaşık olarak 8.2 milyonu ölüme sonuçlanmıştır. Kanser sebebiyle gerçekleşen ölümlerin toplam ölüm vakalarının %14.1’ini oluşturduğu tespit edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü 2014 yılı verilerine göre kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedeni olup önümüzdeki yirmi yılda sekiz milyondan fazla kanser tanısının olacağı tahmin edilmektedir (Oatley ve ark., 2015).



**Şekil 1.1.** Kanser oluşum şeması

**Kaynak:** (http-4)

Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir. Erkeklerde en sık rastlanan kanserler nefes borusu, bronş ve akciğer (%33), mide (%9), idrar torbası (%9), kalın bağırsak ve rektum (%8), prostat (%6) ve larinks kanserleridir. Kadınlarda en sık rastlanan kanserler meme (%24), kalın bağırsak ve rektum (%9), mide (%7), yumurtalık (%6), nefes borusu, bronş ve akciğer (%6), lösemi (%5) ile serviks (%5) ve korpus (%5) kanserleridir (Tuncer, 2009).

Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi dünyada kanser tedavisi için kullanılan dört ana yöntemlerdir. Ancak yüksek toksisite, düşük biyoyararlanım, düşük çözünürlük ve terapötik endeksler, spesifik olmayan biyodağılım gibi sorunlar nedeniyle geleneksel kanser tedavileri gerekli tedavi süreci ve etkinliğini azaltmaktadır (Masood, 2015). Bu sebeple, tedavide kullanılan kemoterapötik ajanlardan daha düşük yan etkilere sahip yeni kemoterapötiklerin araştırmaları kanser çalışmalarının birincil konusudur (Poggi ve ark., 2001).

Kanser araştırmaları, büyük ölçüde sebeplerin tespit edilmesi, tümör oluşumunun engellenmesi, teşhisi ve tedavisi için doğru stratejilerin geliştirilmesi yönünde ilerlemektedir. Son yıllarda yapılan anti-kanser etkili madde çalışmalarında nanoteknolojik taşıyıcı sistemlerin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Araştırmacıların, taşıyıcı sistemin toksik etki göstermemesi veya en aza indirgenmesi, etkin maddelerin vücutta biyodağılıma uğraması, yüksek doz gerektirmemesi, patolojik bölgelere

afinitelerinin düşük olması, non-spesifik taşıyıcı sistemleri kullanmalarının en önemli sebepleri arasında sayılabilir(Öğünç, 2015).

İlaç taşıyıcı nanopartiküller, mikrondan daha küçük boyutlarda olup doğal, sentetik polimerler, seramik ya da inorganik maddelerle hazırlanabilmektedir. İlaç, nanopartikül içinde çözülmüş olabileceği gibi nanopartikülün yüzeyine adsorbe edilmiş de olabilir. Ayrıca yüzeyi modifiye edilerek kan dolaşımında daha uzun süre kalması sağlanabilir, aktif ya da pasif hedeflendirme için uygun olarak hazırlanabilir(Singh ve Lillard, 2009; Soppimath ve ark., 2001)

Nanopartikülün yüzeyi anyonik ya da katyonik materyallerle kaplanarak hedef doku ya da hücre ile etkileşime giren formülasyonlar hazırlanabilmesinin faydası yanı sıra çözünme profili de kontrol edilebilir. Tüm bu özelliklerden dolayı nanopartiküler ilaç taşıma sistemler konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlere göre daha etkin tedavi sağlamaktadır(Hans ve Lowman, 2002).

## **1.2. Apoptoz**

Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazi koruyan bir olaydır. Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Avusturyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır (Ayrım, 2016).

Apoptoz mekanizmasında oluşan herhangi bir bozukluk ya da düzensizlik istenmeyen sonuçlara yol açmaktadır. İnsanlarda görülen nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklarda ve kanser ya da AIDS gibi patolojik durumlarda apoptozun patogenetik yolunda hatalar oluşmaktadır. Apoptoz yoluyla hücre ölümüne kromatin kondenzasyonu, membrantomurcukların oluşumu, hücre yıkımları ve DNA degradasyonu eşlik etmektedir (Pinton ve ark., 2008). Apoptoz uyarısı ile hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzülür, kromatini yoğunlaştırır, piknotik bir görünüm alır. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. (Bellamy ve ark., 1995).

Hücre proliferasyonunda artış ve apoptozda azalmaya bağlı olarak kanserin geliştiği yapılan çalışmalar sonucunda bilinmektedir. Hücre ölümünün baskılanmasının ardından hasarlı hücreler birikmekte ve dokuda hasara neden olmaktadır. Kemoterapötik tedavinin ardından hücreler apoptoza gitmektedir. Birçok anti-kanser ilaç, tümör hücresinin DNA sentezine ve hücre bölünmesine etki edip apoptozu

tetiklemektedir. İlaç tedavisinedeniyle tümörlü hücrenin apoptoza duyarlılığının değişmesinin, ilaç direnci açısından önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, kanserin mekanizmasının aydınlatılmasında ve kanser tedavisinde en önemli hedeflerden biri, neoplastik hücrelerde apoptozu tetiklemek olduğu düşünülmektedir(Kaya ve ark., 2012)

### **1.3. Servikal Kanser ve HeLa (İnsan Servikal Karsinoma) Hücreleri**

Servikal kanser, hem kadınlar arasında görülen en yaygın, hem de en yüksek ölüm oranına sahip kanser türüdür. 2012 yılında 528.000 servikal kanser vakası meydana gelirken bunların 266.000'i ölümlle sonuçlanmıştır. Kanser sebebiyle gerçekleşen ölümlerin %8'ini ise servikal kanser oluşturmaktadır (Stewart ve Wild, 2014).

Rahim ağzında hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla oluşan serviks kanseri vücudun diğer kısımlarına yayılabilme özelliğine sahip bir kanser türüdür (http-2). Serviks kanseri oluşumunda en büyük faktörün Human Papilloma Virüs (HPV) olduğu bilinmektedir. Yüksek, orta ve düşük risk kategorilerine ayrılan HPV tiplerinin tamamı serviks kanserine sebep olmamaktadır(Şen, 2015). Düşük risk faktörü HPV tipleri olan HPV6 ve 11 condyloma acuminatumadı verilen siğillere sebep olmaktadır ve nadiren kansere sebep olmaktadır. Bunun aksine HPV 16, 18, 31, 33 ve 45 gibi yüksek risk faktörü HPV tipi olanların kanserle ilişkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (http-5).HPV enfeksiyonu her zaman kanser oluşumunda yeterli olmayabilir. Kanser oluşabilmesi için sigara kullanımı, cinsel yolla bulaşan diğer ajanlar ve bazı genetik ve hormonal faktörler gibi bazı yan etkenlere ihtiyaç vardır (Çalışkan ve ark., 2002).

Servikal kanser nedeniyle takip edilen bir hastanın kanser dokularının laboratuvar kültürü ilk defa 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) başarılmıştır. Henrietta Lack adındaki hasta kanserin yayılması sonucu ölmüş ancak ölümsüz hücrelerinin kültürü adına atfen, HeLa adı ile dünya genelindeki laboratuvarlara talep nedeniyle dağıtılmıştır.Kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve çok kolay üretilibilmeleri çalışmalarda hücre kültürü araştırmalarına hız kazandırmıştır (Akçalı, 2010).

HeLa hücreleri dublikasyon süresi yaklaşık 23 saat olan, bulunduğu kültürdeki diğer hücre hatlarını kolayca kontamine edebilen ve diğer hücre hatlarına oranla oldukça hızlı proliferere olabilen hücrelerdir(Önder, 2013).

#### **1.4. Ovaryum Kanseri ve SKOV-3 Hücreleri**

Epitel ovaryum kanserleri ovaryum malignant neoplazmaların en genel bilinen türüdür. Epitel ovaryum kanserleri fallopian kanalının epitelyum tabakasından ya da ovaryum yüzey epitelyum tabakasından orijin almıştır(Koshiyama ve ark., 2014). Birçok epitel ovaryum kanser hastaları asemptomatik yollarla karakterize edilmesine karşın teşhis ileri evrede mümkün olmaktadır. İleri seviyede tümör peritonel boşluğu dissemina olmaktadır. İleri-düzeydeki hastaların ancak %20-30'una 5 yıl yaşam oranı rapor edilmiştir(Braun ve ark., 2000).

İlk defa 1973 yılında 64 yaşındaki bir hastadan alınan SKOV-3 karsinoma hücre hattı, epitel benzeri morfoloji olan insan yumurtalık kanseri hücre hattıdır. Bu hücrelerin difteri toksini, sisplatin ve adriamisin gibi sitotoksik ilaçlara karşı dirençli olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir(Fogh ve ark., 1977; Shaw ve ark., 2004).

#### **1.5. Antioksidanlar**

Antioksidan, oksit giderici her türlü kimyasal maddeye verilen addır. Antioksidanlar, canlıları nitrojen türü ve reaktif oksijen gibi serbest radikal moleküllerin oksidatif zararlarına karşı korur(Karadeniz ve ark., 2005).

Canlılarda, kimyasal süreçler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller, farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilmekte ve çeşitli kanser türleri, kalp-damar hastalıkları, sinirsel hastalıklar(Alzheimer, Parkinson, Multiple Sclerosis, Down Sendromu vs.), katarakt ve tümör oluşumu gibi dejeneratif rahatsızlıklara direk veya dolaylı olarak neden olmaktadır. Antioksidanlar, canlılardaki serbest radikalleri nötralize ederek hücrelerin serbest radikallerden etkilenmesini engelleyen veya hücrelerin yenilenmesini sağlayan maddelerdir. Bu nedenle antioksidanlar serbest radikallerin hücrelere zarar vermelerini önleme açısından büyük önem taşımaktadır. (Güleşci ve Aygöl, 2016; Koca ve Karadeniz, 2005).

Antioksidan özelliği keşfedilmiş birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir bölümü diyetle (özellikle bitkilerden) alınırken, bir bölümünü ise vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretmektedir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidanlar; katalaz, glutatyon peroksidaz, ve SOD (süperoksit dismutaz) gibi enzimlerdir. Bitkilerde bulunan bazı antioksidanlar aşağıda yer almaktadır.

- **Alfa tokoferoller (E Vitamini):** E vitamini hücrelerde bulunan ve yağda çözünen ana antioksidandır. Doğada birbirinden farklı  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ve  $\delta$ -tokoferol ile  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ve  $\delta$ -tokotrienol isminde 8 tip vitamin E bulunmaktadır. Plazmada baskın olarak bulunan ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanı  $\alpha$ - tokoferoldür. Vitamin E, insan vücudu için esansiyel olan bir antioksidan bileşiktir ve bu nedenle dışarıdan alınması gerekmektedir. Özellikle pirinç, mısır, buğday ve darı gibi tahıllarda bol miktarda bulunmaktadır. Bunların haricinde ceviz, yerfıstığı, badem gibi kuru yemişlerde, pamuk yağı, mısırözü yağı, ayçiçeği yağı ve yeşil sebzelerde E vitamini içermektedir(Çaylak, 2011).

- **Askorbik Asit (C Vitamini):** C vitamini kan ve plazmada serbest radikallere karşı ilk savunmayı sağlayarak lipid peroksidasyonunu engeller. Ayrıca vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlayarak vitamin E'nin antioksidan etkinliğini artırır. Prooksidan özelliklerinden bahsedilmekle birlikte henüz kanıtlanamamıştır. Yüksek doz C vitamininin (2gr) yan etkisi bulunmamakla beraber özel bir faydası da saptanamamıştır. İnsan derisinde ultraviyolenin oluşturduğu oksidatif strese karşı önleyici olabileceği düşünülmektedir. Yeşil yapraklı sebzelerde (ıspanak, brokoli vb.), domates, turunçgiller, patates ve meyvelerde C vitamini bulunmaktadır(Derviş, 2011).

- **Beta-Karoten:** En iyi incelenmiş olan tipi güçlü bir antioksidan olan  $\beta$  karotendir. Karotenin küçük bir bölümünün A vitaminine dönüşmesi sayesinde plazma dengesi sağlanmakta ve A hipervitamins engellenmektedir. Kırmızı pigment olan  $\beta$ -karoten çok güçlü bir antioksidan olup, kansere yakalanma riskini azaltmaktadır. Şeftali, kayısı gibi meyvelerde, ıspanak, brokoli ve havuçta bol miktarda bulunmaktadır(Derviş, 2011).

- **Koenzim Q<sub>10</sub>:** Hemen hemen tüm dokularda bulunan yağda çözünen, vitamin benzeri bir maddedir. Hücrede mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kofaktörüdür, ATP üretimi için gereklidir ve güçlü lipofilik bir antioksidandır. Pek çok çalışma ile koenzim Q<sub>10</sub>'un sağlık üzerine etkileri araştırılmış, özellikle kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkları önlediği veya tedaviye yardımcı olduğu saptanmıştır. Diyetle alınabildiği gibi vücut tarafından da üretilmektedir. Kırmızı et, balık, soya fasulyesi yağı, kanola yağı ve susam yağı gibi bazı doğal yağlar ile brokoli ve karnabarda yüksek oranda bulunmaklabirlikte takviye amaçlı ticari olarak koenzim Q<sub>10</sub> tabletleri ile de alınabilmektedir(Ercan ve El, 2010).

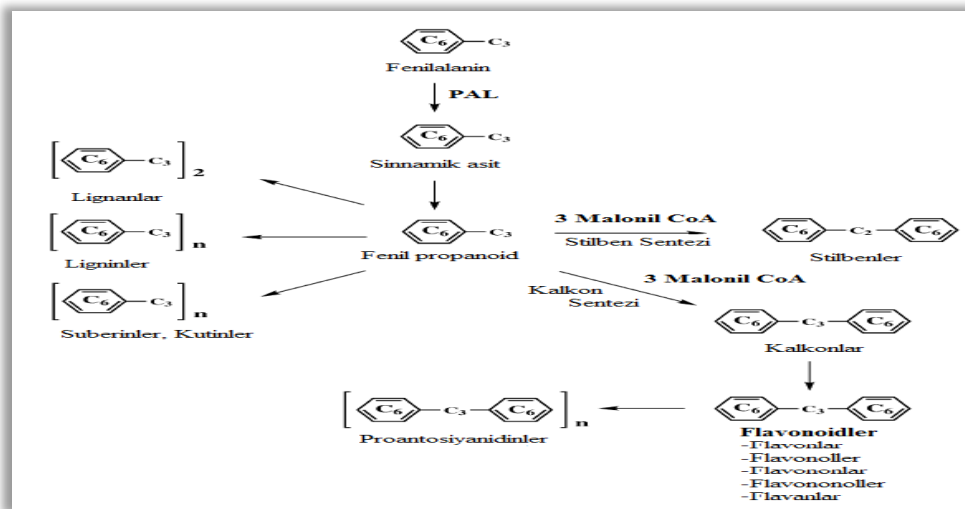
- **Likopen:** Yapılan klinik ve epidemiyolojik çalışmalar ile likopen içeren gıdaların tüketiminin başta prostat olmak üzere pek çok kanser türü, kalp rahatsızlığı, yaşlanma ve diğer hastalıklara karşı korunmada önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Özellikle domateste çok büyük miktarlarda likopen bulunmaktadır. Prostat ve kalın bağırsak kanserlerinin risklerini büyük oranda düşürdüğü laboratuvar çalışmalarıyla kanıtlanmıştır(Sabbağ ve Sürücüoğlu, 2011).

### 1.6. Fenolik Maddeler

Fenolik maddeleri kabaca basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür. Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler hidroksibenzoik asitler, hidroksisünamik asitler ve flavonoidler olmak üzere üç kısımda incelenebilirken, flavonoidlerin antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, izoflavonoidler, flavanonlar, kateşinler (flavanol), olmak üzere altı alt gruba bulunmaktadır (Yıldız ve Baysal, 2003).

### 1.7. Flavonoidler

Sarı-beyaz bir pigment olan flavonoid birçok meyve ve sebze yüksek oranlarda bulunmaktadır. Antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antiviral, antialerjik, antitrombotik özellikleri de bulunmaktadır. Bitkilerin çoğunda C ve E vitamininden çok daha fazla miktarlarda buldukları için meyve ve sebze ağırlıklı bir diyet ile fazla miktarlarda alınabilmektedir. Flavonoid oluşumu fenilalaninden hareketle gerçekleşmektedir (Şekil 1-2)(Kahraman ve ark., 2002).



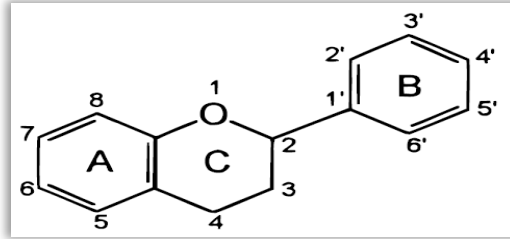
Şekil 1.2. Fenilalaninden flavonoid oluşumu

Kaynak:(Nacz ve Shahidi, 2004, s. 96)



Flavonoidlerin ya da diğer adıyla biyoflavonoidlerin biyolojik aktivitelerine ilişkin ilk çalışma 1936 yılında Rusznyak ve Szent.Gyorgyi tarafından yayınlanmıştır (Kim M.K. ve ark., 2009). Biyoflavonoidler, fenilalaninden türevlenmiş fenolik bileşikler içeren, bitkilerin meyve, tohum, çiçek ve yapraklarında bulunan renkli, yüksek antioksidan aktiviteye sahip, yapısındaki fenil halkalarına bağlı olan hidroksil gruplarına göre adlandırılan kompleks bileşikleridir (Çiftçi ve Yüce, 2013; Mülazımoğlu ve Özkan, 2008). Araştırmalara göre 4000' in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. Sarı renkli olmaları nedeniyle Latince “Sarı” anlamına gelen “Flavus” sözcüğünden türeyen “Flavonoid” adını almışlardır (Kahraman ve ark., 2002).

Flavonoidler, 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısında ( $C_6-C_3-C_6$ ) 15 karbon atomlu bileşiklerdir. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşik olarak kabul edilirler. Flavan çekirdeği ile karakterize edilen flavonoidler iki benzen halkasının (A ve B), oksijen içeren bir piren halkası (C) ile bağlanması ile oluşmaktadır (Çapanoğlu Güven ve ark., 2010). Basit bir flavan çekirdeği yapısı Şekil 1-3’de gösterilmiştir.



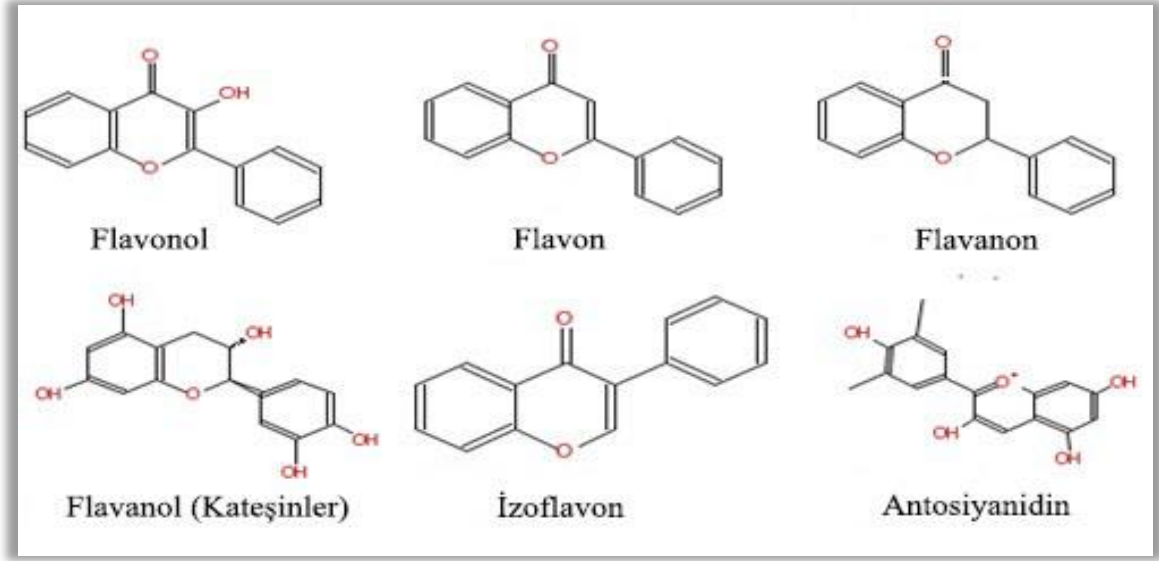
Şekil 1.3. Basit flavonoid yapısı (Flavan çekirdeği)

*Kaynak: (Pietta, 2000, s. 1036)*

A halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A'dan oluşan malonil koenzim A'nın 3 molekülünün kondenzasyonu, B ve C halkaları ise yine glikoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinnamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden oluşmuştur (Kahraman ve ark., 2002). Flavonoidlerin iskelet yapıları Şekil 1.4.'te görülmektedir.

Temel kaynakları, meyve ürünleri (narenciye meyveleri, kuşburnu, kayısı, vişne, üzümler, elma, kuş üzümü, yaban mersini), sebzeler (soğan, yeşilbiber, brokoli, domates, ıspanak), içecekler (kırmızı şarap, kahve, çay), kahve çekirdeği, soya ürünleri

ve baharatlardır (Çapanoğlu Güven ve ark., 2010). Kaynaklarına göre flavonoidlerin ana grupları ve bulundurduğu bileşikler Tablo 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Flavonoidlerin iskelet yapıları

Kaynak: (Lakhanpal ve Rai, 2007, s. 23)

Tablo 1.1. Flavonoidlerin ana grupları, bileşikleri ve besin kaynağı

GRUP	BİLEŞİK	KAYNAĞI
<b>Flavonoller</b>	Quercetin, Kaempferol, Myricetin, Isorhamnetin, Kuerctagetin	Sarı soğan, Kıvırcık lahanası, Pırasa, Kiraz, Domates, Brokoli, Elma, Yeşil ve Siyah çay, Siyah Üzüm, Yabanmersini
<b>Flavanonlar</b>	Naringenin, Eriodictyol, Hesperetin, Dihydroquercetin, Dihydrofisetin, Dihydrobinetin	Portakal Suyu, Greyfurt Suyu, Limon Suyu
<b>Flavonlar</b>	Tangeretin, Chrysin, Tricetin, Heptamethoxyflavone, Nobiletin, Sinensetin, Luteolin, Quercetogetin, Disometin, Apegenin,	Maydanoz, Kereviz, Kırmızıbiber

**Tablo 1.1. (Devamı)Flavonoidlerin Ana Grupları, Bileşikleri ve Besin Kaynağı**

<b>GRUP</b>	<b>BİLEŞİK</b>	<b>KAYNAĞI</b>
<b>Flavanoller</b>	Silibinin, Silymarin, Taxifolin, Pinobanksin	Kakao, Kakaolu içecekler, Çikolata
<b>İzoflavonoidler</b>	Daidzein, Genistein, Glycitein	Soya peyniri, Soya unu, Soya fasulyesi
<b>Kateşinler</b>	(+) Catechin, Gallocatechin, (-) Epicatechin, Epigallocatechin, Epicatechin 3-gallate, Epigallocatechin 3-gallate	Çikolata, Fasulye, Kayısı, Kiraz, Üzüm, Şeftali, Kırmızı şarap, Elma şarabı, Yeşil çay, Siyah çay, Böğürtlen
<b>Antosiyanidinler</b>	Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin, Petunidin	Yabanmersini, Frenk Üzümü, Siyah Üzüm, Kiraz, Erik, Çilek, Kırmızı şarap, Kırmızı lahana

**Kaynak:** (Lakhanpal ve Rai, 2007)

Flavonoidlerin elde edilmesi çalışmalarında sıklıkla çözücü ekstraksiyonu, tayin çalışmalarında ise kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılacak kaynağa göre çözücüler değişmekle birlikte, geliştirilen membran teknolojileri ile de fenolik maddelerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Flavonoidlerin elde edilmesi yöntemleri Tablo 1.2.'de özetlenmiştir(Yıldız ve Baysal, 2003).

Doğal ürünler olan flavonoidlerin sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğu uzun zaman önce bulunmuştur (Lakhanpal ve Rai, 2007). Flavonoidlerin antioksidatif, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antikarsinojenik, antimutajenik, antidiyabetik ve hepatoprotektif, kardiyovasküler sistemde damar genişletici, spazmolitik, östrajenik etki gibi birçok farmakolojik ve biyokimyasal aktivitelere sahip oldukları yapılan çalışmalarla açıklanmıştır. Bu nedenle kullanım alanları son yıllarda hızla artmaktadır (Yağcı ve ark., 2008).

**Tablo 1.2.**Flavonoid elde etme yöntemleri

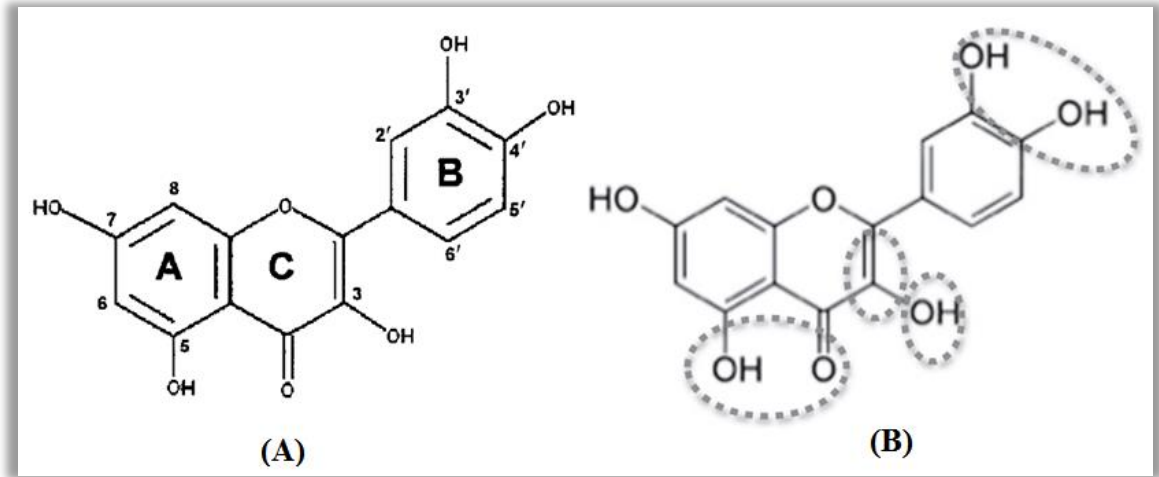
YÖNTEM	UYGULAMA	ÇÖZÜCÜ	KULLANIM ALANI
<i>Ekstraksiyon</i>	Çözücü Ekstraksiyonu	Metanol, Aseton, Hekzan, Eter, Etil asetat, Diklorometan, Benzen, Tuz	Kekik, lavanta, Kuşyemi, Zeytin ve yaprakları, Sarımsak, biberiye, adaçayı Mandarin, Patates kabuğu, çay
	Buhar Distilasyonu	Çözücü Ekstraksiyonu	
	Vakum Distilasyonu	Çözücü Ekstraksiyonu	
<i>Kromatografi</i>	Kolon kromatografisi		Elma posası, Ayçiçeği küspesi
	Sıvı kromatografisi		
<i>Membran</i>			Elma suyu

**Kaynak:** (Yıldız ve Baysal, 2003)

Flavonoidler en önemli antioksidan ve serbest radikal tutucu ve zincir kırıcılar olarak bilinmektedirler (Onyeneho ve Hettiarachchy, 1993; Sotillo ve ark., 1994). Flavonoidlerin antioksidan özellik gösterme kapasiteleri, sulu ortamda serbest radikal halinde bulunabilme özellikleriyle değerlendirilir (Pietta, 2000). Antioksidan aktivitelerine aromatik -OH gruplarının bağlanma yerleri ve sayıları etki etmektedir (Elik ve ark., 2007; Mülazımoğlu ve Özkan, 2008).

### 1.8. Kuersetin

Flavonoid türevi olan kuersetin (Qu) flavonoidlerin yapıtaşı olup serbest radikal temizleme açısından potansiyel bir antioksidandır (Çiftçi ve Yüce, 2013). Qu'nun B halkası orto-dihidroksi (katekol grubu), 3,5 ve 7 pozisyonundaki hidroksil ve 4-okso fonksiyonuyla C2-C3 çift bağdaki bütün yapısal elemanları antioksidan/antiradikal özelliklere sahiptir (Bose ve Michniak-Kohn, 2013). Qu molekülünün yapısı ve antioksidan kısımları Şekil 1.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Kuersetin molekül yapısı (A) ve antioksidan kısımları (B)

Kaynak:(Kroon ve ark., 2004, s. 16, Dajas, 2012, s. 388)

Antioksidatif çalışmaların sulu ortamda uygulanmasının daha doğru olmasına karşın Quile organik çözücüler ortamında da çalışılabilmektedir(Mülazımoğlu ve Özkan, 2008). Çalışmalar Qu molekülünün hidrofobik kısımlarına bağlı fenil halkaları ve hidroksil gruplarının polar pozisyonları nedeniyle amfipatik bir davranış gösterdiğini ortaya koymuştur(Srinivas ve ark., 2010).

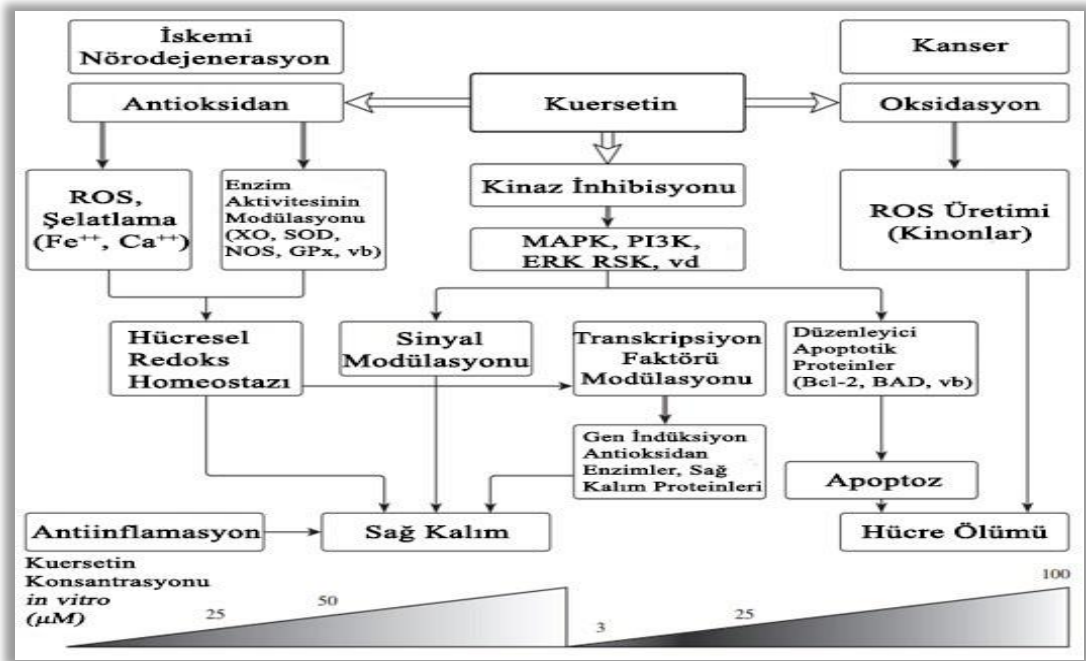
### 1.8.1. Kuersetinbileşiğine ait fiziksel özellikler

<b>IUPAC Adı</b>	:3,3',4',5,6-Pentahidroksiflavon
<b>Formülü</b>	:C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekül Ağırlığı</b>	:302.24 g/mol
<b>Yoğunluğu</b>	:1.799 g/cm <sup>3</sup>
<b>Görünümü</b>	:Sarı kristal toz
<b>Erime Noktası</b>	:316 °C (601 °F, 589 °K)
<b>Saklama Koşu</b>	:Güneş ışığından koruyarak oda sıcaklığında
<b>Çözünürlük</b>	:Suda hemen hemen hiç çözünmez. Alkali çözeltilerde çözünür.(http-3).

Narenciye, elma, soğan, maydanoz, adaçayı, siyah çay, kırmızı şarap, zeytinyağı, üzüm, kiraz, karadut, dereotu, kişniş, rezene yaprakları, brokoli önde gelen Qu kaynaklarıdır.

Qu'nun düşük çözünürlüğü ve buna bağlı olarak düşük emilime sahip olması *in vivo* olarak farmasötik ve terapötik açıdan etkin bir şekilde kullanılmasını engellemektedir. Sudaki çözünürlüğü 7.7 µg/mL, simüle edilmiş mide sıvısında 5.5 µg/mL, simüle edilmiş intestinal sıvı içerisinde ise 28.9 µg/mL çözünürlüğe sahiptir (Guo ve ark., 2012). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucu Qu'nun biyoyararlanımının da oldukça düşük olması (ratlarda %17'den, insanlarda %1'den az) nedeniyle *in vitro* koşulların *in vivo* ortamlara doğrudan uygulamasını zorlaştırmaktadır (Gao ve ark., 2011).

Qu, trozin kinaz inhibisyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik aktivitede etkindir (Kim M.K. ve ark., 2009). Yapılan son çalışmalar Qu'nun antioksidan aktiviteden başka çok daha fazla etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Qu'nun kendi başına ve başka moleküller ile kombinasyonunun malign hücrelerinin apoptozunu gerçekleştirdiği görülmüştür (Chien ve ark., 2009; Yağcı ve ark., 2008). Bunun yanında, Qu'nun sağlıklı hücreleri koruyup kanserli hücreleri apoptoza götürmesi konusunda hem antioksidan hem de prooksidan etki gösterdiği bulunmuştur (Çiftçi ve Yüce, 2013; Mülazımoğlu ve Özkan, 2008). Qu'nun antikanser ajan olarak çoklu ilaç direncine ters etkisi olduğu yapılan çalışmalar sayesinde güçlenmiştir (Elik ve ark., 2007). Qu'nun *in vitro* farmakolojik etkileri ile ilgili şematik gösterim Şekil 1.6.'da görülmektedir.



Şekil 1.6. Kuersetin'in *in vitro* farmakolojik etkileri şeması

Kaynak: (Dajas, 2012, s. 393)

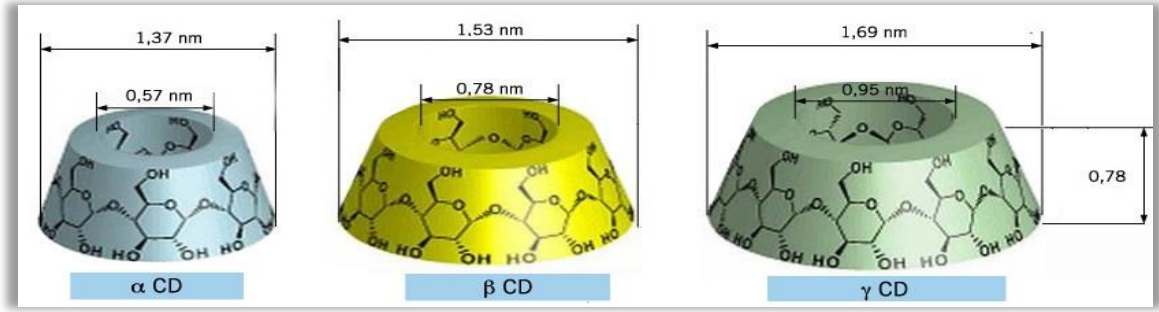
Qu molekülünün, gliyoma(Braganhhol ve ark., 2006), osteosarkom(Xie ve ark., 2011), serviks kanseri(Vidya Priyadarsini ve ark., 2010), prostat kanseri(Hsieh ve Wu, 2009), meme kanseri(Choi ve ark., 2008), kolorektal ksenogrefleri(Priego ve ark., 2008), miyeloid lösemi(Duraj ve ark., 2005), ağız boşluğu kanseri(Kang ve ark., 2010) ile ilgili literatürde *in vitro* antikanser etki çalışmaları bulunmaktadır.

### 1.9. Siklodekstrin

1891 yılında Fransız bilim adamı A. Villiers nişastadan elde ettiği maddelerin deneysel çalışmaları sonucunda bunların dekstrin olduklarını belirtmiş ve "cellulosine" olarak isimlendirmiştir (Brewster ve Loftsson, 2007). Daha sonra Avusturyalı mikrobiyolog Franz Schardinger patates nişastasından izole ettiği  $\alpha$ -dekstrin ve  $\beta$ -dekstrin kristal bileşiklerini tanımlamıştır (Loftsson ve Duchêne, 2007). Şimdilerde bu bileşikler çoğunlukla siklodekstrinler (CD'ler) ( $\alpha$ -siklodekstrin ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -siklodekstrin ( $\beta$ -CD) ve  $\gamma$ -siklodekstrin ( $\gamma$ -CD)) olarak daha az yaygın olarak siklomaltodekstrin (yani siklomaltoheksos, siklomaltoheptoz, siklomaltooktoz) ya da sikloamilozlar (yani sikloheksa amiloz, siklohepta amiloz ve siklooktaamiloz) olarak isimlendirilmektedir (Tiwari ve ark., 2010).

CD'ler, kimyasal ve fiziksel olarak nişastanın enzimatik modifikasyonu ile oluşturulan moleküllerdir. Lipofilik iç boşluğu ve hidrofilik dış yüzeyi ile 1,4- $\alpha$ -glikozidik bağlarla bağlanmış ve sırasıyla alfa( $\alpha$ ), beta( $\beta$ ) ve gama( $\gamma$ ) olarak adlandırılan altı, yedi veya sekiz glikoz birimleri olan siklik glikoz oligomerlerdir. Bu özel konfigürasyonları sayesinde, pek çok lipofilik molekül ile inklüzyon kompleksleri oluşturabilmektedirler. Dokuz glikoz birimli CD'ler  $\delta$ -CD olarak adlandırılır ancak zayıf kompleks oluşturma yeteneğine sahiptir(Challa ve ark., 2005).  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ve  $\gamma$ -CD yapıları Şekil 1.7.'de görülmektedir.

CD'lerin hidrofobik boşlukları hem polar hem de polar olmayan küçük misafir molekül ve polimerler için (guest), konak (host) molekül olarak uygun bir yapıdadır. Konak molekülü, misafir molekülleriyle inklüzyon kompleksi oluştururken aralarında oluşan kuvvetli bağlar (Van der Waals, Hidrojen, Hidrofobik vs.) ile misafir molekülün kararlılığı artmaktadır (Prabhu ve ark., 2015).

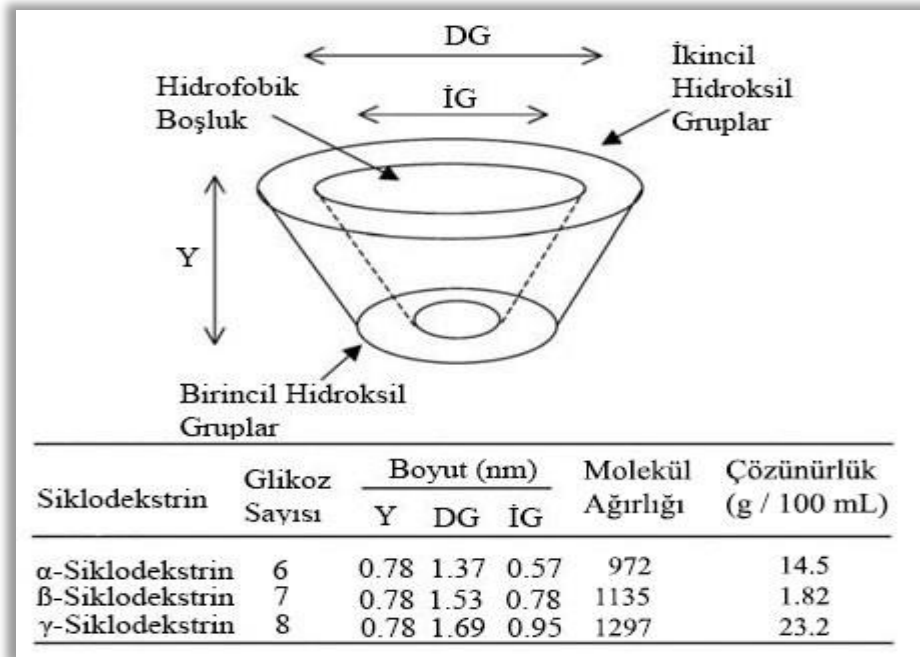


Şekil 1.7.α, β ve γ-CD'ler

Kaynak: (Voncina ve Vivod, 2013)

1970'lerin ortasında, doğal CD'lerin yapısal ve kimyasal özellikleri karakterize edilmiş ve birçok komplekslerle birlikte çalışmaları yapılmıştır(Szejtli, 1998). CD'lerin bazı fizikokimyasal özellikleri Şekil 1.8.'de görülmektedir.

Halen, CD'ler endüstriyel ve farmakolojik uygulamalar için kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır. CD'ler ilaçların göz, mide, bağırsak tahrişini önlemek veya azaltmak, hoş olmayan koku ve tatlarını ortadan kaldırmak, ilaç-ilaç ya da ilaç katkı maddesi etkileşimleri önlemek için sıklıkla kullanılmaktadır (Brewster ve Loftsson, 2007; Szejtli, 1988).



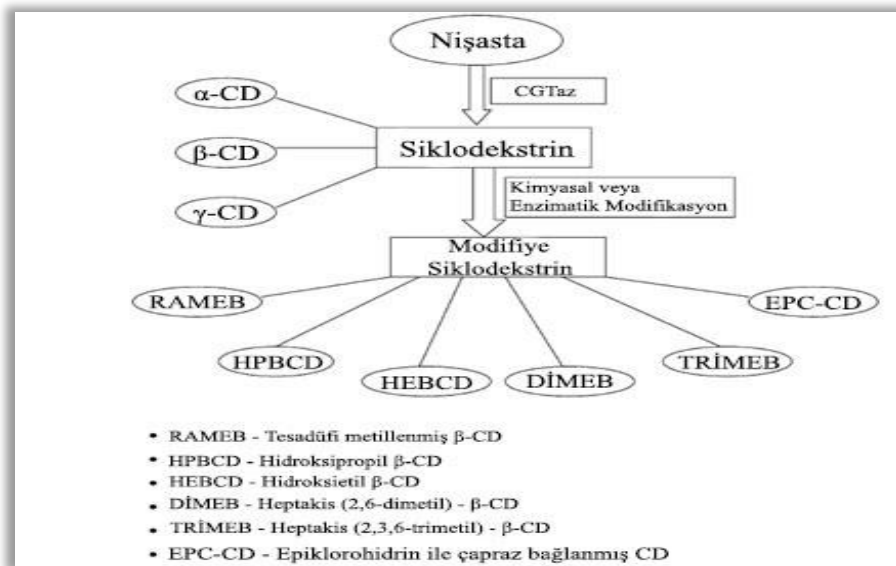
Şekil 1.8. CD'lerin fizikokimyasal özellikleri

Kaynak: (Challa ve ark., 2005)



İlaç molekülleri ve CD'ler ile yapılan inklüzyon kompleksleri, ilaçların çözünürlük, çözünme hızı, biyoyararlanım, kararlılık ve biyoyumluluk gibi fizikokimyasal özelliklerini olumlu yönde değiştirmektedir. CD'ler ayrıca sıvı maddelerin toz halde elde edilmesinde, maddelerin mikroorganizmalar tarafından parçalanmaya karşı korunmasında ve pigmentler ile maddelerin renginin maskelenmesinde kullanılırlar. Son zamanlarda, CD'ler kanser hücrelerinde istenilen ilaç salım davranışı elde etmek ve ilaçların terapötik etkinliğini artırmak için biyolojik uyarılara yanıt veren nanotaşıyıcı amaçlı fonksiyonel bileşen olarak da kullanılmaktadır (Del Valle, 2004; Duchêne ve Wouessidjewe, 1990).

Literatürde CD'ler ile ilgili çok sayıda çalışma, patent başvurusu ve konferans özetleri bulunmaktadır. CD'ler, polarizasyonu, boyutu ve biyolojik aktivitelerine göre sınıflandırılabilir. Çoğunlukla  $\beta$ -CD ve bunların hidrokispropillenmiş türevi, asetillenmiş  $\gamma$ -CD ve bazı özel durumlarda  $\alpha$ -CD ilaç taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Sadece hidrokispropillenmiş  $\beta$ -CD, sülfobütillenmiş  $\beta$ -CD ve temel  $\gamma$ -CD kabul edilebilir seviyede toksikolojik değerleri nedeniyle parenteral olarak kullanımı söz konusudur. Genel olarak CD türevleri, metil CD, hidrokispropil CD, sülfalkillenmiş CD ve sülfatlı CD sayılabilir. Ticari olarak satılan 100'ün üzerinde siklodekstrin mevcuttur (Loftsson ve Brewster, 1996; Szente ve Szejtli, 1999). Şekil 1.9. ve Tablo 1.3.'te CD'lerin halkalarında bulunan -OH gruplarının konumuna göre elde edilen bazı CD türevleri görülmektedir.



Şekil 1.9. Ana CD'ler ve türevlerinin sentez yolları

Kaynak: (Singh ve ark., 2002)

$\beta$ -CD'lerin boşluk çaplarının misafir moleküller için uygun olduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur. Bu nedenle  $\beta$ -CD'ler ilaç uygulamalarında biyouyumluluk açısından en sık kullanılan CD'ler olmuştur. Ancak  $\beta$ -CD'ler ikincil hidroksil grupları arasında moleküller arası güçlü hidrojen bağları nedeniyle sudaki çözünürlük ve inklüzyon kompleksi oluşumunda sınırlı bir etkiye sahiptir (Ahmed ve ark., 2015).

**Tablo 1.3.** CD türevleri

<i>Siklodekstrin Türevleri</i>		
$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
<i>Alkillenmiş</i>		
<i>Metil</i>	Metil Etil	Metil
<i>Bütil</i>	Bütil	Bütil
<i>Hidroksialkillenmiş</i>		
<i>2-Hidroksipropil</i>	Hidroksietil 2-Hidroksipropil 2-Hidroksibütil	Hidroksietil 2-Hidroksipropil

**Kaynak:**(Loftsson ve Brewster, 1996)

## 1.10. İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanma Yöntemleri

### 1.10.1. Birlikte çöktürme yöntemi

Yaygın olarak kullanılan bu metotta CD sulu çözeltisi karıştırılırken misafir molekül veya çözeltisi ilave edilir. Yapılan çalışmalarda misafir molekülün sıcaklık toleransına bağlı olarak  $\beta$ -CD konsantrasyonu %20'ye kadar arttığı görülmüştür. Çökelti oluşmasını engellemek için CD ve misafir molekül içeren çözeltisi karıştırılarak soğutulması gerekmektedir. Çökelek, kaptan kaba aktarma, santrifüj veya filtrasyon yapılarak alınabilir. Bunun haricinde az miktar su, etil alkol, metanol, asetat gibi diğer suyla karışabilen çözücüler ile yıkanabilir. CD'nin belirli miktar suda çözünürlüğü sebebiyle büyük ölçekte hazırlama bu yöntemin sakıncasıdır(Del Valle, 2004).

Bu yöntemde sadece CD ya da sadece misafir molekülün çökeltisi oluşabilir. Saf CD çökmesini engellemek üzere suda çözünürlüğü olan organik çözücülerin kullanılması tercih edilebilir(Duchêne ve Wouessidjewe, 1990).

### **1.10.2. Püskürterek kurutma / dondurarak kurutma (Liyofilizasyon) yöntemi**

A<sub>L</sub> tipinde bir faz-çözünürlük diyagramı olan kompleksler için püskürterek veya dondurarak kurutma yöntemleri ile kurutma yapılabilir(Denli, 2003).Püskürterek kurutma yönteminde sıcaklığın, akış hızının, basıncın kontrol edilebilmesi güçlüğü ve sıcaklık karşısında kararlı olmayan maddeler için liyofilizasyon uygun bir yöntemdir(Fukuda ve ark., 1986). Ayrıca liyofilizasyon uçucu bileşiklerin kaybını en aza indirir. Özellikle ısıya duyarlı misafir moleküller ve hidroksi propil CD kompleksleri gibi çözünür kompleksler için kullanışlı bir yöntemdir (Del Valle, 2004).

Bu yöntemlerin daha fazla miktarda ürün elde edilmesi, çözünür etkin maddeler için uygun olması, büyük ölçekte üretim yapılabilmesi gibi üstünlükleri vardır. Ancak, pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olması, elde edilen ürünün inklüzyon kompleksi yanında serbest CD ile serbest etkin maddeyi de içerebilmesi gibi sakıncaları da vardır(Denli, 2003).

### **1.10.3. Nötralizasyon yöntemi**

Asidik veya alkali ortamda CD içeren çözelti içerisinde misafir molekül çözündürülür ve daha sonra çözelti nötralize edilir. Kuvvetli asidik çözeltiler içerisinde CD'ler lineer oligosakkaritlere hidrolize olabilir (Denli, 2003).

### **1.10.4. Çimento (Slurry) yöntemi**

Çimento yönteminde CD'nintamamıyla çözünmesine gerek duyulmadan katı maddenin %50-60 kadarı su eklenip karıştırılır. Bu şekilde sulu faz çözelti CD açısından doygunluğa ulaşacak ve misafir molekülleri çözelti içerisinde CD ile kompleks oluşturacaktır. CD kompleksi sulu fazı doyuracağı için sulu fazın dışına kristalleşerek çökelek oluşturacaktır. CD kristalleri tekrar çözünecek ve sulu fazı tekrar doygunluğa ulaştıracaktır. Kompleks birlikte çöktürme yönteminde olduğu gibi toplanabilmektedir(Del Valle, 2004).

Metodun en büyük avantajı organik çözücü kullanılmadan yüksek verim, reaktörün büyük ölçekte kullanılabilmesi ve harcanan su miktarında sağlanan azalmadır. Ancak birlikte çöktürme yöntemine göre daha az saf olması yöntemin sakıncasıdır.

### **1.10.5. Pasta yöntemi**

Çimento yönteminin varyasyonu olarak uygulanabilen pasta metodunda, az miktarda su ile düşük ölçeklerde havan ve havaneli, büyük ölçeklerde ise yoğurma

makinesi kullanılarak misafir molekül CD ile karıştırılır. Oluşan kompleks doğrudan kurutulur(Del Valle, 2004).

#### **1.10.6. Nemli karıştırma ve ısıtma yöntemi**

Suyun çok az kullandığı ya da hiç kullanılmadığı bu yöntemde CD ve misafir molekülündeki su miktarı kuru kütle üzerinde en fazla % 20-25'i kadardır. Misafir molekül ile CD birlikte karıştırılır, kapalı kap içerisinde 100°C'ye kadar ısıtılır ve çıkarılıp kurutulur. Her misafir molekül için eklenen su miktarı, karıştırma derecesi ve ısıtma süresi uygun hale getirilmelidir (Akçakoca ve Atav, 2006).

#### **1.10.7. Ekstrüzyon yöntemi**

Nemli karıştırma ve ısıtma yönteminin türevi olan bu yöntemde CD, misafir molekülü ve su önceden ya da ekstrüdere eklenirken karıştırılabilir. Karıştırma derecesi, ısıtma miktarı ve süresi kontrol edilmelidir. Su miktarına bağlı olarak, ekstrüde edilen kompleks kendi kendine kuruyabildiği gibi kurutma için fırında kullanılabilir. Sürekli bir işlem olması ve çok az su kullanılması bu yöntemin üstünlükleri arasındadır. Isıya dayanıksız olan misafir moleküller bu yöntem ile dekompoze olması nedeniyle kullanılmamaktadır(Del Valle, 2004).

#### **1.10.8. Öğütme yöntemi**

Bu yöntemde su ve organik çözücü kullanılmadan misafir molekül ve CD birlikte öğütülerek dinamik ve termodinamik etkileşimleri sonucu inklüzyon kompleksler oluşmaktadır. Basit ve hızlı bir yöntemdir. Çözücü gerektirmemesi, büyük ölçeğe uyabilen bir yöntem olmasının getirdiği üstünlüklerin yanı sıra, bütün etkin maddelere uygulanamaması, az miktarda inklüzyon kompleksin oluşması, hatta oluşan tozun fiziksel karışım olabilme riskinin olması, nemli ortamlarda inklüzyon kompleksinin parçalanması gibi sakıncaları vardır (Denli, 2003).

#### **1.11. İnküzyon Komplekslerinin Analiz Yöntemleri**

CD'ler çok sayıda misafir moleküller ile inklüzyon kompleksi oluşturması, katı veya çözelti halinde kompleks elde edilebilmesi nedeniyle birçok alanda ve araştırmalarda tercih edilmektedir. Misafir moleküllerin CD ile bağlanması kalıcı değildir. Kompleks oluşması sırasında kullanılan su, kimyasal madde ve CD konsantrasyonu ve miktarına bağlı bir denge söz konusudur(Başaran, 2008).

Katı durumda misafir molekül uygun koşullar altında CD'nin boşluğuna yerleşir. Bu durum misafir molekülün fizikokimyasal özelliklerinde değişime neden olur. Bu

değişimlerin incelenebilmesi için çeşitli analiz yöntemleri söz konusudur. Bu yöntemler inklüzyon kompleksinin katı veya çözelti halinde olması durumuna göre farklılık göstermektedir(Bekers ve ark., 1991).

#### **1.11.1. Katı durumda inklüzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler**

- X- Işını Kırınımı Yöntemi
- Termoanalitik Yöntemler
  - Termogravimetri ve diferansiyel termogravimetri
  - Diferansiyel taramalı kalorimetri
  - Diferansiyel termal analiz
  - Çıkan gaz analizi
  - Termoanalitik sistem
- İnce Tabaka ve Kağıt Kromatografisi
- Infrared (IR) Spektroskopisi
- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)
- Islanabilirlik ve Çözünürlük Testleri

#### **1.11.2. Çözelti halinde inklüzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler**

- Spektroskopik Yöntemler
  - UV/görünür Spektroskopisi
  - Floresan Spektroskopisi
  - Dairesel Dikroizm Spektroskopisi
  - NMR Spektroskopisi
  - Elektron Spin Rezonans
- pH-potansiyometrik Titrasyon
- Elektrokimyasal Yöntemler
- Mikrokalerimetri
- Çözünürlük Yöntemi
- Yüzey Gerilimi Tekniği (Singh ve Bharti, 2010)

## 2. MATERYAL

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Asetik Asit: Riedel-de Haën, (Seelze, Almanya), Metil-Beta-Siklodekstrin (M- $\beta$ -CD): Sigma-Aldrich, (Steinheim,Germany),Qu: Sigma-Aldrich, (Steinheim, Germany),Etanol: Sigma-Aldrich, (ABD),Metanol: Merck, (Darmstadt, Almanya),Fetal Bovine Serum (FBS): Biochrom, (Germany),Penisilin streptomisin solüsyon: Gibco, (ABD),MEM non EAA: Gibco, (ABD), Sodyum hidroksit (NaOH): Merck,(Almanya), Tripsin: Biochrom,(Almanya),Anneksin V-Floresanizosiyanat(FITC)/Propidyum İyodür (PI) apoptoz kiti: BD, (ABD),Dimetilsülfoksit (DMSO): Applichem, (Almanya),[3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid] (MTT):Applichem, (Almanya),2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): Fluka, (Steinheim, Germany)

### 2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı: Arçelik No Frost, (Türkiye),Diferansiyel Taramalı Kalorimetri: Shimadzu DSC-60, (Japonya),Döner Buharlaştırıcı: Buchi, (Japonya),Erime Derecesi Tayin Cihazı:Electrothermal 9300, (ABD),Liyofilizatör: Leybold-Heraeus Lyovac GT-2, (Almanya)Etüv: Nüve FN500, (Türkiye),Fouriyer Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometresi: PerkinElmer Spektrum 2000, (İngiltere),Zeta Potansiyel Analiz Cihazı: Nano Zetasizer ZSMalvern Instruments, (İngiltere), UV-Vis spektrometre: Shimadzu UV-160A, (Japan), Hassas Terazisi: Ohaus, (İsviçre),İnkübatör: Nüve EN120, (Türkiye),Manyetik Karıştırıcı:Heidolph MR 3001 K, (Almanya),Nükleer Manyetik Rezonans Spektrofotometresi: UltraShield CP MAS NMR, (Brucker, Almanya),Taramalı Elektron Mikroskobu: FESEMSUPRATM 50 VP ZEISS, (Almanya)pH metre: WTW Profi Lab pH 597, (Almanya),Saf Su Cihazı: Millipore, (Fransa),Ultrasonik Banyo: Elma T470/H, (Singen, Almanya),X-Işını Kırınım Cihazı: XRD-Rikagu D/Max-3C, (Japonya),Yatay Çalkalayıcı:WiseShake SHR-1D, (Korea),Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi(HPLC):Shimadzu 20-A, (Japonya),Azot Tankı: Taylor, Wharton (Almanya),Karbondioksitli(CO<sub>2</sub>'li) etüv: Hera Cell 240 Thermo Scientific, (Almanya),Derin dondurucu (-20°C):Arçelik No Frost, (Türkiye),Floresan mikroskop:Leica, (Almanya),Laminar kabin (Steril Kabin): Heal Force, (Çin),Enzim BağlıImmunsorbent Yöntem (ELISA) reader: BioTek ELx800, (US),Su banyosu: Nüve BM302, (Türkiye)

### **2.3. Hücre Hattı**

HeLa (A3, CRL-2570, ATCC, ABD)(Servikal Adenokarsinoma) hücre hattı Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.SKOV-3 (İnsan OvaryumAdenokarsinoma) hücre hattı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Volga Durmuş'un laboratuvarından temin edilmiştir.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Validasyon Çalışmaları

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) validasyon çalışmalarının yapılması, sonraki analizler için büyük önem taşımaktadır. Validasyon ile analitik çalışmalardan doğru, güvenilir ve tekrar edilebilir veriler elde edilmesini sağlar. Uluslararası Harmonizasyon Komitesi'nin (ICH) analitik işlem validasyon yönergeleri kullanılarak doğrusallık, kesinlik, doğruluk, özgünlük, duyarlılık gibi analitik parametreler analiz edilip, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (ICH, 2005). Analizlerde kullanılan çalışma koşulları Tablo 3.1.'de verilmiştir (Gao ve ark., 2011; Zhao ve ark., 2011).

**Tablo 3.1.** HPLC çalışma koşulları

<b>Cihaz</b>	Shimadzu LC-20 AT
<b>Kolon</b>	Agilent, 4.6 x 150 mm, 5 µm C18
<b>Fırın Sıcaklığı</b>	40 °C
<b>Hareketli Faz</b>	Metanol: Su: Asetik Asit (%5'lik) (65:33:2)
<b>Detektör</b>	Diode Array
<b>Çalışılan Dalga Boyu</b>	373 nm
<b>Akış Hızı</b>	1 mL. dk <sup>-1</sup>
<b>Enjeksiyon Hacmi</b>	25 µL

##### 3.1.1. Doğrusallık (Linearity)

Doğrusallık, yapılan analitik çalışmaların tüm çalışma boyunca doğrusal bir ilişkisi olup olmadığının test edilmesidir. Doğrusallık çalışmasında, belirlenen aralıkta analizi yapılacak maddenin farklı konsantrasyonlarda örnek içermesi durumunda kromatogramda ölçülen pik alanı ile doğru orantılı olması beklenmektedir. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen pik alanları sayesinde tüm çalışma boyunca kullanılacak standart eğrinin (doğru denklemi) belirlenmesini sağlar. Böylece daha sonraki çalışmalarda tespit edilen herhangi bir pik alanının doğru denklemi yardımıyla konsantrasyonunun belirlenmesi mümkündür (ICH, 2005).



Doğrusallık çalışması için Qu'nun hareketli faz ile 100 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak 1-12.5-25-37.5-50-62.5-75 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler elde edilmiştir. Her bir konsantrasyondaki çözelti HPLC ile analiz edilmiş ve çalışmalar üçer kez tekrarlanmıştır.

### **3.1.2. Doğruluk (Accuracy)**

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığıdır ve % geri kazanım olarak ifade edilir(ICH, 2005). Doğruluğun belirlenebilmesi için, 3 farklı konsantrasyonda (25-37.5-50µg/mL) örnekler hazırlanmış, HPLC ile analiz edilmiş ve her bir konsantrasyon için 6 tekrar yapılmıştır. Doğru denklemi ile hesaplanan miktarlar, gerçek miktarlarla karşılaştırılmış; sonuçlar, % geri kazanım, standart hata (SH) ve standart sapma (SS) olarak verilmiştir.

### **3.1.3. Kesinlik (Precision)**

ICH validasyon yönergesine göre kesinlik, gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak yapılır. Gün içi tekrar edilebilirlik aynı işlem koşullarında ve kısa zaman aralığında aynı stok çözeltinin en az 6 tekrar veya farklı 3 konsantrasyonun 3 tekrarı sonucunda kesinliğini, günler arası tekrar edilebilirlik birbirinden bağımsız analizlerin, farklı günlerde, başka analistler, kullanılan farklı malzeme ve araçlar gibi değişkenlerle dahi kesinliğini ifade eder. Tekrar elde edilebilirlik validasyon için zorunlu bir parametre değildir. Farklı laboratuvarlarda analizin tekrar edilmesi sonucunda iki analizin kesinliğinin bir göstergesidir(ICH, 2005).

Gün içi tekrar edilebilirlik için örnekler 3 farklı konsantrasyon (1-37.5-75µg/mL) ve her biri 6 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Günler arası tekrar edilebilirlik için de aynı koşullarda farklı günlerde analizler yapılmıştır. Elde edilen veriler SH, SS ve % 95 güven aralığında (CI) verilmiştir.

### **3.1.4. Seçicilik (Specificity)**

Seçicilik karışım içerisindeki tek bir maddenin, formülasyonda ya da ortamda bulunan diğer maddelerin varlığında, derişiminin tam ve doğru olarak belirlenebileceğini gösteren en önemli analitik parametrelerden biridir. Tek bir bileşen için yapılan ölçüm, ortamda bulunabilecek diğer bileşenlerden (yardımcı maddeler, biyolojik örnekteki endojen bileşikler, etkin maddenin bilinen metabolitleri, safsızlıklar,

bilinen veya bilinmeyen bozunma ürünleri) kaynaklanabilecek girişimden etkilenmemelidir(ICH, 2005).

Yöntemin seçiciliğini belirlemek amacıyla; Qu'nun hareketli fazdaki çözeltisi, Qu içermeyen  $\beta$ -CD/sulu çözeltisi ve Qu içeren  $\beta$ -CD/sulu çözeltisi HPLC cihazı ile analiz edilmiştir.

### 3.1.5. Duyarlılık (Sensitivity)

Kullanılan analitik yöntemin düşük konsantrasyonları dedekte edebilme yeteneğine duyarlılık denir. Duyarlılık, saptama ve miktar tayini sınırı olmak üzere iki çeşittir. Saptama sınırı (Limit of detection=LOD), standart madde sinyalinin geri plan gürültüsünden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük madde miktarıdır. LOD'yi belirlemek için birçok yöntem vardır.

- Görsel değerlendirme
- Sinyal-Gürültü (Signal-Noise)
- Elde edilen cevabın ve eğimin standart sapması
  - Boş örneklerin standart sapması
  - Kalibrasyon eğrisinin kullanılması

Duyarlılık çalışmalarında, sistemin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimi olan saptama sınırı (LOD) değeri aşağıdaki Eşitlik3.1 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3.3 \times BSS}{m} \quad (3.1)$$

Burada, BSS: y eksenini kesim değerlerinin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimidir (ICH, 2005).

Miktar tayini sınırı (Limit of Quantitation=LOQ), standart maddenin güvenilir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli olan en düşük madde miktarıdır. LOD'nin belirlenmesi için kullanılan yöntemler, LOQ için de geçerlidir ve aşağıdaki Eşitlik3.2 ile hesaplanmıştır.

$$LOQ = \frac{10 \times BSS}{m} \quad (3.2)$$

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için, regresyon doğrusunun eğimi ve y-keşim değerlerinin standart sapması kullanılmıştır.

ICH'nin bildirisine göre, validasyon çalışmalarında sağlıklı/tutarlılık, sistem uygunluk testi, pik morfolojisi, teorik tabaka sayısı (N), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (As), kapasite faktörü (k'), seçicilik faktörü (a), ayırım gücü (Rs), pik yüksekliği veya alanın % bağlı standart sapması gibi parametreler de test edilebilmektedir. Ancak çalışmada yeni bir yöntem geliştirilmediği ve halihazırda literatür taraması ile tespit edilen metod modifiye edilerek kullanıldığı için, çalışmada bu parametreler test edilmemiştir.

### **3.2. Çözünürlük Çalışmaları**

#### **3.2.1. Qu'nun saf su ortamındaki çözünürlük tayini**

Saf Qu'nun saf sudaki çözünürlük tayini için, 5 mg Qu, 5 mL saf su bulunan behere konularak ultrasonik banyoda, oda sıcaklığında 30 dakika çalkalanmıştır. Çözelti 0.2 µm poliamid filtre ile süzülerek analiz yapılmıştır. Deney üç defa tekrar edilmiştir.

#### **3.2.2. Qu'nun 1:4 etanol: su ortamındaki çözünürlük tayini**

Saf Qu'nun 1:4 etanol: su karışımındaki çözünürlük tayini için, 5 mg Qu, 5 mL 1:4 etanol: su bulunan behere konularak ultrasonik banyoda, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Çözelti 0.2 µm poliamid filtre ile süzülerek analiz yapılmıştır. Deney üç defa tekrar edilmiştir.

#### **3.2.3. Qu/M-β-CD'nin faz çözünürlük tayini**

Faz çözünürlük çalışmaları Higuchi-Connors yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Higuchi ve Connors, 1965). Ön çalışmalarda, denge süresinin tespiti için 24, 48 ve 72 saat çalkalama sonrası çözünen Qu miktarı sonuçları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendiğinden denge süresi 24 saat olarak seçilmiştir. 2-18 mM artan konsantrasyon aralığında M-β-CD içeren 1:4 etanol:su (h/h) içerisine, aşırı miktarda (5 mg) Qu ilave edilmiştir. Süspansiyonlar oda sıcaklığında 300 rpm'de 24 saat yatay olarak çalkalanmıştır. Fotokimyasal bozunmanın önlenmesi için, şişeler işlem sırasında alüminyum folyo ile sarılmıştır. 24 saat sonunda denge elde edildikten sonra, numuneler toplanmış ve çözünmemiş katı maddelerin ayrılması için 0.2 µm poliamid filtreden geçirilmiştir. Örneklerin yeterli seyreltmeleri yapılarak HPLC ile analiz edilmiştir. Her deney üç defa gerçekleştirilmiştir.

### 3.3. İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması

İnküzyon kompleksleri hazırlanırken iki farklı yöntem kullanılmıştır. Qu/M- $\beta$ -CD faz çözünürlük tayininden elde edilen 1:1 molar oranı kullanılarak modifiye liyofilizasyon ve evaporasyon yöntemleri kullanılarak inküzyon kompleksleri hazırlanmıştır.

#### 3.3.1. Modifiye liyofilizasyon yöntemi

48 mL etanol içerisinde 0.453 g Qu ve 48 mL ultra saf su içerisinde 1.965 g M- $\beta$ -CD çözündürülerek çözeltiler karıştırılmış ve sonra oda sıcaklığında yatay çalkayıcıda ışıktan korunarak 300 rpm'de 24 saat çalkalanmıştır. 24 saatlik denge süresini takiben 0.2  $\mu$ m poliamid filtre ile filtre edildikten sonra döner buharlaştırıcıda 50  $^{\circ}$ C su banyosunda 100 mbar basınç altında etanolün buharlaşması sağlanmıştır. Daha sonra filtrat bir gece -20  $^{\circ}$ C'de bekletilmiş, liyofilize edilmiş ve elde edilen formül **L1** olarak kodlanmıştır (Bilensoy ve ark., 2007).

Farklı parametreleri denemek amacıyla, aşağıdaki çalışmalar ile yöntemde değişik uygulamalar kullanılmıştır. İlk olarak benzer şekilde 1:1 molar oranda hazırlanan çözelti karışımının, yatay çalkalayıcıda denge süresince çalkalanmasından sonra kısa bir süre sıvı azot tankında bekletilmiş ve liyofilize edilmiştir. Elde edilen liyofilize örnek **L2** olarak kodlanmıştır. Diğer bir uygulamada, denge süresince çalkalama sonrası alınan çözelti bir gece -80  $^{\circ}$ C'de dondurulmuş ve daha sonra liyofilize edilmiştir. Elde edilen liyofilize örnek **L3** olarak kodlanmıştır. Bir başka formülasyonda ise 1:1 molar oranında etanol ve su yerine sadece su ile çözelti hazırlanmış, denge süresince çalkalama sonrasında da -80  $^{\circ}$ C'de dondurularak liyofilize edilmiştir. Elde edilen formülasyon **SS** olarak kodlanmıştır. (Corciova ve ark., 2015).

#### 3.3.2. Evaporasyon yöntemi

48 mL etanol içerisinde 0.453 g Qu ve 48 mL ultra saf su içerisinde 1.965 g M- $\beta$ -CD çözündürülmesi ile hazırlanan çözeltilerin karışımı, denge süresince yatay çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 50  $^{\circ}$ C sıcak su banyosunda 100 mbar basınç altında döner buharlaştırıcı ile kurutulmuştur. Daha sonrakalan nemi uzaklaştırmak için 40  $^{\circ}$ C'de bir gece bekletilmiştir. Formül **L4** olarak kodlanmıştır (Sri ve ark., 2007).

### 3.3.3. Plasebo formül

48 mL ultra saf su içerisinde 1.965 g M-β-CD çözündürüldükten sonra 48 mL etanol ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında yatay çalkayıcıda ışıktan korunarak 300 rpm'de 24 saat çalkalanmış, bir gece -80 °C'de bekletildikten sonra liyofilize edilmiştir. Hazırlanan tüm kompleksler kullanıma kadar nem çekmemesi için desikatörde tutulmuştur.

### 3.4. Yükleme Verimliliği

Hazırlanan komplekslerde yüklenen ilaç miktarının (Y.İ.) tespit edilmesi için 1 mL mobil faz içerisinde 1 mg formül çözündürülmüş, elde edilen çözelti 1: 10 oranında mobil faz ile seyreltilerek HPLC çalışma koşullarında analiz edilmiştir. Yüklenen ilaç miktarı yüzdesi için Eşitlik 3.3'den faydalanılmıştır (Das ve ark., 2010; Gupta ve ark., 2010).

$$\% Y. İ. = \frac{\text{Kompleksteki ölçülen } Qu \text{ miktarı}}{\text{Kullanılan } Qu \text{ miktarı}} \times 100 \quad (3.3)$$

### 3.5. Zeta Potansiyeli

Nötral yükteki dispers faz ile nanopartiküllerin çeşitli iyonlar içeren yüzeyi arasındaki elektriksel potansiyel farkı zeta potansiyeli olarak adlandırılmaktadır (Zidan ve ark., 2007). Zeta potansiyeli ile nanopartikül kararlılığı oldukça ilişkilidir. Nanosüspansiyonlarda yüksek yüzey potansiyeli partiküller arasındaki kohezyonu azaltır dolayısıyla yüksek kararlılıkla sonuçlanır (Singh ve Lillard, 2009).

Hazırlanan Qu/M-β-CD formülasyonlarının zeta potansiyel analizleri, pH 7.4 fosfat tamponundaki dispersiyonlarının Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı ile analiz edilmesi sonucunda elde edilmiştir. Ölçümler tek kullanımlık zeta hücrelerinde, 25 °C'de oda sıcaklığında yapılmıştır. Analizler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistik analizleri Anova Two-Way yöntemi ile yapılmıştır.

### 3.6. Fizikokimyasal Karakterizasyon

Fizikokimyasal karakterizasyonu için parçacık büyüklüğü, parçacık büyüklük dağılımı (PDI = Polydispersity Index), termal analiz (DSC = Differential Scanning Calorimeter), X-ışını kırınımı (X-RD = X-ray Diffraction), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR = Fourier Transform Infrared Spectroscopy), proton nükleer manyetik rezonans (<sup>1</sup>H-NMR = Proton Nuclear Magnetic Resonance) ve alan

emiyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM = Field Emission Scanning Electron Microscope) analizleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.6.1. Parçacık büyüklüğü ve PDI (Polidisperslik indisi)**

İlaç taşıyıcı sistemlerin parçacık büyüklüğü çok önemlidir. Partikül büyüklüğüne göre ilaç taşıyıcı sistemler farklı doku ve organlarda birikmektedir(Gaumet ve ark., 2008). İy bir ilaç taşıyıcı sistemin parçacık büyüklüğü kan damarındansızmayacak kadarbyk, mononükleer fagositik sistem tarafından dafark edilmeyecek kadar küçük olmalıdır(Singh ve Lillard, 2009).

Formülasyonların karakterizasyonunda ilaç yükleme, ilaç salım ve stabilitesini etkilediği için parçacık büyüklüğü ve dağılımı önemlidir.Hazırlanan Qu/M-β-CDkomplekslerinin parçacık byklekleri pH 7.4 fosfat tamponundaki dispersiyonları kullanılarak lazer difraksiyon tekniği ile Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazındatespit edilmiştir. Ölçümler 25 0C’de oda sıcaklığında üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Anova Two-Way yöntemi ile yapılmıştır.

### **3.6.2. DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetri)**

Qu, M-β-CD, fiziksel karışım (PM) ve inklüzyon komplekslerin termal analizi, DSC kullanılarak belirlenmiştir. 10<sup>-4</sup> duyarlılıkla tartılan yaklaşık 5 mg ağırlığındaki örnekler, alüminyum örnek kabında basınçla sıkıca kapatılarak50 mL.dk<sup>-1</sup> azot akış hızı, 10 0C.dk<sup>-1</sup> sıcaklık artışı ile 30-3500C aralığında boş alüminyum referansa karşı analiz edilmiş ve örneklerin termogramları elde edilmiştir.

### **3.6.3. XRD (X-ışını kırınımı)**

X-ışını kırınım analizleri, 2-40 0C aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddetinde ve 2 0C.dk<sup>-1</sup> ilerleme hızında Rikagu jeneratör kullanılarak yapılmış ve karakteristik X-ışını kırınım pikleri incelenmiştir.

### **3.6.4. FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi)**

FT-IR analizlerinde 400-4000 cm<sup>-1</sup> arasında spektrumlar alınmıştır.

### **3.6.5. 1H-NMR (Proton nükleer manyetik rezonans)**

1H-NMR spektrumları, Bruker NMR cihazı (500 MHz) (ABD) kullanılarak elde edilmiştir. Bu alışmada, Qu’nun sudaki znrlğnnk düşük olası nedeniyle

uygun çözünürlüğü elde etmek için örnekler dötöro dimetilsülfoksit kullanılarak hazırlanmıştır.

### 3.6.6. FESEM (Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu)

3-4 kV voltaj altında 5.00 K X ve 2.00 K X büyütme ile alan emisyon taramalı elektron mikroskobu kullanılarak numunelerin fotomikrografları alınmıştır.

### 3.7. *İn Vitro* Salım Çalışması

Salım çalışmaları 50 mL pH 1.2 ortamında 1 mg saf Qu ve eşdeğer miktarda Qu içeren kompleksler ile yapılmıştır. Çalışma 37 °C'de, 100 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcı ile gerçekleştirilmiştir. Önceden belirlenen zaman aralıklarında (5-10-20-30-60-90-120 dakika) 1 mL örnekler alınmış ve ortama aynı hacimde taze ortam sıvısı ilave edilmiştir. Örnekler 0.2 µm poliamid filtreden süzülerek HPLC ile analiz edilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak yapılmıştır (Wu ve ark., 2008).

### 3.8. Çözünme Profillerinin Benzerliğinin Araştırılması

İstatistiksel açıdan çözünme profillerinin “yeterince yakın” olup olmadığının değerlendirilmesine yönelik olarak, resmi otoritelerce de kabul edilen, f1 (fark etkeni) ve f2 (benzerlik etkeni) olarak isimlendirilmiş iki yöntem geliştirilmiştir (Ağabeyoğlu, 2007).

Çözünme hızı profillerinin fark etkeni ve benzerlik etkeni değerlerinin hesaplanmasında Eşitlik 3.4 ve Eşitlik 3.5'ten faydalanılmaktadır.

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100 \quad (3.4)$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left( \sqrt{1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2} \right)^{-1} \times 100 \right\} \quad (3.5)$$

### 3.9. Antioksidan Aktivite Testi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), organik çözücüler içinde serbest radikal üreten şiddetli renk veren nitrojen radikalidir. Antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu, 517 nm'de DPPH'tan kaynaklanan mor rengin absorbansının azalmasına neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabitlenene kadar takip edilir. DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren

numune miktarı  $\mu\text{g/mL}$  cinsinden belirlenmekte ve  $\text{IC}_{50}$  değeri olarak ifade edilmektedir(Carmona-Jiménez ve ark., 2014).

İndirgenme reaksiyonu renksiz bir çözelti oluşturularak elde edilen Qu varlığında meydana gelir. Aktif maddelerin antioksidan özelliklerini belirlemek adına DPPH kullanımı hızlı ve kolay bir yol sağlamaktadır(AnandamveSelvamuthukumar, 2014; Coneac ve ark., 2009).

Bu nedenle saf Qu ve komplekslerinin antioksidan aktivitesi DPPH ile *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada DPPH etanol çözeltisi 0.2 mM'lık bir konsantrasyonda hazırlanmıştır. 1 mL içerisinde 1  $\mu\text{g}$  ve 5  $\mu\text{g}$  Qu içeren etanol bazlı saf Qu ve kompleksleri 1 mL DPPH stok çözeltisine eklenmiştir. Karışımın reaksiyonu üretmesi için 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Absorbans 517 nm' de UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür(Kumari ve ark., 2010).Örneklerin serbest radikal yüzdeleri aşağıdaki Eşitlik3.6 ile hesaplanmıştır(Wu ve ark., 2008).

$$\% \text{ Etki} = \frac{\text{Kontrol Abs}(517) - \text{Örnek Abs}(517)}{\text{Kontrol Abs}(517)} \times 100 \quad (3.6)$$

### 3.10. Kararlılık Çalışmaları

Qu saf maddesi, PM, seçilen formülasyonlar (L1, L3 ve L4), 3 aylık bir depolama süresi boyunca farklı sıcaklıklarda ( $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ )ve ışıktan etkilenmeyecek şekilde saklanmıştır. Bu süre zarfında ve sonunda bozunmadan kalan % Qu miktarları, parçacık büyüklükleri, parçacık büyüklük dağılımları ve zeta potansiyelleri analiz edilmiştir.

### 3.11. Hücre Kültürü Çalışmaları

Servikal adenokarsinoma hücreleri (HeLa), % 20 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve % 4 sodyum bikarbonat içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besi yeri içerisinde, % 5  $\text{CO}_2$  iç atmosfere sahip inkübatörde  $37^{\circ}\text{C}$  de kültürde tutulmuştur. Her 3 günde bir hücreler tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 oranında alt kültürlerle ayrılarak pasajlanmıştır.

SKOV-3 hücreleri % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin içeren DMEM besi yerinde, % 5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de kültür ortamında tutulmuştur.

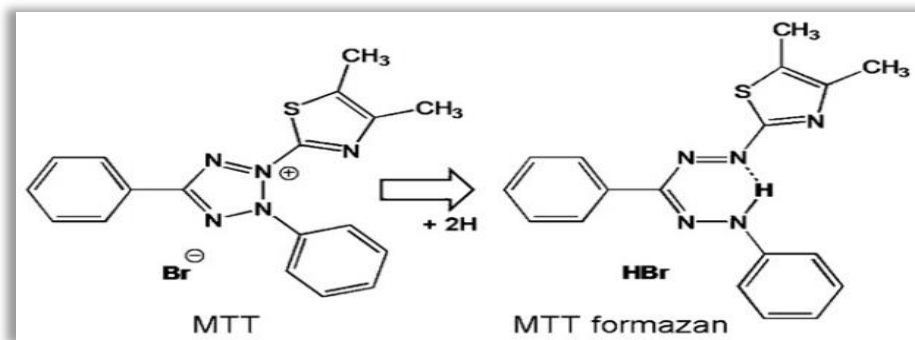


Hücreler 1 X tripsin-EDTA solüsyonu ile her 3 günde bir 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürlerle ayrılarak pasajlanmışlardır.

### 3.11.1. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)

Bu tez çalışması kapsamında sitotoksosite testi olarak MTT yöntemi tercih edilmiştir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) suda çözünebilir sarı bir tetrazolyum tuzudur. MTT'nin formazan kristaline dönüşü Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. MTT yöntemi suda çözünebilir tetrazolyum tuzlarının mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından suda çözünmeyen koyu mavi/mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. Canlı hücre sayısı oluşan MTT formazan miktarı ile doğru orantılıdır ve kolorimetrik olarak ölçülmektedir(Stockert ve ark., 2012).

Qu ve Qu ile hazırlanmış formülasyonların (L1, L3, L4, SS) ve plasebo formülün hücre canlılığı üzerine etkilerinin araştırılması için  $8 \times 10^5$  hücre/mL de olacak şekilde hazırlanan HeLa ve SKOV-3 hücre süspansiyonlarından, 100  $\mu$ L alınarak 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarına aktarılmıştır. Daha sonra hücrelere 50, 100, 200, 300, 500, 1000 ve 1500  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarında Qu ve diğer formülasyonlar eklenerek HeLa hücre hattı için 37°C'de 24 ve 48 saat süre ile SKOV-3 hücre hattı için 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. Bu sürelerin sonunda iki kere fosfat tamponu çözeltisi (PBS) ile yıkama yapılmış ve her kuyucuğa 20  $\mu$ L MTT boyası (stok konsantrasyonu 5 mg/mL) ilave edilerek hücreler 37°C'de 2 saat daha inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmış ve her bir kuyuya 200  $\mu$ L DMSO eklenerek 10 dakika karıştırıcıda bekletilmiştir. Renk değişimi, ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile ölçülmüştür.



Şekil 3.1.MTT bileşiğinin formazan kristallerine dönüşümü

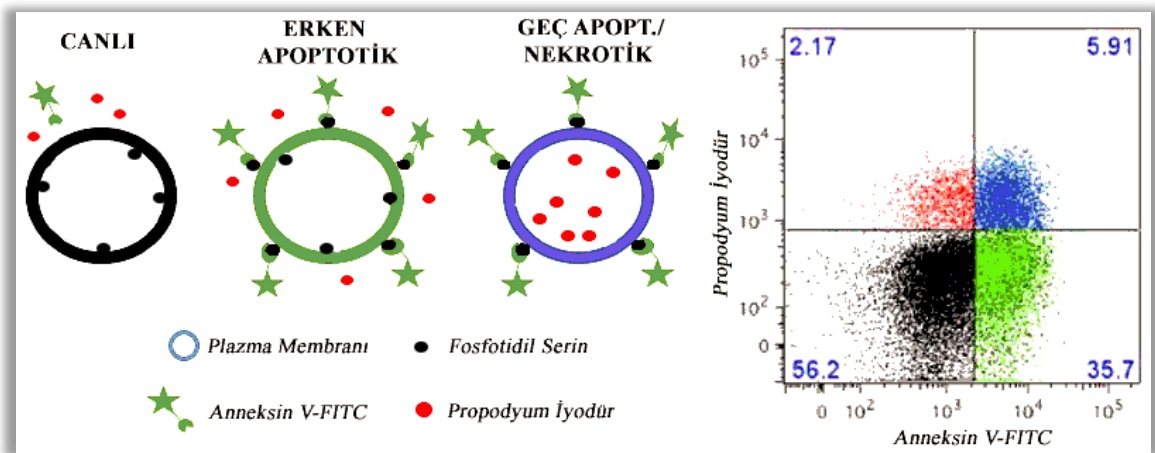
Kaynak:(Stockert ve ark., 2012)

Maddeler ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir. Deney sonuçları pozitif kontrole göre değerlendirilmiştir. Deneyler her seferinde dört bağımsız kuyucukta gerçekleştirilmekle birlikte iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Anova Two-Way yöntemi ile yapılmıştır.

### 3.11.2. Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile apoptoz belirleme

Hücreler, 24 saat süre ile Qu ve Qu formülasyonları ile 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkanmış ve sonra 1x 10<sup>6</sup> hücre/mL olacak şekilde bağlanma solüsyonu ile dilüe edilmişlerdir. Hücrelere 5 µL Anneksin V-FITC ve 5 µL propodyum iyodür (PI) ilave edilerek oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. 400 µL Anneksin-V bağlanma çözeltisi ilave edilmiş hücre çözeltisi akım sitometri tüplerine aktarıldıktan sonra bir saat içerisinde analiz edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre miktarı pozitif kontrole göre hesaplanmıştır.

Anneksin V-FITC kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfotidil serine bağlanma oranı akış sitometri ile kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Canlı hücreler; FITC (-), PI (-); erken apoptotik hücreler FITC (+), PI (-); ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+), PI (+) şeklinde boyanmaktadır (Kockx ve ark., 1998; Overbeeke ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1998). Bölgeler ve anlamları Şekil 3.2.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Apoptozun akım sitometrisi ile analizi

Kaynak: (<http-6>)

### 3.11.3. Hoechst boyama

Apoptozun floresan mikroskop ile gösterilmesi için Hoechst 33342 (Bisbenzimit) ile işaretleme yapılmıştır. 24 kuyucuklu plakalara  $1 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde ekilen hücreler madde ilavesi sonrası 24 saat %5 CO<sub>2</sub> 37 °C'de etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası % 1 soğuk PBS ile 2 defa yıkanan hücreler %4'lük paraformaldehit ile tespit edildikten sonra %1 PBS içindeki 1 µg/mL konsantrasyonundaki Hoechst 33342 (Bisbenzimit) ile 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından %1'lik PBS ile yıkaması yapılan örnekler, Leica floresan araştırma mikroskobunun A filtresi ile incelenerek DFC295 kamera ile fotoğraflanmıştır.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

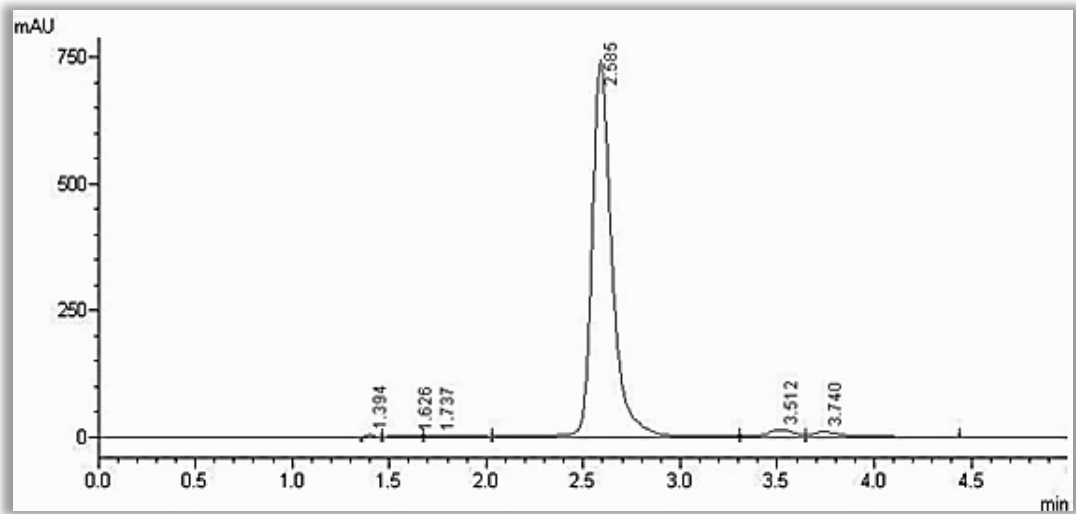
Bu bölümde, analitik yöntem validasyonuna ait sonuçlar, formülasyon bileşenleri ve formülasyonların fizikokimyasal özelliklerine ait bulgular ve formülasyonların *in vitro* çalışma verileri sunularak sonuçları tartışılmıştır.

##### 4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Validasyon Çalışmaları

HPLC ön çalışmalarında hareketli faz olarak, uygun pik morfolojisi ve alıkonma zamanının elde edildiği Metanol: Su: Asetik Asit (%5'lik) (65:33:2) hareketli fazı ile çalışılmasına karar verilmiştir. Pik şekli ve alıkonma zamanı için kolonun özelliklerine uygun olarak 1.0 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Enjeksiyon hacmi, kolon koşullarına uygun olarak validasyon çalışmalarında ve analizlerde 25 µL olarak uygulanmıştır. Tüm HPLC çalışmaları 40 °C kolon sıcaklığında yapılmıştır. Yapılan literatür taramalarından yola çıkarak 4.6 x 150 mm, 5 µm C18 kolon tercih edilmiş ve tüm çalışma bu kolon ile yapılmıştır (Gao ve ark., 2011; Zhao ve ark., 2011).

##### 4.1.1. Doğrusallık (Linearity)

Qu'nun hareketli faz içindeki çözeltileri hazırlanarak HPLC ile analizleri yapılmıştır. Çalışmada Qu'nun 1-12.5-25-37.5-50-62.5-75 µg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. Her bir konsantrasyonda elde edilen kromatogramlardaki pik alanları (mAU) yardımıyla doğrusallık grafiği çizilmiş ve doğrusallık denklemi ile regresyon karesi hesaplanmıştır. Saf Qu'ya ait kromatogram Şekil 4-1'de, yapılan analizlerin konsantrasyona bağlı mAU değerleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.



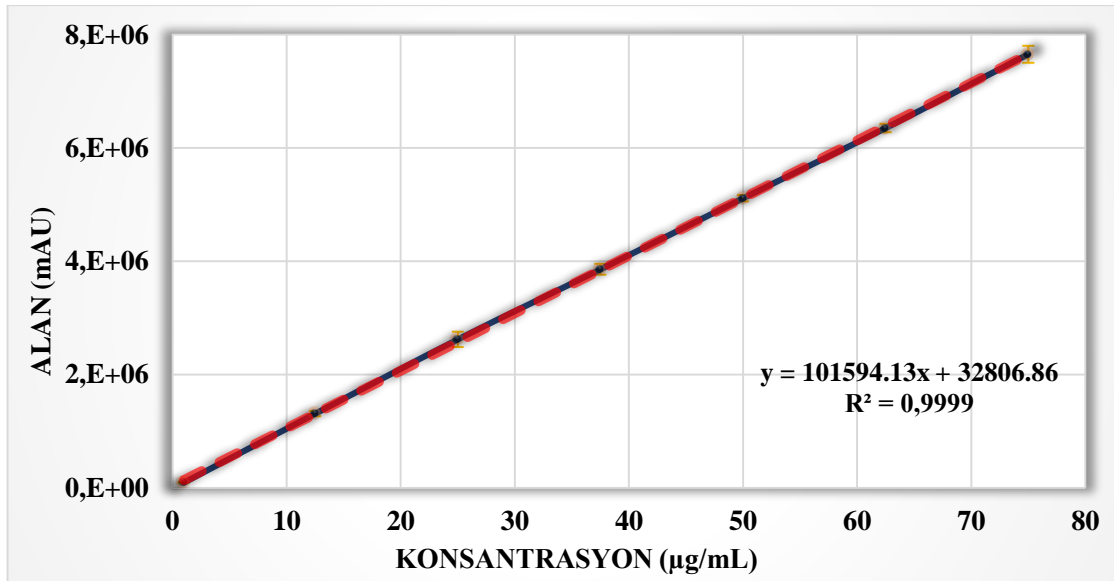
Şekil 4.1. Saf Qu'ya ait kromatogram

**Tablo 4.1.** *SafQu'nun HPLC analizi ile elde edilen mAU değerleri*

Qu Kon. (µg / mL)	PİK ALANLARI (mAU)			
	1.Seri	2.Seri	3.Seri	Ortalama ± SH*
1	85419	98951	96748	93706 ± 3422.77
12.5	1262002	1266478	1401401	1309960 ± 37345.40
25	2345443	2765161	2752217	2620940 ± 112512.69
37.5	3673665	3992332	3906073	3857357 ± 77699.03
50	5009996	5209487	5115369	5111617 ± 47045.42
62.5	6211674	6468050	6375023	6351582 ± 61181.45
75	7354668	7775891	7833055	7654538 ± 123160.64

\*SH: Standart Hata

Yapılan çalışma sonucunda doğru denklemi;  $y = 101594.13x + 32806.86$  ve regresyon karesi;  $R^2 = 0.9999$  olarak hesaplanmıştır. Doğrusallık grafiği Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** *Saf Qu'ya ait doğru grafiği*

#### 4.1.2. Doğruluk (Accuracy)

25-37.5-50 µg/mL konsantrasyonlarına ait HPLC ile gerçekleştirilen 6'şar analizin sonuçları doğru denklemi yardımıyla geri kazanım yönünden değerlendirilmiştir. % 100 ± 2 aralığında elde edilen geri kazanım sonuçlarına göre

yöntemin doğruluğunun kabul edilebilir olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2.)(ICH, 2005).

**Tablo 4.2.***Saf Qu'nun HPLC ile elde edilen % geri kazanımları*

Qu (µg/mL)	Geri Kazanım (µg/mL)	% Geri Kazanım
25	25.4752 ± 9.3972 ± 5.4255	101.9009
37,5	37.6454 ± 4.3264 ± 2.4978	100.3877
50	49.9912 ± 1.9646 ± 1.1343	99.9824

n=6, Ort ± SS ± SH, SS:standart sapma

#### 4.1.3. Kesinlik (Precision)

Analitik yöntemin kesinliği ile ilgili tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik ölçütlerinin değerlendirildiği farklı konsantrasyonlarda yapılan ölçümlerde, % varyans katsayıları % 2'nin altında ise kullanılan yöntemin kesinliği kanıtlanmış denebilir(ICH, 2005). Literatür ayrıca tekrarlanabilirlik için maksimum % 3, tekrar elde edilebilirlik için maksimum % 5 değerini vermektedir(Shabir, 2003).Kesinlik çalışmasına ait analizler farklı üç günde, üçkonsantrasyonda (12.5-37.5-75 µg/mL) yapılmış ve RSD değerleri sırasıyla 3 ve 5'den küçük bulunmuştur.

**Tablo 4.3.***Saf Qu'nun 1 µg/mL kesinlik için elde edilen mAU değerleri*

1 µg/mL	Gün içi n=6			Günler Arası n=18
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
<b>Ortalama</b>	98337.00	99071.00	94384.00	97264.00
<b>Standart Sapma</b>	764,40	3020,52	1305,00	1696,64
<b>Standart Hata</b>	312,07	1233,12	532,76	692.65
<b>RSD</b>	1,2778	5.0963	2,3216	2,8986

**Tablo 4.4.** *Saf Qu'nun 37.5 µg/mL kesinlik için elde edilen mAU değerleri*

37.5 µg/mL	Gün içi n=6			Günler Arası n=18
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
<i>Ortalama</i>	3701351.00	3803808.00	3913388.00	3806182.00
<i>Standart Sapma</i>	17102,88	24679,15	20285,41	20689,15
<i>Standart Hata</i>	6982,22	10075,22	8281,48	8446,31
<i>RSD</i>	0,5107	0,7169	0,5726	0,6001

**Tablo 4.5.** *Saf Qu'nun 75 µg/mL kesinlik için elde edilen mAU değerleri*

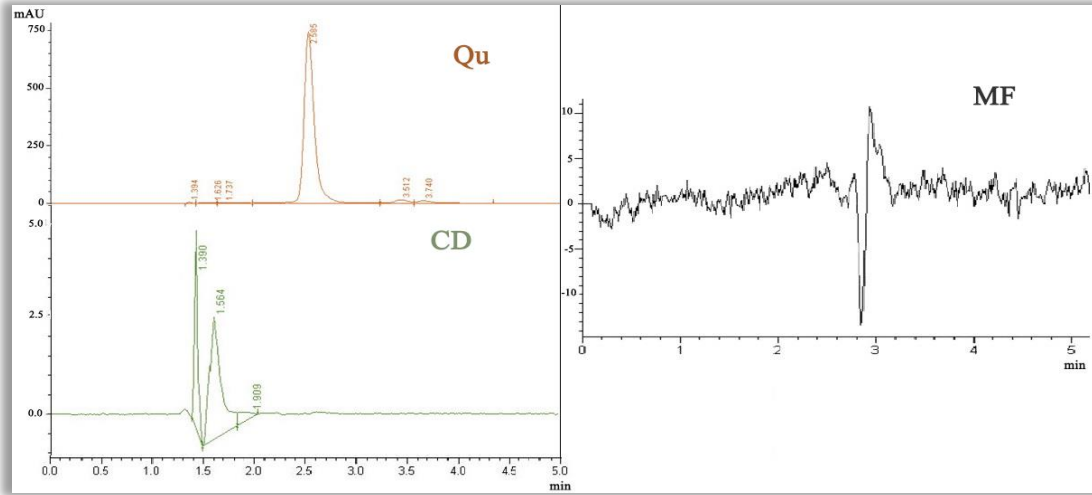
75 µg/mL	Gün içi n=6			Günler Arası n=18
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
<i>Ortalama</i>	7448690.00	7655808.00	7820020.00	7641506.00
<i>Standart Sapma</i>	9257.43	34970.70	28260.30	24329.49
<i>Standart Hata</i>	3779.32	14276.73	11741.34	9932.46
<i>RSD</i>	0,1367	0,5025	0,4046	0,3480

#### 4.1.4. Seçicilik (Specificity)

Seçicilik çalışması için hareketli faz, hareketli faz ile hazırlanan Qu ve M-β-CD çözeltilisine ait analizler HPLC ile yapılmıştır. Hareketli faz ve M-β-CD çözeltilisine ait kromatogramlarda Qu'nun alıkonma zamanında (Retention Time=Rt = 2.585 dakika) pik görülmediği için yöntemin seçici olduğuna karar verilmiştir. Seçicilik ile ilgili kromatogramlar Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.

#### 4.1.5. Duyarlılık (Sensitivity)

Kullanılan analitik yöntemin düşük konsantrasyonları saptayabilme yeteneği olan duyarlılığın tespitinde LOD için eşitlik 3.1, LOQ için eşitlik 3.2 ile hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.61 µg/mL ve 4.89 µg/mL'dir. Bu değerlerin validasyonu gerçekleştirilen çalışma aralığına göre yüksek olması nedeniyle LOD ve LOQ değerleri deneysel olarak yeniden belirlenmiş ve sırasıyla  $1 \times 10^{-4}$  µg/mL ve 1 µg/mL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Seçicilik ile ilgili kromatogramlar

#### 4.2. Çözünürlük Çalışmaları

Yapılan çalışmalara göre Qu'nun saf su ortamındaki çözünürlük oranı  $0.3330 \pm 0.333 \mu\text{g/mL}$  (Ortalama  $\pm$  SH), 1:4 etanol : su ortamındaki çözünürlük oranı ise  $0.092 \pm 0.092 \mu\text{g/mL}$  olarak bulunmuştur. Her bir çalışma üçer defa tekrarlanmıştır.

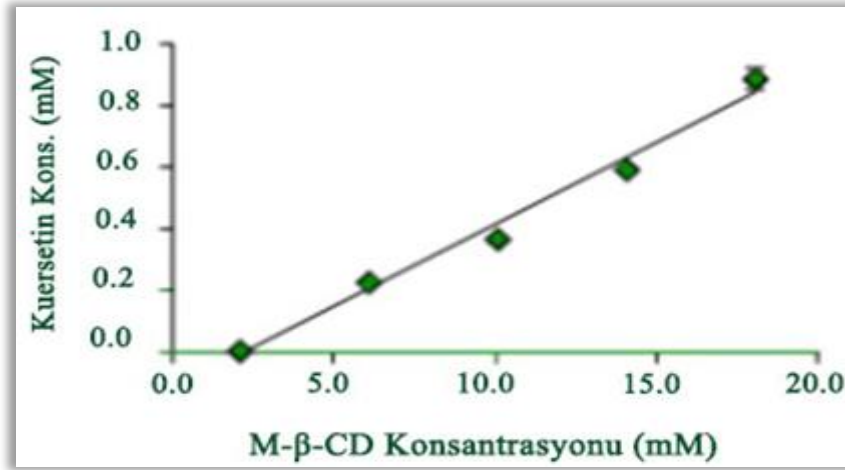
#### 4.3. Faz Çözünürlük Çalışmaları

Faz çözünürlük çalışmaları ile elde edilen faz çözünürlük diyagramı, çözelti içindeki CD konsantrasyonu ile çözünen Qu miktarı arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu doğrusal ilişki ile hesaplanan regresyon karesi;  $R^2 = 0.9929$  olarak bulunmuştur. Çözelti içindeki CD konsantrasyonuna karşılık çözünen Qu miktarlarının grafiğe geçirilmesi ile elde edilen diyagram Şekil 4.4.'te görülmektedir. Higuchi ve Connors'a göre çözünürlük diyagramının A<sub>L</sub> tipi olduğu bulunmuş, Qu ve M-β-CD'nin 1:1 molar oranlarda inklüzyon kompleksi oluşturabilecekleri tespit edilmiştir (Higuchi ve Connors, 1965).

Artan M-β-CD konsantrasyonuna bağlı olarak çizilen çözünürlük faz diyagramı ve Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanan stabilite sabiti ( $K_s$ )  $3078 \text{ M}^{-1}$  olarak bulunmuş ve moleküller arası güçlü bir bağlanma olduğu sonucuna varılmıştır.

$$K_s = \frac{Eğim}{S_0} x (1 - Eğim) \quad (4.1)$$





Şekil 4.4. Faz çözünürlük diyagramı (n=3)

Optimum stabilite sabitlerinin 100-1000  $M^{-1}$  aralığında olduğu bilinmektedir (Corciova ve ark., 2015). Bulunan stabilite sabiti, diğer Qu çalışmalarında, Sri ve ark. (Sri ve ark., 2007), Borghetti ve ark. (Borghetti ve ark., 2009), Carlotti ve ark.'nın (Carlotti ve ark., 2011) HP-β-CD için 272  $M^{-1}$ , β-CD için 230  $M^{-1}$  ve M-β-CD için 434  $M^{-1}$  olarak raporladıkları stabilite sabiti değerlerendaha yüksektir. Bununla birlikte Kim ve ark.'nın (Kim ve ark., 2009) Heptakis (2,6-di-O-methyl) β-CD (DM-β-CD) için bildirdikleri 7024  $M^{-1}$  değerinden ise önemli ölçüde küçüktür.

Çalışmadan elde edilen bulgular ile Qu'nun bağlanmasındaki artış ile çözünürlük artışının ortaya çıktığı sonucuna ulaşılmıştır. DM-β-CD ve M-β-CD molekül olarak, β-CD'den daha derin boşluklara sahiptir. Bu nedenle, bu şekilde modifiye edilmiş CD'lerin çözündürme verimliliği, β-CD'den daha yüksektir (Kim ve ark., 2009). Ayrıca, DM-β-CD'de (M.S.=2), M-β-CD'den (M.S.=057) daha fazla metil gruplarının varlığı nedeniyle DM-β-CD'de çözünürlük artışı sağlayan yer değiştirme derecesi M-β-CD'den daha büyüktür (Carlotti ve ark., 2011).

#### 4.4. İnküzyon Kompleksleri

Formülasyonlara ait verim değerleri elde edilen kuru komplekslerin kütlesi ile başlangıçta kullanılan Qu/M-β-CD'nin toplam kütleleri üzerinden hesaplanmış ve L1, L2, L3 ve L4 formülasyonları için sırasıyla % 74.79, 62.63, 63.61 ve 88.44 olarak bulunmuştur. Kompleksler üzerinde yapılan sudaki çözünürlük oranı tespitine yönelik analizler sonucunda Qu'nun 25  $^{\circ}C$ 'de sudaki çözünürlüğünün kompleksleşme ile arttığı gözlenmiştir. Komplekslerdeki yükleme etkinliği ise %52.53 ile %109.01 oranları

arasında değişmektedir. L4 formülasyonun % 88.44 verimi ve L1 formülasyonun  $83.97 \pm 0.88 \mu\text{g/mL}$  çözünürlüğü farklı çalışmalarda inklüzyon kompleks hazırlama yöntemlerinin sonuçlarını destekler niteliktedir (Corciova ve ark., 2015). Tablo 4.4.'te komplekslere ait yükleme etkinlikleri ve sudaki çözünürlük artışları görülmektedir.

**Tablo 4.6.** Saf Qu ile komplekslerdeki Qu'nun sudaki çözünürlüğü ve yükleme etkinliği

	<b>Qu'nun Sudaki Çözünürlüğü</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Yükleme Etkinliği</b> (%)
<b>Qu</b>	$0.33 \pm 0.33$	-
<b>L1</b>	$83.97 \pm 0.88$	$52.33 \pm 0.64$
<b>L2</b>	*	$96.22 \pm 0.83$
<b>L3</b>	*	$109.01 \pm 1.72$
<b>L4</b>	$7.89 \pm 1.97$	$90.99 \pm 5.07$

\* Tespit edilmemiştir, n=3, Ortalama  $\pm$  SH, SH=Standart Hata

#### 4.5. Zeta Potansiyel

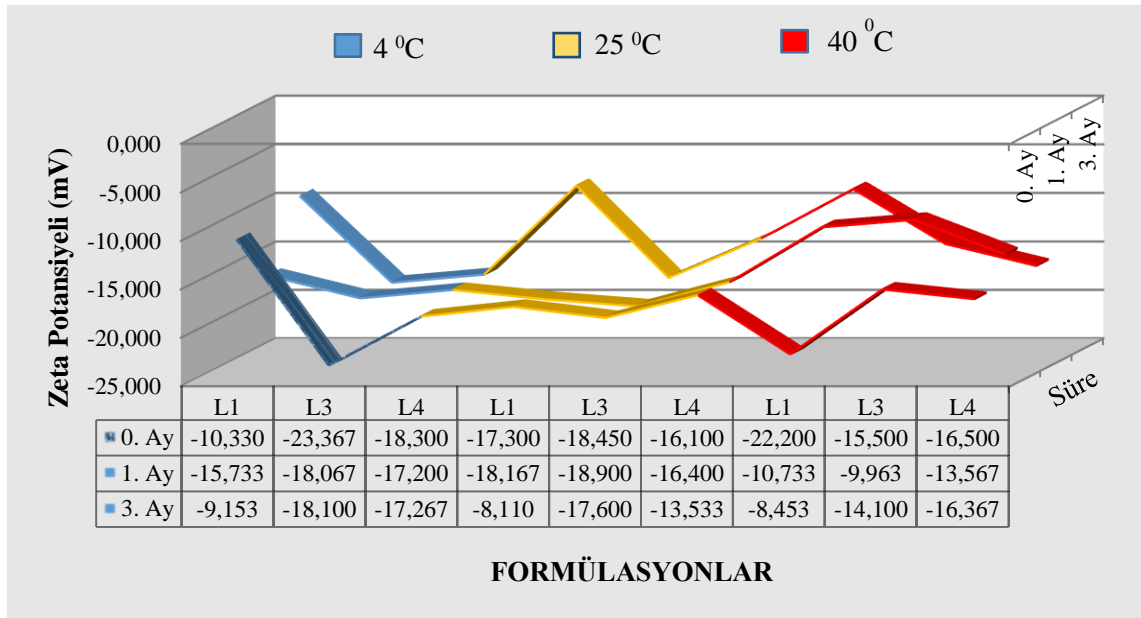
Zeta potansiyeli nanopartiküllerin yüzeyinin yük özelliğini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Zeta potansiyeli ayrıca nanopartikülün içinde veya yüzeyinde aktif maddenin enkapsüle olup olmadığı konusunda da fikir vermektedir. Literatürdeki çalışmalar,  $\pm 30$  mV aralığında bir zeta potansiyeline sahip nanopartiküllerin süspansiyon içinde kararlı olduğunu göstermiştir (Singh ve Lillard, 2009).

Zeta potansiyeli analizi sonucunda farklı saklama koşulları altında farklı yüzey yükleri olduğu tespit edilmiştir. Birinci ay itibariyle  $4^{\circ}\text{C}$ 'de saklama koşulunda L1, L3 ve L4 formülasyonlarının yüzey yükleri sırasıyla,  $-15.733 \pm 0.072$  mV,  $-18.067 \pm 0.354$  mV,  $-17.200 \pm 0.535$  mV olarak bulunmuştur. Üçüncü ay sonunda yine sırasıyla,  $-9.153 \pm 0.314$  mV,  $-18.100 \pm 0.141$  mV ve  $-17.267 \pm 0.098$  mV olarak ölçülmüştür.

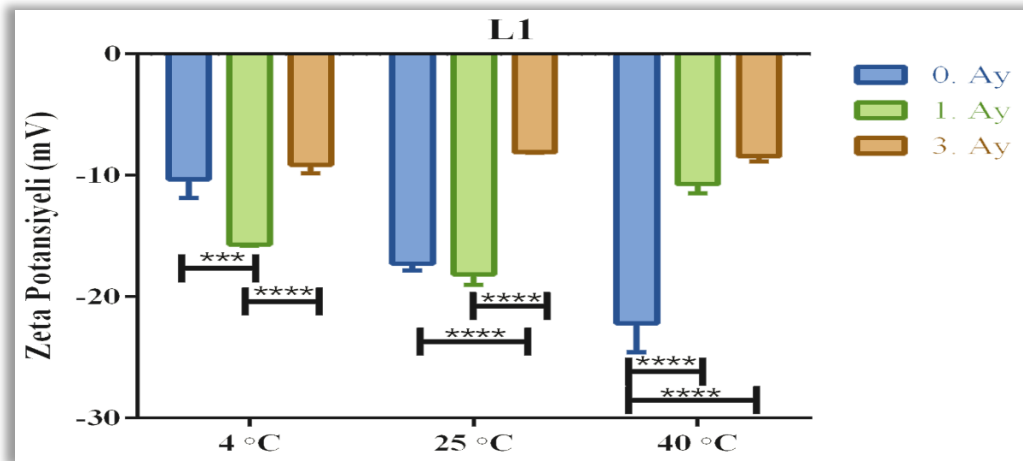
Oda koşulunda ( $25^{\circ}\text{C}$ ) saklanan formülasyonların birinci ay itibariyle yüzey yükleri sırasıyla,  $-18.167 \pm 0.401$  mV,  $-18.900 \pm 0.245$  mV ve  $-16.400 \pm 0.141$  mV olarak analiz edilmiştir. Üçüncü ay sonunda ise,  $-8.110 \pm 0.016$  mV,  $-17.600 \pm 0.170$  mV ve  $-13.533 \pm 0.178$  mV olarak bulunmuştur. Diğer saklama koşulu olan  $40^{\circ}\text{C}$ 'de,  $-10.733 \pm 0.357$  mV,  $-9.963 \pm 0.106$  mV,  $-13.567 \pm 0.196$  mV olarak analiz edilmiştir. Üçüncü ay sonunda,  $-8.453 \pm 0.181$  mV,  $-14.100 \pm 0.047$  mV ve  $-16.367 \pm 0.054$  mV ölçülmüştür. Yapılan literatür taramalarında da, Bose ve Michniak-Kohn tarafından

hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin stabilite süresince ciddi farklılık göstermediği gözlenmiştir (Bose ve Michniak-Kohn, 2013). Farklı saklama koşullarındaki formülasyonlara ait zeta potansiyel sonuçları Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.

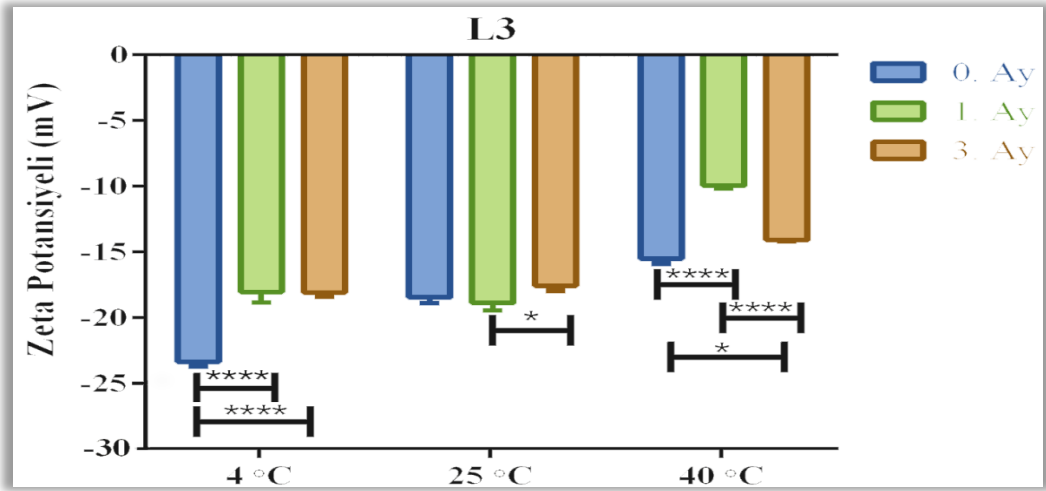
Elde edilen veriler sonucunda 4 °C ve 25 °C ortamında bekletilen L3 ve 4 °C ve 40 °C'de bekletilen L4 formülasyonların yüzey yüklerinde küçük miktarlarda değişim gözlenmiştir. Her bir formülasyona ait istatistiksel analizler Anova Two-Way yöntemiyle hesaplanmış ve birbirlerine göre anlamlılıkları yıldız (\*) ile Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



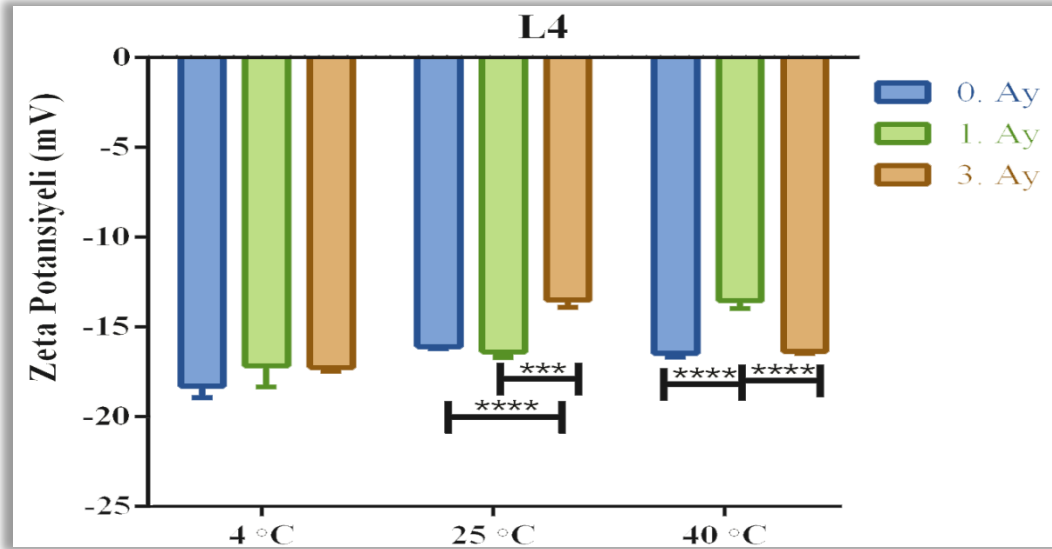
Şekil 4.5. Komplekslerin farklı koşullardaki zeta potansiyeli değerleri



Şekil 4.6. L1 formülasyonunun zeta potansiyeli verilerinin istatistiksel analizi



Şekil 4.7.L3 formülasyonunun zeta potansiyeli verilerinin istatistiksel analizi



Şekil 4.8.L4 formülasyonunun zeta potansiyeli verilerinin istatistiksel analizi

## 4.6. Fizikokimyasal Karakterizasyon

### 4.6.1. Parçacık büyüklüğü ve PDI (Polidisperslik indisi)

Hazırlanan Qu/M- $\beta$ -CD formülasyonlarının (L1, L3, L4) farklı saklama koşullarında (4 °C, 25 °C, 40 °C) parçacık büyüklüğü analiz edilmiştir. Formülasyonların ilk analizleri, birinci ve üçüncü ay sonunda farklı saklama koşulları altındaki ortalama parçacık büyüklüğü ve standart hataları Tablo 4.5., Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** 4 °C saklama koşulu altında L1, L3 ve L4 formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm)

	Sıfıncı Ay	Birinci Ay	Üçüncü Ay
<b>L1</b>	255.433 ± 20.645	351.100 ± 14.169	713.533 ± 3.576
<b>L3</b>	293.267 ± 36.074	296.900 ± 10.312	677.100 ± 2.205
<b>L4</b>	468.067 ± 45.277	496.867 ± 20.094	749.867 ± 5.972

n=3, Ortalama ± SH

**Tablo 4.8.** 25 °C saklama koşulu altında L1, L3 ve L4 formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm)

	Sıfıncı Ay	Birinci Ay	Üçüncü Ay
<b>L1</b>	286.067 ± 31.005	330.433 ± 9.004	486.033 ± 24.916
<b>L3</b>	293.267 ± 36.074	316.800 ± 1.666	715.233 ± 0.768
<b>L4</b>	293.267 ± 36.074	331.167 ± 11.949	477.367 ± 11.193

n=3, Ortalama ± SH

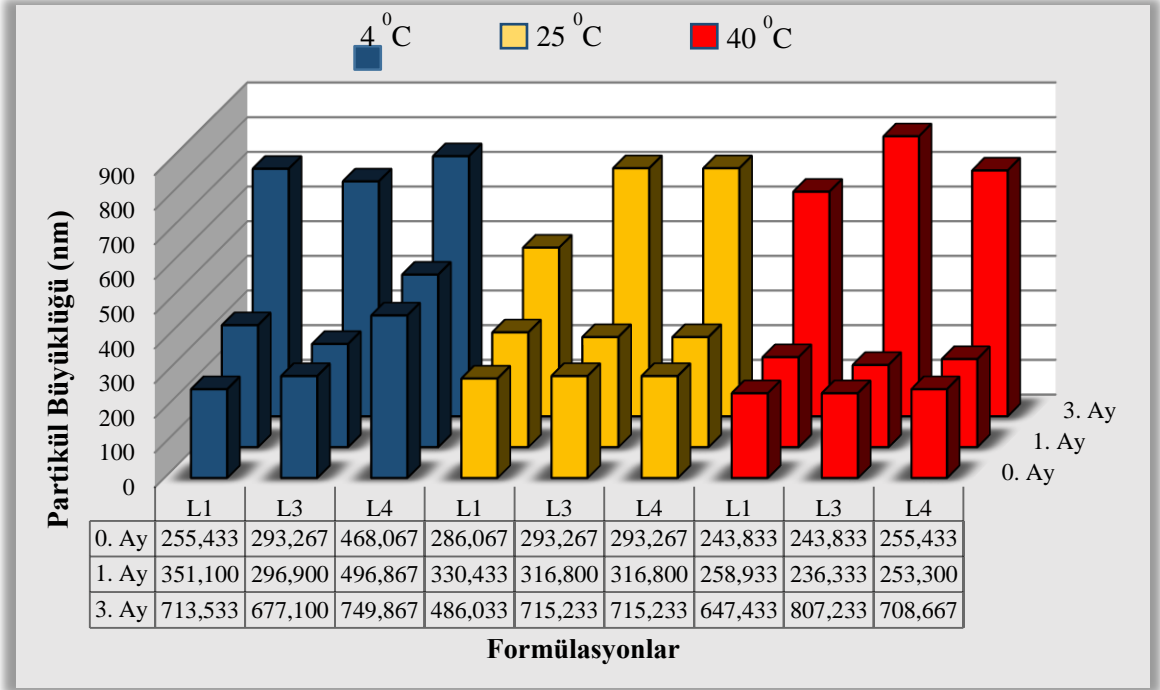
**Tablo 4.9.** 40 °C saklama koşulu altında L1, L3 ve L4 formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm)

	Sıfıncı Ay	Birinci Ay	Üçüncü Ay
<b>L1</b>	243.833 ± 9.829	258.933 ± 47.732	647.433 ± 5.233
<b>L3</b>	243.833 ± 9.829	236.333 ± 5.044	807.233 ± 3.305
<b>L4</b>	255.433 ± 20.645	253.300 ± 10.085	708.667 ± 2.232

n=3, Ortalama ± SH

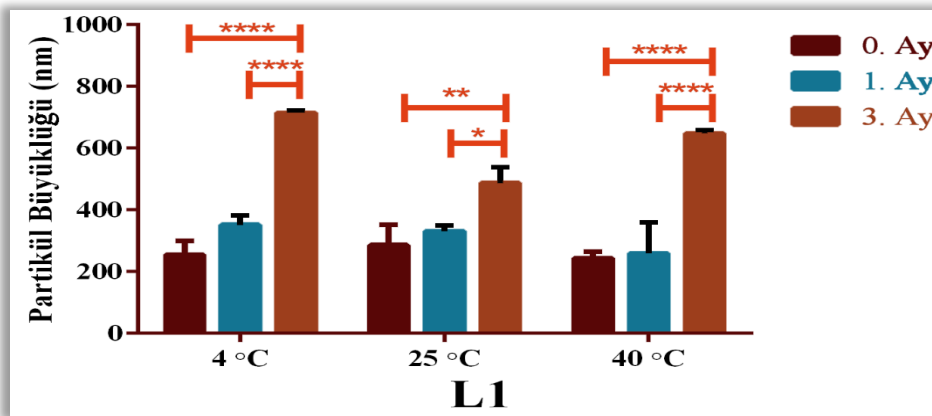
Elde edilen verilerden ilk analize göre 4 °C ve 25 °C saklama ortamlarında birinci ayda L1 ve L4 formülasyonlarının ortalama parçacık büyüklüğü değerleri yaklaşık olarak aynı kalmış değişim gözlenmemiştir. Buna karşın 40 °C’de her üç formülasyonun partikül büyüklüğü birinci ayda, başlangıçtaki değerler ile aynı kalmıştır.

İlk analiz sonuçları baz alındığında her üç ortamda da üçüncü ay sonunda ortalama parçacık büyüklüğünün ciddi oranda arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda L1, L3 ve L4 formülasyonlarının ortalama parçacık büyüklüğünü Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.

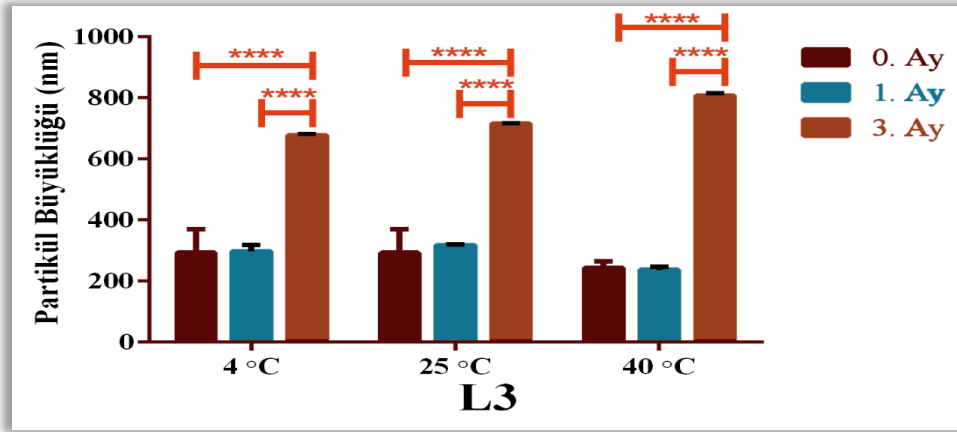


Şekil 4.9.L1, L3, L4 formülasyonlarının 4 °C, 25 °C ve 40 °C ortamlarındaki partikül büyüklüğü

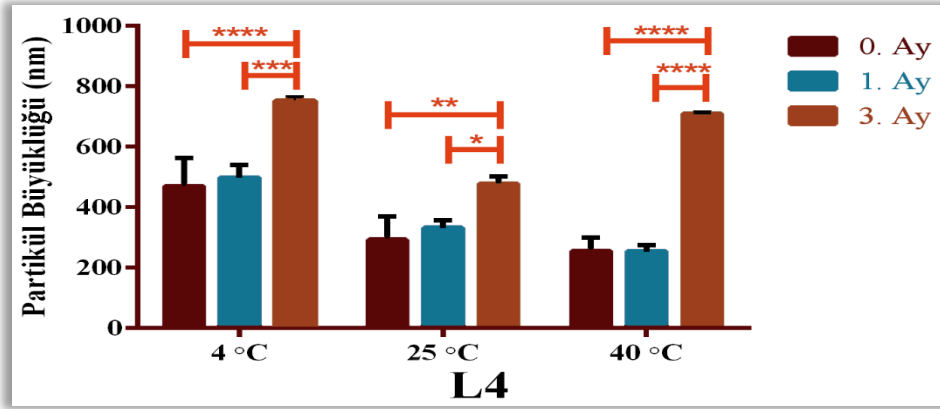
Her bir formülasyona ait 4 °C, 25 °C ve 40 °C ortamlarındaki partikül büyüklüğünün istatistiksel analizleri Anova Two-Way yöntemiyle hesaplanmış ve birbirlerine göre anlamlılıkları yıldız (\*) ile Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10.L1 formülasyonunun partikül büyüklüğü verilerinin istatistiksel analizi



Şekil 4.11.L3 formülasyonunun partikül büyüklüğü verilerinin istatistiksel analizi



Şekil 4.12.L4 formülasyonunun partikül büyüklüğü verilerinin istatistiksel analizi

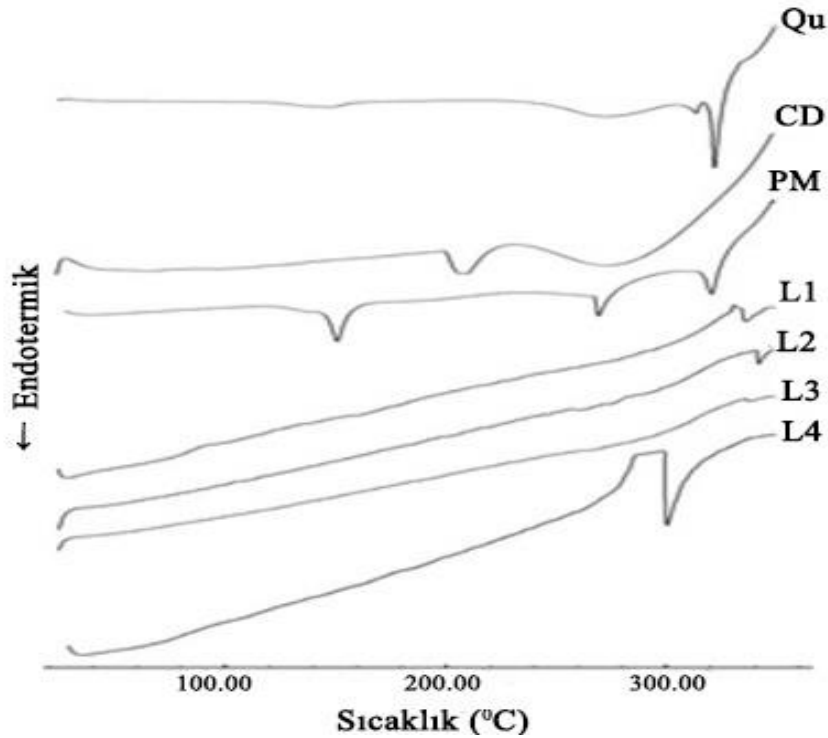
#### 4.6.2.DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetri)

Sıvı kristallerde, ilaç endüstrisinde, genel kimyasal analizlerde, polimerlerde ve gıda sektöründe kullanılan DSC ile kütle değişimi, dekompozisyon, termal kararlılık, oksidasyon, dönüşüm entalpisi, spesifik ısı (Cp), faz geçiş sıcaklıkları, camsı geçiş sıcaklıkları, kristalizasyon davranışları gibi analizler yapılabilmektedir (http-7).

DSC sadece karışım içindeki ilacın fiziksel durumu hakkında değil, polimerin yapısı hakkında da bilgi verir(Li ve ark., 2013). DSC analizi, elde edilen katı ürünün fiziksel karışım ya da gerçek inklüzyon kompleksleri olup olmadığını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.Saf bileşik, fiziksel karışım (Qu + M-β-CD = PM) ve Qu/M-β-CD inklüzyon kompleksleri DCS ile analiz edilerek termogram eğrileri elde edilmiştir. Qu, PM, ve Qu/M-β-CD inklüzyon komplekslerine ait termogramları Şekil 4.13.'de görülmektedir.

Qu'nun DSC analizinde daha önce rapor edilen, Qu'nun erime noktasına karşılık gelen keskin endotermik pik 322 °C'de saptanmıştır (AnandamveSelvamuthukumar, 2014). Diğer endotermik pikin ise su kaybı sonucu ayrışma süreciyle ilişkili olduğu söylenebilir (Borghetti ve ark., 2009; Scalia ve ark., 2013).

M-β-CD ise, 212 °C'de dar ve yaklaşık 275 °C'de geniş iki endotermik pik vermiştir. Qu'nun karakteristik erime noktasına karşılık gelen pik fiziksel karışımın termogramında da gözlemlenmiştir. L1 ve L2 formülasyonlarında saf Qu' ya göre erime entalpisi daha az olurken L4 formülasyonunda değişim olmamıştır. Modifiye liyofilizasyon metoduyla hazırlanan L1 ve L2 formülasyonlarının içerdiği Qu kristal dereceleri erime entalpisiyle orantılı olarak azalırken L3 formülasyonunda endotermik pik yok olmuştur. L3 formülasyonu inklüzyon kompleksi bileşenleri arasında etkileşimin olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir, aynı zamanda amorf formda ve/veya inklüzyon kompleksinin oluştuğunun bir kanıtı olarak gösterilebilir (PralhadveRajendrakumar, 2004).



Şekil 4.13. Qu, PM ve Qu/M-β-CD inklüzyon komplekslerinin DSC termogramları

Yapılan DSC çalışması sonucu elde edilen termogramların, Carlotti ve ark.'nın Qu/M-β-CD inklüzyon kompleksinin termogramından elde ettiği veriler ile örtüştüğü görülmektedir (Carlotti ve ark., 2011). Saf Qu ve M-β-CD termogramında gözlemlenen



karakteristik pikin liyofilizasyon yöntemi ile hazırlanan inklüzyon kompleks oluşması sonucunda kaybolduğu raporlanmıştır. Bununla birlikte evaporasyon yönteminde liyofilizasyon yönteminden farklı olarak, saf maddelerde gözlemlenen karakteristik pikin inklüzyon kompleks oluşturulmasının ardından daha düşük sıcaklıktaki bir noktada gözlemlenmesi iki yöntemin sonucunda oluşan inklüzyon komplekslerinin farklı olduğu sonucunu vermektedir. Kakran ve ark.'nın evaporasyon yöntemi ile hazırladıkları kompleksin, saf Qu ve M- $\beta$ -CD karakterist pikine göre daha düşük sıcaklıkta görülmesi raporlanan bu bulguyu desteklemektedir (Kakran ve ark., 2011).

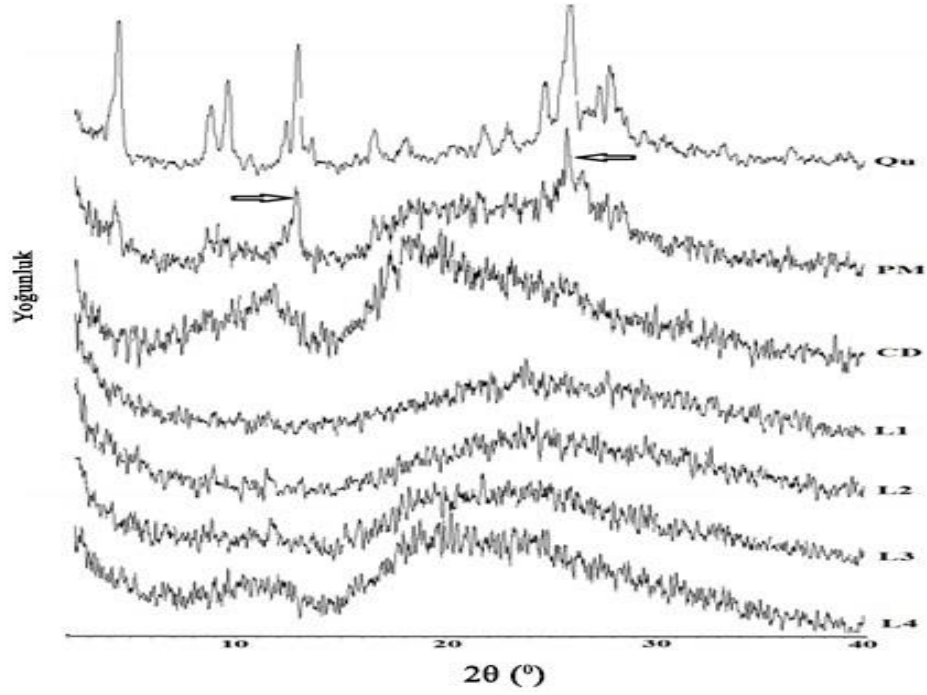
Kompleksin katı halde oluşturulduğu durumda DSC termogramı, fiziksel karışıma kıyasla farklı olmalıdır. Şekil 4.13.'de görülen termogramlar sayesinde CD boşluğunun Qu'yu içselleştirmesi sonucu Qu'nun erime pikinin kaybolduğu yorumu yapılabilir(Alvarez-Parrilla ve ark., 2005).

#### **4.6.3. XRD (X-ışını kırınımı)**

X-ışını difraktometresi CD kompleks oluşumunun saptanması için değerli bir yöntemdir. Kristal veya amorf haldeki kristallerin kırınım desenlerinin pik yükseklikleri, referans materyallerinin kırınım desenleri ile karşılaştırarak yorum yapılması mümkündür(Sri ve ark., 2007).

Şekil 4.14.'de gösterildiği üzere örneklerin difraktogramları XRD yardımıyla yapılmıştır. Qu'nun 2 teta ( $2\theta$ ) kırınım açısında daha önce yapılan çalışmalarda da bildirildiği gibi,  $4.46^{\circ}$ ,  $10.72^{\circ}$ ,  $12.01^{\circ}$ ,  $12.94^{\circ}$ ,  $13.64^{\circ}$ ,  $16.60^{\circ}$ ,  $24.700^{\circ}$ ,  $25.88^{\circ}$ ,  $28.00^{\circ}$  dereceli karakterist kristal pikleri ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Kakran ve ark., 2011; Wu ve ark., 2008).

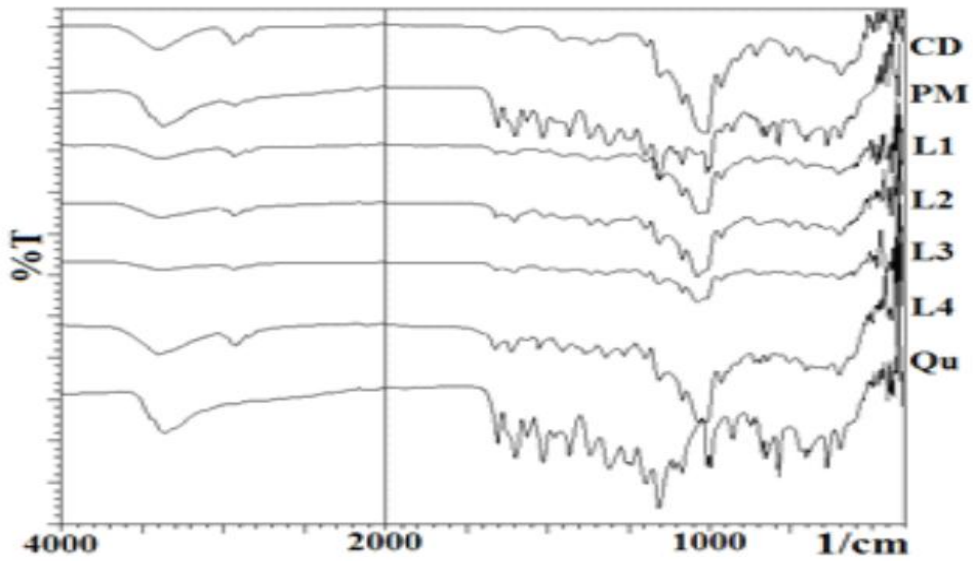
M- $\beta$ -CD difraktogramı maddenin amorf durumda olduğunu göstermiştir (Duarte ve ark., 2015). Fiziksel karışımda ise, Qu karakterist tepe noktalarının CD'nin amorf karakterinin bir sonucu olarak azaldığı görülmekle birlikte maddenin kristal yapısının hala mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu, difraktogramda oklarla gösterilmiştir. Buna karşılık, liyofilizasyon ve evaporasyon ile hazırlanmış komplekslerde karakterist kırınım desenlerinin pikleri kaybolmuştur. Bu durum, partiküllerin amorf veya monomoleküler yapıda olduğu sonucunu gösterir. Benzer sonuç daha önce yapılan çalışmalarda da görülmektedir (PralhadveRajendrakumar, 2004; Wu ve ark., 2008). Bu sonuçlar DSC analizi sonuçlarıyla da desteklenmektedir.



Şekil 4.14. *Qu*, *PM* ve *Qu/M-β-CD* inklüzyon komplekslerinin X-ışını difraktometreleri

#### 4.6.4. FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi)

Kompleks oluşumu FT-IR spektrumları analizinde de aktif molekül olan *Qu*'nun karakteristik piklerinin inklüzyon komplekslerinde görülmemesi ve hem saf *M-β-CD* hem de *Qu*' da daha önce görülmeyen orijinal piklerin ortaya çıkmasıyla teyit edilmiştir (Çelik ve ark., 2007). Aşağıdaki Şekil 4.15.'de *Qu*, *M-β-CD*, fiziksel karışım ve inklüzyon komplekslerinin FT-IR spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.15. *Qu*, *PM* ve *Qu/M-β-CD* inklüzyon komplekslerinin FT-IR spektrumları

Qu kristallerinin 3369  $\text{cm}^{-1}$ 'de serbest -OH bant, 1651  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O grup bandının aromatik ketonik karbonil gerilme, 1512  $\text{cm}^{-1}$ 'de aromatik grup, 1307  $\text{cm}^{-1}$ 'de ve 1155  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O-C ve son olarak 997  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H aromatik grup bandının eğilme titreşimi gözlenmiştir(Kakran ve ark., 2011).

Saf M- $\beta$ -CD'de, 3394  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-H gerilme, 2927  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H gerilme, 1082 ve 1008  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H ve C-O gerilme titreşimleri görülmektedir(Chao ve ark., 2014).Fiziksel karışımda sadece Qu ve M- $\beta$ -CD'nin toplam spektrumu görülmektedir. Bu veri Qu ve M- $\beta$ -CD'nin etkileşimde olmayıp sadece fiziksel karışım olduğunu göstermektedir.

L1, L2 ve L3'ün FT-IR spektrumlarında 1008  $\text{cm}^{-1}$ 'de, 2927  $\text{cm}^{-1}$ 'de ve 3394  $\text{cm}^{-1}$  M- $\beta$ -CD'nin karakteristik bantları gözlenmiştir. Daha önce 1651  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenenQu 'ya ait C=O grup bandının aromatik ketonik karbonil gerilme titreşimlerinin kompleks haline geldikten sonra L2 ve L3 formülasyonları için yoğunluğu azalarak sırası ile 1657  $\text{cm}^{-1}$  ve 1659  $\text{cm}^{-1}$ 'ye kaydığı belirlenmiştir. Buna ek olarak Qu'nun spektrumunda gözlenen O-H gerilmesi, C-O-C ve C-H titreşimlerinin tamamı ile kayb olduğu görülmüştür. Ancak L2 ve L3 formülasyonlarında 1037  $\text{cm}^{-1}$ 'de daha önce görülmeyen bir pik ortaya çıkmıştır.

Bu sonuçlar, liyofilizasyon ile kompleks oluşurkenmoleküller arası hidrojen bağının ortaya çıktığı ve etkin madde olan Qu'nun M- $\beta$ -CD'nin boşluğuna girerek kompleks oluşturduğu şeklinde yorumlanabilir.

#### **4.6.5. $^1\text{H}$ -NMR (Proton nükleer manyetik rezonans)**

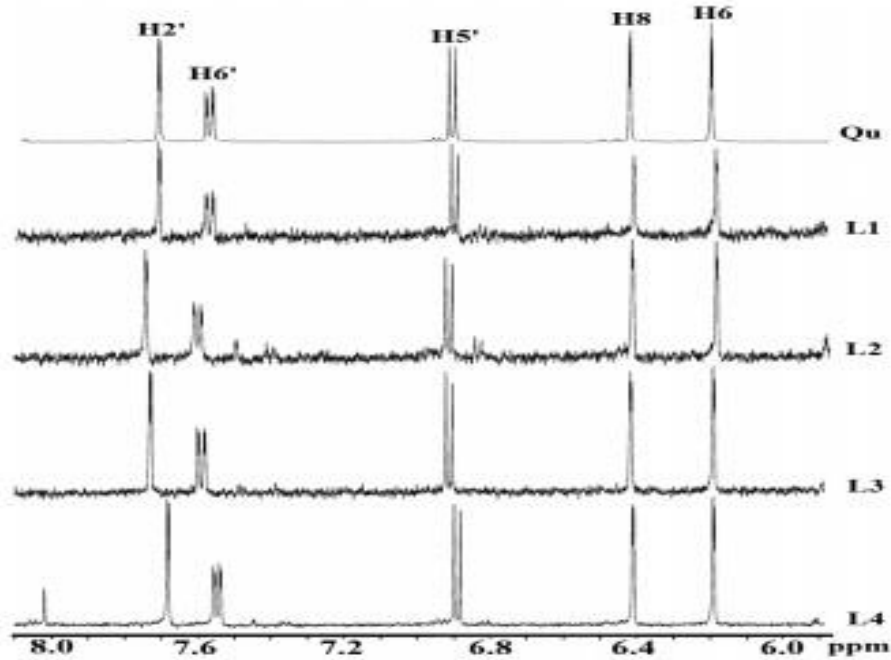
$^1\text{H}$ -NMR çalışmaları inklüzyon ile diğer etkileşimli prosesleri ayırt etmemize olanak sağlamaktadır. CD ile kompleks oluşturan serbest misafir molekülün kimyasal kaymalarınıkarşılaştırılması sayesinde çözelti içerisindeki CD'nin hidrofobik boşluğundaki misafir molekülün tespit edilmesinde NMR analizleri oldukça güçlü bir yöntemdir(Folch-Cano ve ark., 2013; Liu ve ark., 2013; Tsao ve ark., 2011). Bu nedenle karbon NMR spektroskopisinden daha hassas olan proton NMR spektroskopisi CD'leri içeren inklüzyon kompleksleri karakterize etmede daha çok kullanılmaktadır(Zheng ve ark., 2005). Misafir molekül ve iç yüzeydeki hidrojenler ile inklüzyon kompleks mevcut ise; elde edilen bulgulardan fiziksel veya kimyasal ortamın etkilendiği söylenebilmektedir(Tsao ve ark., 2011).

Şekil 4.16.'da Qu'nun inklüzyon kompleks öncesi ve sonrası <sup>1</sup>H-NMR spektroskopisi görülmektedir. Literatürdeki çalışmalara göre Qu'nun aromatik grubunun proton rezonansının 6 ile 8 ppm aralığında olduğu bildirilmiştir (Wu ve ark., 2008). Qu ve Qu kompleksleri karşılaştırılmış ve L1 ve L2 kompleksi için Qu molekülünün A-halkasının hidrojen sinyalinde sırasıyla [H-6 (δ6.20), H-8 (6.41)], [H-8 (δ6.41)] azalma olduğu görülmüştür.

Buna ek olarak CD varlığında dahi Qu'nun spektral profilinde L1, L3 ve L4 için Qu'nun A-halkasındaki protonların (H-8, H-6) pik kaymalarında herhangi bir değişiklik olmamıştır. H-6 ve H-8 ile karşılaştırıldığında Qu'nun H-2', H-5' ve H-6' kompleksleşme ile uyarılmış kimyasal pik kaymaları daha küçüktür. Bu durum protonu taşıyan Qu parçasının M-β-CD'nin boşluğuna dahil edilmediğini düşündürmektedir (Zheng ve ark., 2005).

Tablo 4.8. Qu'nun <sup>1</sup>H kimyasal kaymalarındaki (Δδ) değişikliklerin detaylarını göstermektedir. Veriler Eşitlik 4-2 kullanılarak hesaplanmıştır (Liu ve ark., 2013).

$$\Delta\delta = \delta(\text{Kompleks}) - \delta(\text{Misafir}) \quad (4.2)$$

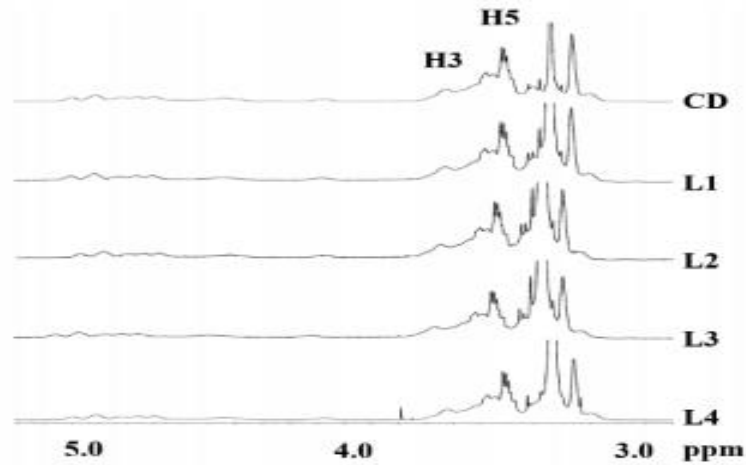


Şekil 4.16. Qu ve Qu/M-β-CD inklüzyon komplekslerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları

**Tablo 4.10.** *Qu'nun aromatik protonlarının kimyasal kaymaları*

Pozisyon	L1	L2	L3	L4
H6	0.0036	0.0029	0.0037	0.0042
H8	0.0036	0.0010	0.0040	0.0038
H5'	0.0021	0.0015	0.0016	0.0016
H6'	0.0014	0.0007	0.0014	0.0007
H2'	0.0025	0.0016	0.0022	0.0022

Qu'nun aromatik protonlarının kimyasal kaymalarından elde edilen veriler, Qu molekülünün M- $\beta$ -CD'nin boşluğunda olduğunu ve bunun sonucu olarak da Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksinin oluştuğu sonucunu göstermektedir. Kompleks molekülün oluşması sürecinin hızlı bir proses olması nedeniyle misafir molekül serbest formdan kompleks forma geçmesi sırasında yeni bir pik meydana gelmemiştir (Zheng ve ark., 2005). M- $\beta$ -CD'nin kompleks oluşturmadan önce ve sonraki  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopisi ise aşağıdaki Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.17.** *CD ve Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları*

CD komplekslerinde aromatik moleküllerin varlığında CD boşluğundaki H-3 ve H-5 protonlarında kimyasal kaymalar gözlenmektedir. Protonlardan özellikle H-5 protonunda yukarı yöndeki kimyasal kaymalardaki yüksek değişimler inklüzyon kompleksini kanıtlar niteliktedir (Dupuy ve ark., 2005). Tablo 4.9., M- $\beta$ -CD'nin tüm kimyasal kaymalarını ( $\Delta\delta$ ) özetlemektedir. Veriler Eşitlik 4.3 ile hesaplanmıştır (Pessine ve ark., 2012).

$$\Delta\delta = \delta(\text{Kompleks}) - \delta(\text{Serbest}) \quad (4.3)$$

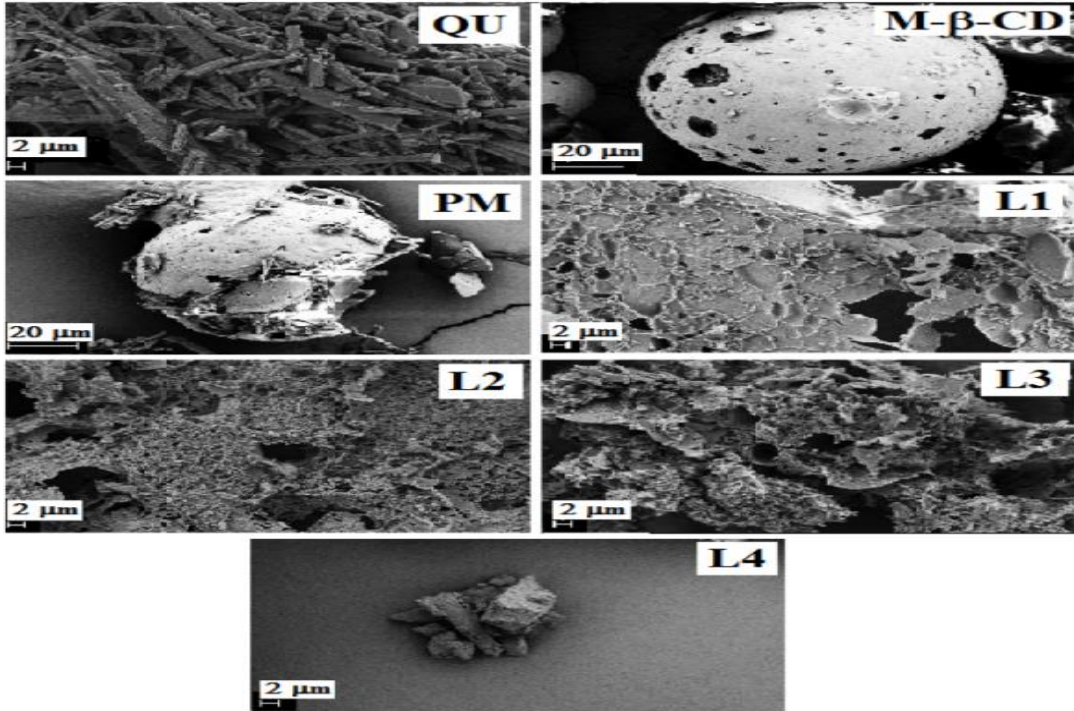
**Tablo 4.11.** *M-β-CD'nin inklüzyon kompleks sonrası H3 ve H5 protonlarının kimyasal kaymaları*

POZİSYON	L1	L2	L3	L4
H3	-0.0021	-0.0022	0.0010	-0.0003
H5	0.0003	0.0004	0.0099	0.0000

L3 kompleksinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumlarında M-β-CD'nin iç boşluk protonu H-5'in (0.0099 ppm), ve H-3'ün (0.0010 ppm) aşağı yönde kayması inklüzyon kompleksinin bir göstergesidir.  $\Delta\delta_{H3} > \Delta\delta_{H5}$  olduğu zaman boşluğun içinde kısmi inklüzyon kompleks,  $\Delta\delta_{H3} \leq \Delta\delta_{H5}$  olduğu zaman tam inklüzyon kompleks olduğu sonucuna varılmıştır (Pessine ve ark., 2012). Bu nedenle L1, L2, L4'ün kısmi kompleks, L3'ün tam inklüzyon kompleks olduğu bulunmuştur.

#### 4.6.6. FESEM (Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu)

Örneklerin FESEM ile elde edilen fotomikrografları Şekil 4.18.'de gösterilmiştir. Qu morfolojik yapısı iğne benzeri kristal agregatlar şeklinde görünürken, M-β-CD küçük küresel parçacıkları gibi görünmektedir.



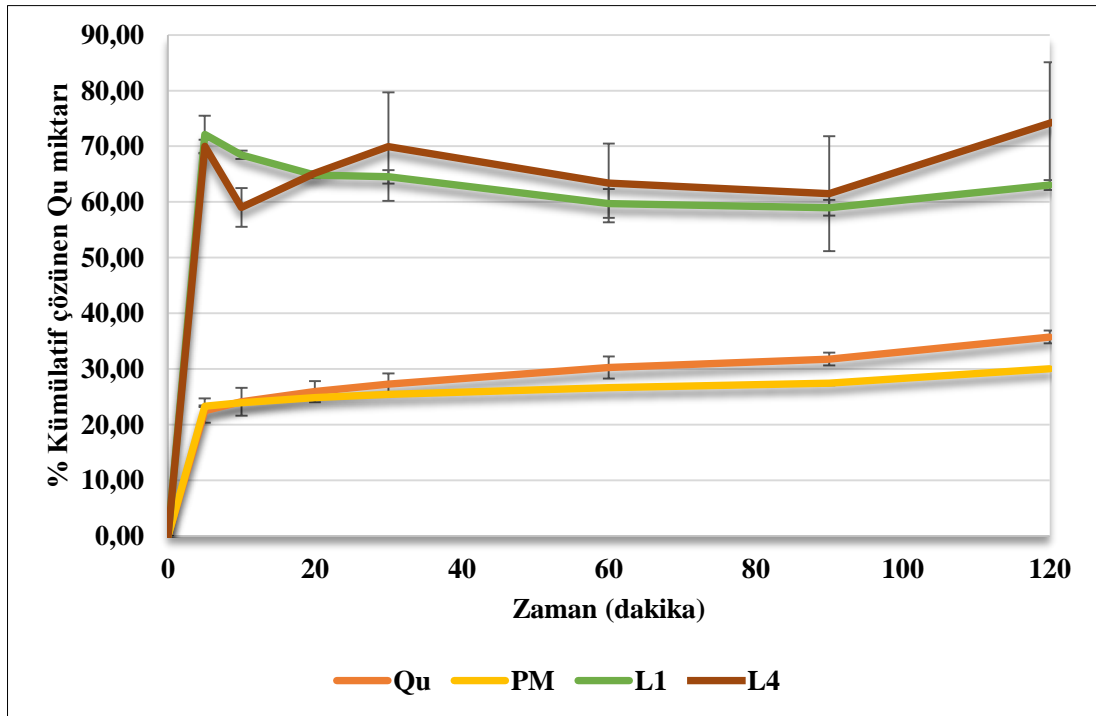
**Şekil 4.18.** *Qu, PM ve Qu/M-β-CD inklüzyon komplekslerinin FESEM görüntüleri*

Fiziksel karışıma ait fotomikrografda Qu kristallerinin M- $\beta$ -CD'nin yüzeyini tümüyle kapatmasına karşın, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinde düzensiz partiküller olarak görülmektedir. Komplekslerde hem Qu'nun hem de M- $\beta$ -CD'nin orijinal morfolojisi kaybolmuş, boyut ve şekillerinde değişiklikler oluşmuştur. Bu sonuçlar Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksinin oluştuğunun kanıtı olarak gösterilebilir.

#### 4.7. *In Vitro* Salım Çalışmaları

CD ile kompleks oluşturulması ilacın kristallik derecesini azaltarak, ilaç çözünürlüğü ve çözünme hızına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Vyas ve ark., 2008).

Şekil 4-19'da saf Qu'nun, 1:1 molar oranda Qu/M- $\beta$ -CD fiziksel karışımının ve 1:1 molar oranda Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin asidik ortamda (pH=1.2) *in vitro* salım profili görülmektedir. Saf Qu ve Qu/M- $\beta$ -CD fiziksel karışımının 120 dakika boyunca sırasıyla %36 ve %30 oranı ile düşük çözünme gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın L1 ve L4 inklüzyon komplekslerinin 5 dakika içerisinde sırasıyla %72 ve %70 oranında çözüldüğü bulunmuştur. Saf Qu ve komplekslerin çözünme davranışlarının karşılaştırılması sonucunda Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon komplekslerinin çözünme oranlarının saf Qu'ya göre yaklaşık olarak üç kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.19. Qu, PM ve inklüzyon komplekslerinin pH 1.2 ortamındaki çözünme profilleri

Komplekslerden Qu'nun hızlı bir şekilde çözünmesi; CD'nin, boşluğunda yer alan etkin maddeyi daha hızlı ıslatarak çözünmesine neden olması ile açıklanabilir. Buna ek olarak, DSC ve XRD çalışmalarıyla da desteklenen ilacın amorf formda oluşunun, inklüzyon komplekslerindeki çözünmeye katkıda bulunduğu söylenebilir (Kakran ve ark., 2011; Yurtdaş ve ark., 2011).

#### **4.8. Çözünme Profillerinin Benzerliğinin Araştırılması**

Seçilen formülasyonlar (L1 ve L4), Qu ve PM'nin pH 1.2 ortamında çözünme profilleri analizi yapılmıştır. Fark faktörü ( $f_1$ ) her noktada iki eğri arasındaki yüzdesel farkı gösterir ve iki eğri arasında bağıl hatanın bir ölçüsüdür. Hata yüzdesi sıfır olduğunda test ilacı ve referans profillerinin aynı olduğunu göstermektedir. Benzerlik faktörü ( $f_2$ ) iki eğri arasında yüzde (%) çözünme benzerliğinin bir ölçüsüdür. İki formülasyon arasında benzerlikten bahsedebilmek için  $f_1$  değerinin 0'a yakın olması,  $f_2$  değerinin de 100'e yakın olması gerekmektedir. Genellikle  $f_1$ 'in 15'e kadar (0-15) ve  $f_2$ 'nin de 50'den büyük (50-100) olması yeterli görülmektedir (Ağabeyoğlu, 2007; Singireddy ve Subramanian, 2013). Pratikte ise,  $f_1$  değerinden ziyade  $f_2$  değeri kullanılmaktadır.

Çözünme hızı profillerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen benzerlik ( $f_2$ ) etkeni değerleri PM için 74.0450, L1 için 21.4724, L4 için 20.8075 olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda seçilen inklüzyon komplekslerinin çözünme hızı profillerinin saf Qu'nun çözünme profiline benzemediği ( $f_2 < 50$ ), buna karşın PM'nin beklendiği gibi saf Qu ile benzer çözünme profili olduğu ( $f_2 > 50$ ), gözlemlenmiştir.

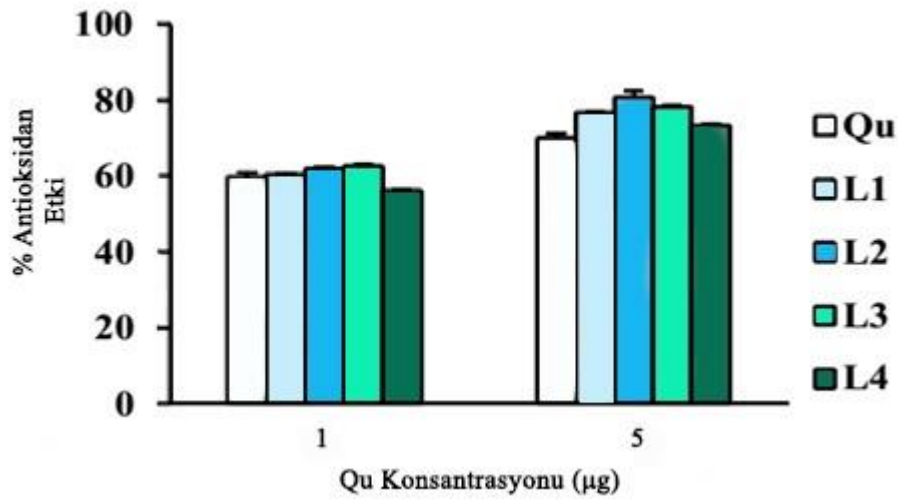
#### **4.9. Antioksidan Aktivite Testi**

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, hidroksillenme derecesine, konumuna ve doğal radikallerin halka yapısına bağlıdır (Chao ve ark., 2011). Qu'nun antioksidan etkisi, serbest radikalleri stabilize etmesinden ve oksitlenmeyi önleyici hidrojen verme yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Anandam ve Selvamuthukumar, 2014; Wu ve ark., 2008).

Qu ve Qu/M- $\beta$ -CD komplekslerinin antioksidan aktivite testine ait sonuçlar Şekil 4.20.'de gösterilmiştir. Grafikte de görüldüğü üzere artan Qu konsantrasyonuna bağlı olarak antioksidan etki artmaktadır. En yüksek antioksidan aktivite %62.65 ile 1  $\mu$ g Qu konsantrasyonunda L3 inklüzyon kompleksinde, %80.74 ile 5  $\mu$ g Qu konsantrasyonu ile L2 kompleksinde gözlemlenmiştir.



Bu antioksidan aktivitedeki artışın, Qu moleküllerindeki -OH pozisyonlarının, CD'nin ikincil -OH grubunun hidrojen bağlarına yeteri kadar yakın olması ile ilgili olduğu düşünülebilir. İnküzyon kompleksinde moleküller arası hidrojen bağı oluşumu mümkündür ve bunun sonucu olarak antioksidan kapasitede bir artış beklenmektedir (Chao ve ark., 2011). Bunun aksine Carlotti ve arkadaşları Qu'nun sulu ortamda 1:2 oranında M-β-CD ile kompleksinin hazırlanması sonucu anti radikal aktivitesinin az miktarda düştüğünü bildirmiştir (Carlotti ve ark., 2011).



Şekil 4.20. Qu ve Qu/M-β-CD inküzyon komplekslerinin antioksidan aktiviteleri

#### 4.10. Kararlılık Çalışmaları

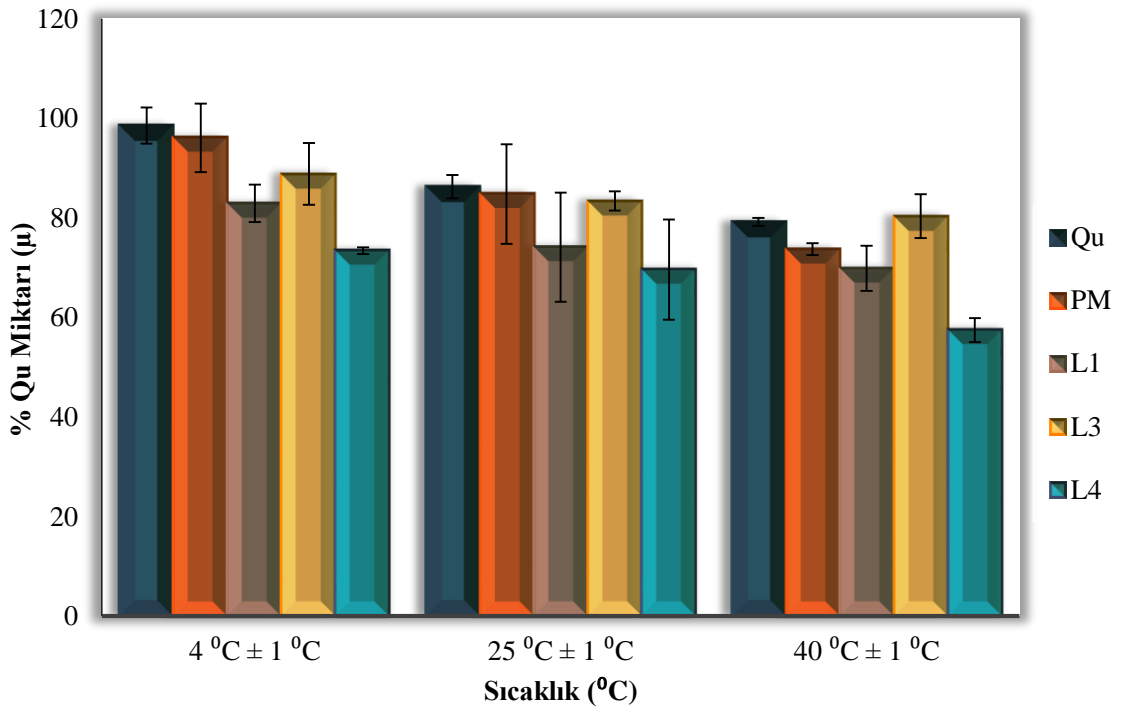
Üç ay boyunca ışıktan korunacak şekilde eppendorf tüpleri içerisinde ve üç farklı ortamda ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) bekletilen Qu, PM ve L1, L3 ve L4 formülasyonlarında bozunmadan kalan saf % Qu miktarlarının analizleri yapılmıştır. Başlangıç % Qu miktarı %100 kabul edilerek üç ay sonunda her bir ortamdaki % Qu miktarları Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

Üç ay sonundaki % Qu miktarlarındaki azalma nedeniyle, L4 formülasyonunun tüm ortamlarda en çok bozulan formülasyon olduğu görülmüştür. L3 ile  $4^{\circ}\text{C}$ 'de, başlangıç % Qu miktarına en yakın değer tespit edilmiş ve %12'lik bir azalma olmuştur. L3 formülasyonunun diğer ortamlardaki % Qu miktarlarının da yaklaşık olarak aynı kalması nedeniyle,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de,  $25^{\circ}\text{C}$ 'de ve  $40^{\circ}\text{C}$ 'de saklama ortamlarında kararlılığı en uygun formülasyon olarak görülmektedir. Şekil 4.21.' de saf Qu, PM ve L1, L3, L4 formülasyonlarının bozunmadan kalan % Qu analiz sonuçları görülmektedir.

**Tablo 4.12.**Farklı ortamlardaki Qu, PM, L1, L3, L4 için 3 ay sonunda bozunmadan kalan % Qu miktarları

	4 °C ± 1 °C	25 °C ± 1 °C	40 °C ± 1 °C
<b>Qu</b>	98,5737 ± 3,6560	86,3123 ± 2,3465	79,2135 ± 0,8185
<b>PM</b>	96,0927 ± 6,8880	84,8080 ± 9,9920	73,7227 ± 1,2000
<b>L1</b>	82,9253 ± 3,7720	74,1416 ± 10,9769	69,8609 ± 4,5354
<b>L3</b>	88,8438 ± 6,2178	83,4253 ± 1,9123	80,3642 ± 4,3871
<b>L4</b>	73,4121 ± 0,6658	69,6161 ± 10,0890	57,4654 ± 2,3959

n=3, Ortalama ± SH



**Şekil 4.21.**4 °C, 25 °C, 40 °C saklama ortamlarında saf Qu, PM ve L1, L3, L4'de bozunmadan kalan % Qu miktarları

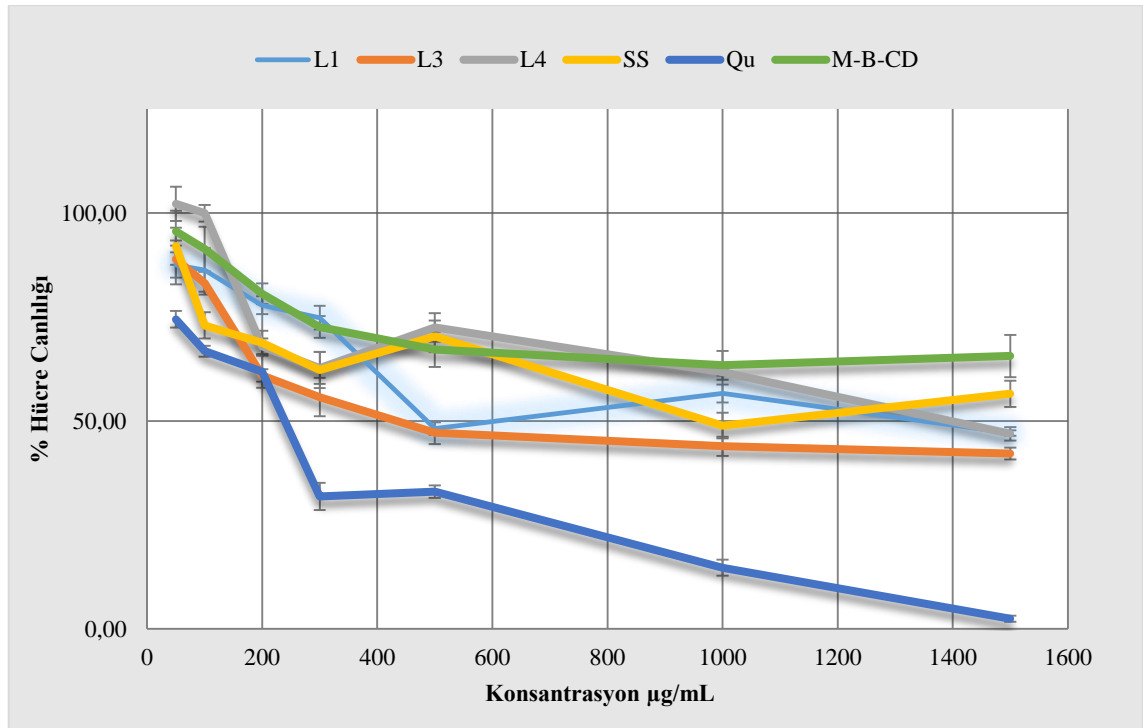
## 4.11. Hücre Kültürü Çalışmaları

### 4.11.1. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid (MTT)

Qu ile yapılan daha önceki çalışmalarda, çeşitli kanser hücre hatlarında Qu'nun hücre çoğalması ve apoptoz ile ilişkili sinyal transdüksiyon yollarını modüle ederek sitotoksik ve hücre çoğalmasını baskıladığı yönde etki gösterdiği bulunmuştur(Seufi ve

ark., 2009). Curcio ve ark'nın yaptığı çalışmalarda Qu'nun artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığının azalması Qu'nun sitotoksik etkisini ortaya koymuştur(Curcio ve ark., 2012). Çalışmamızda komplekslerin hücre canlılığına etkilerinin araştırılması için,50-1500 µg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda Qu içeren Qu ve Qu/M-β-CD inklüzyon kompleksleri ve Qu içermeyen plasebo formülü HeLa hücrelerine uygulandıktan sonra 24 saat ve 48 saat, SKOV-3 hücrelerine uygulandıktan sonra 24 saat inkübasyonutakiben etkileri incelenmiştir.

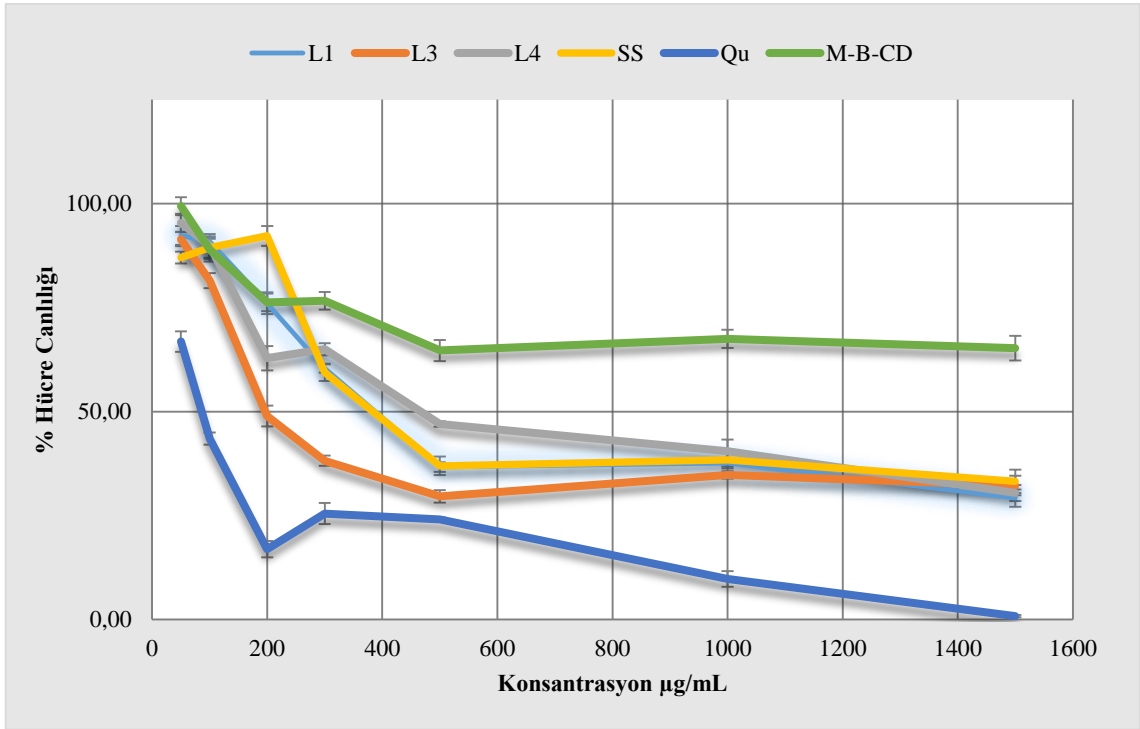
Elde edilen veriler sonucunda, 24 saatlik inkübasyon sonrası L1, L3, L4, SS için sırası ile IC<sub>50</sub> değerleri, 475, 400, 1400, 950 µg/mL bulunmuştur. Plasebo formülünün% hücre canlılığına etkisi sonucunda ise IC<sub>50</sub> değeri tespit edilememiştir. Aynı sürenin sonunda L1, L3, L4, SS için toksik olmayan konsantrasyon değerleri sırasıyla 170, 110, 160, 75 µg/mL bulunmuştur. Plasebo formülü için toksik olmayan konsantrasyon değeri 200 µg/mL olarak tespit edilmiştir. HeLa hücrelerinin 24 saatlik inkübasyona ait yüzde hücre canlılığı Şekil 4.22.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Qu, Qu/M-β-CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 24 saat sonrası HeLa hücresi ile % hücre canlılığı

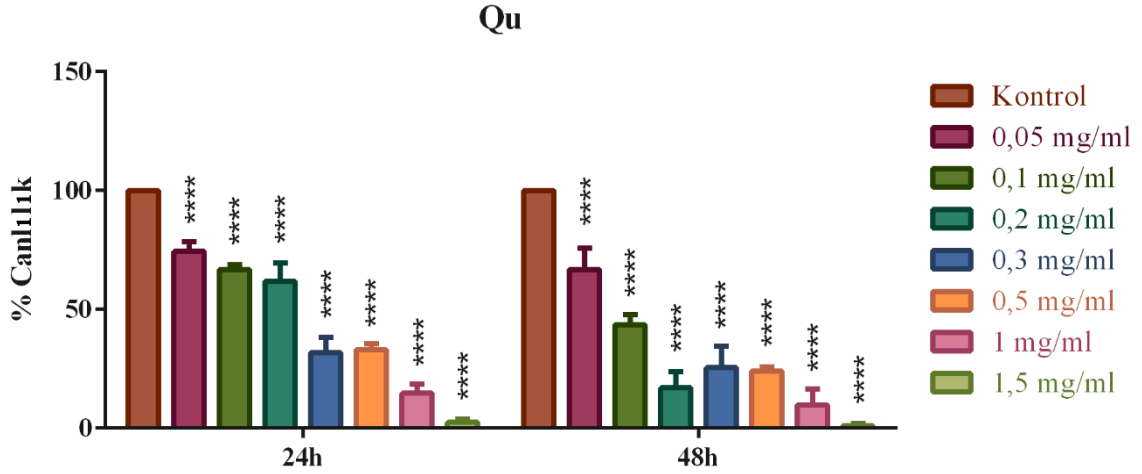
Aynı konsantrasyonlarla Qu ve Qu/M-β-CD inklüzyon komplekslerinin 48 saat inkübasyon sonrası etkileri incelendiğinde, L1, L3, L4, SS için elde edilen IC<sub>50</sub>

değerleri 24 saat inkübasyon sonrası sonuçlarına göre daha düşük konsantrasyonlarda saptanmıştır. Elde edilen verilere göre 48 saat sonrası IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 360, 195, 440, 350 µg/mL bulunmuştur. Zamana bağlı olarak formülasyonların sitotoksik etkilerinin arttığı görülmüştür. 24 saat inkübasyon ile benzer şekilde 48 saat için de plasebo formülün IC<sub>50</sub> değeri tespit edilememiştir. İnküzyon komplekslerinin toksik olmayan değerleri sırasıyla 125, 100, 130, 240 µg/mL, plasebo formülünün toksik olmayan değeri 160 µg/mL olarak bulunmuştur. 48 saatlik inkübasyona ait yüzde hücre canlılığı Şekil 4.23.'da gösterilmiştir.

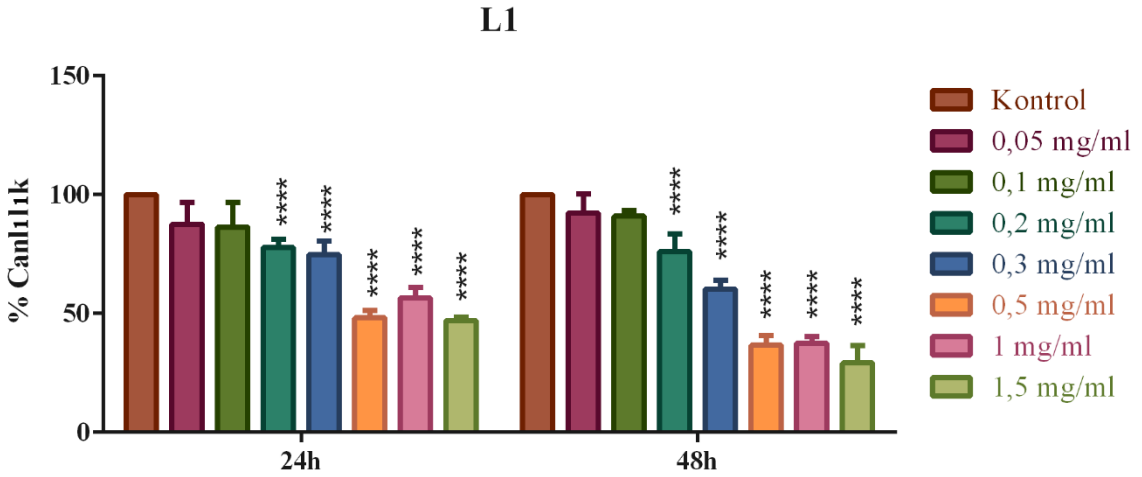


**Şekil 4.23.** Qu, Qu/M-β-CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı

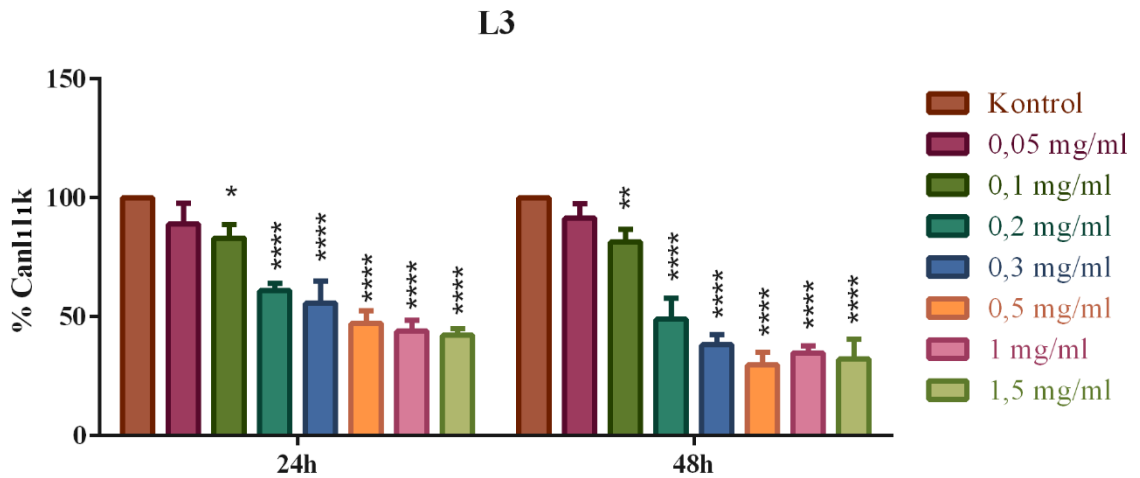
Her iki inkübasyon süresinde de kompleksler içerisinde L3 formülünün en düşük IC<sub>50</sub> değerlerine sahip olması nedeniyle, en etkili kompleks olduğu düşünülmüştür. Elde edilen veriler sonucunda 24 saat ve 48 saat sonunda saf Qu ve Plasebo, L1, L3, L4 ve SS formüllerine ait konsantrasyonlarına bağlı % hücre canlılığının istatistiksel analizleri Anova Two-Way yöntemiyle hesaplanmış ve birbirlerine göre anlamlılıkları yıldız (\*) ile gösterilmiştir.



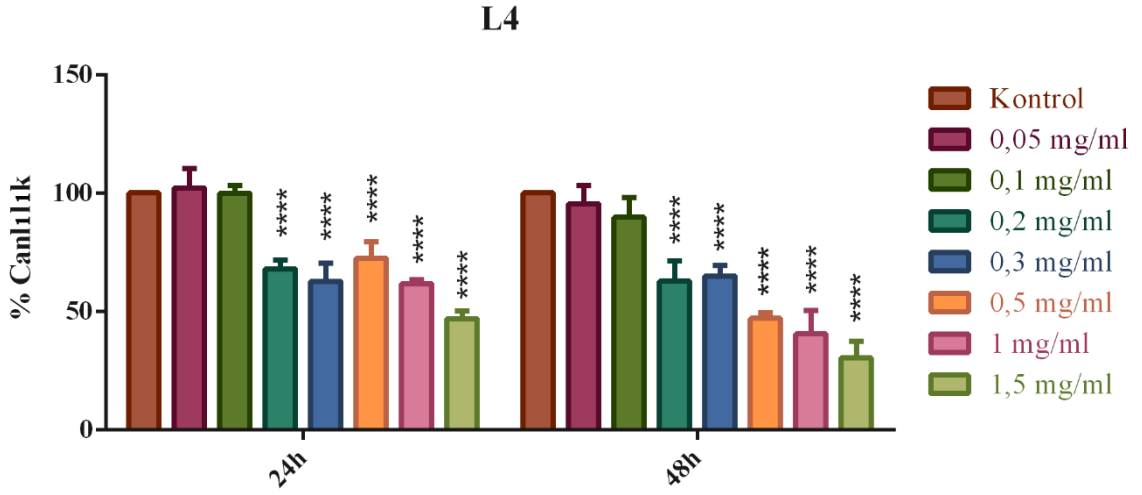
Şekil 4.24.Saf Qu'nun 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi



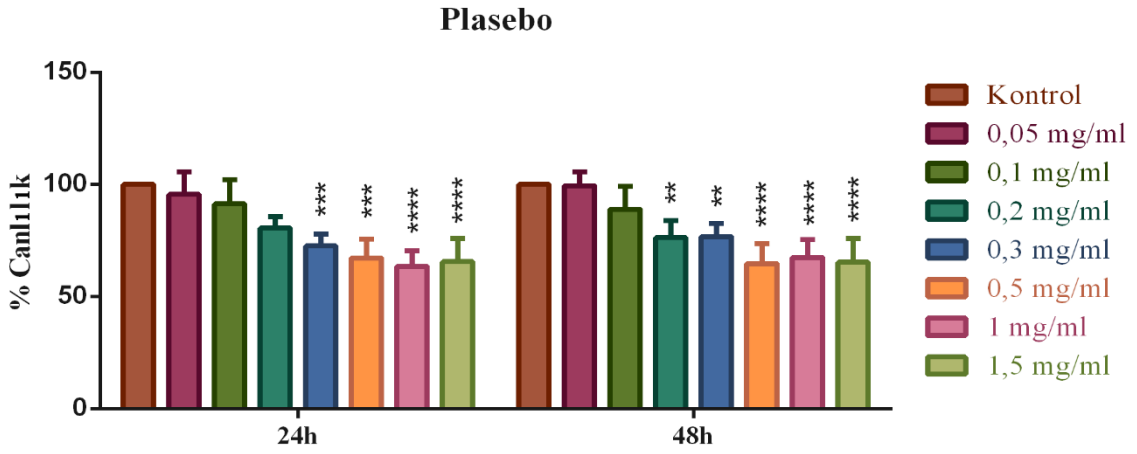
Şekil 4.25.L1 formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi



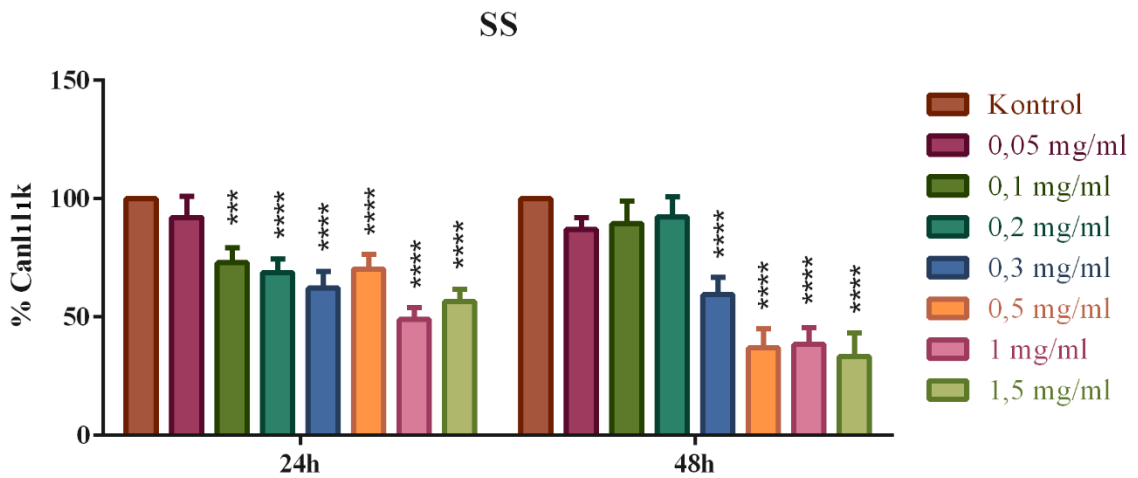
Şekil 4.26.L3 formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi



Şekil 4.27.L4 formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi



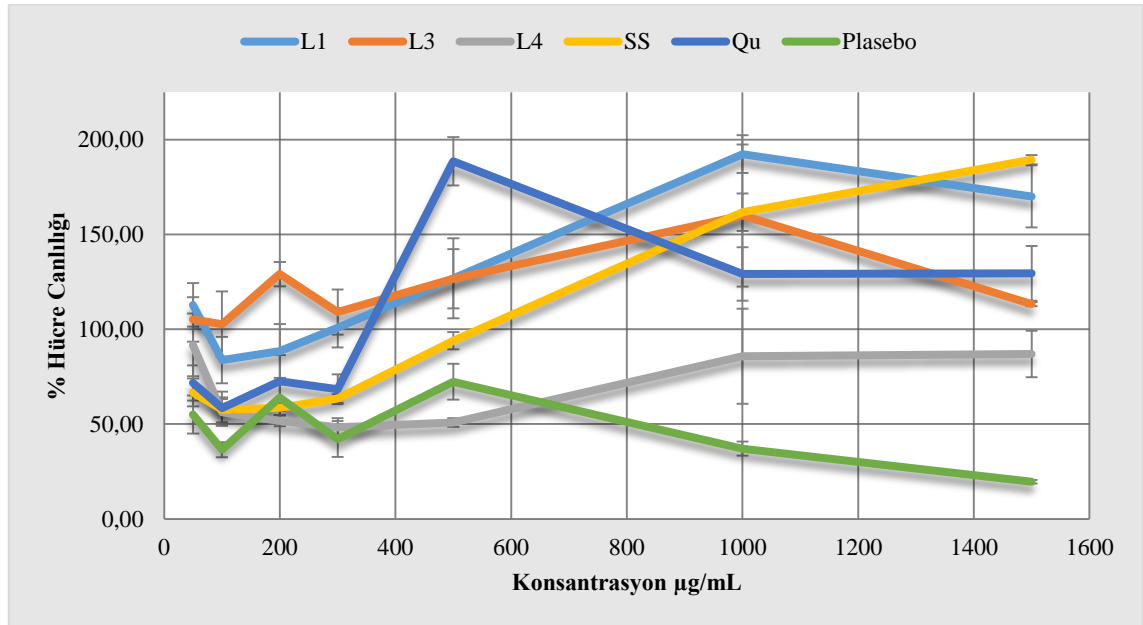
Şekil 4.28.Plasebo formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi



Şekil 4.29.SS formülünün 24 ve 48 saat sonrası HeLa hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi

Epitelyal over kanseri, dünya genelinde en ölümcül jinekolojik kanserlerden biridir. Erken dönem cerrahi ve kemoterapi tedavilerine rağmen, hastalar için 5 yıllık sağkalım oranı %13 olduğu tespit edilmiştir (Mohammadi Ghalaei ve ark., 2014). Qu ile muamele edilen SKOV-3 hücrelerinin proliferasyonunun, inkübasyon süresine ve madde konsantrasyonuna bağlı bir şekilde inhibe olduğu gösterilmiştir (Ren ve ark., 2015). SKOV-3 hücreleri ile yapılan çalışmalarda, Qu, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri ve Qu içermeyen plasebo formülün (M- $\beta$ -CD) hücre canlılığına etkisinin araştırılması için 50-1500  $\mu$ g/mL aralığında değişen konsantrasyonlardaki formülasyonlar, SKOV-3 hücreleri ile muamele edilerek 24 saat inkübasyon sonrası etkilerine bakılmıştır.

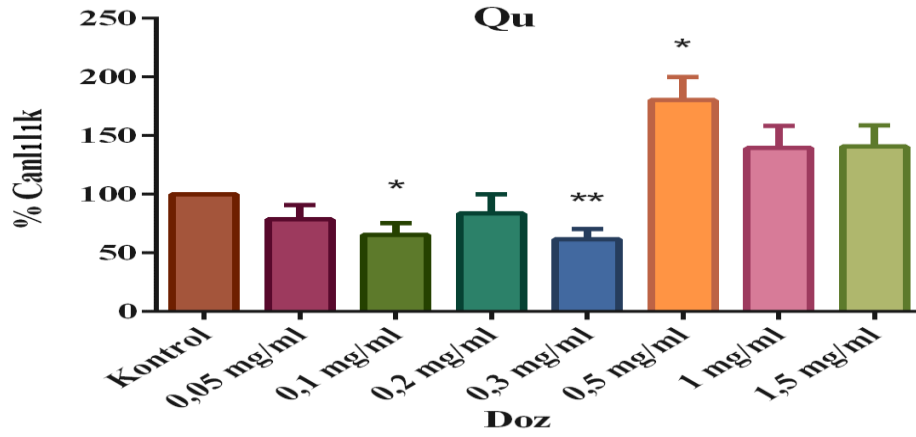
Elde edilen veriler sonucu 24 saatlik inkübasyon sonrası L1, L3, SS için sırası ile IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilememiş olup, L4 için IC<sub>50</sub> değeri ise 235  $\mu$ g/mL bulunmuştur. Bu süre sonunda yine L4 için toksik olmayan konsantrasyon değerleri 75  $\mu$ g/mL bulunmuştur. 24 saatlik inkübasyona ait yüzde hücre canlılığı Şekil 4.30.'da gösterilmiştir.



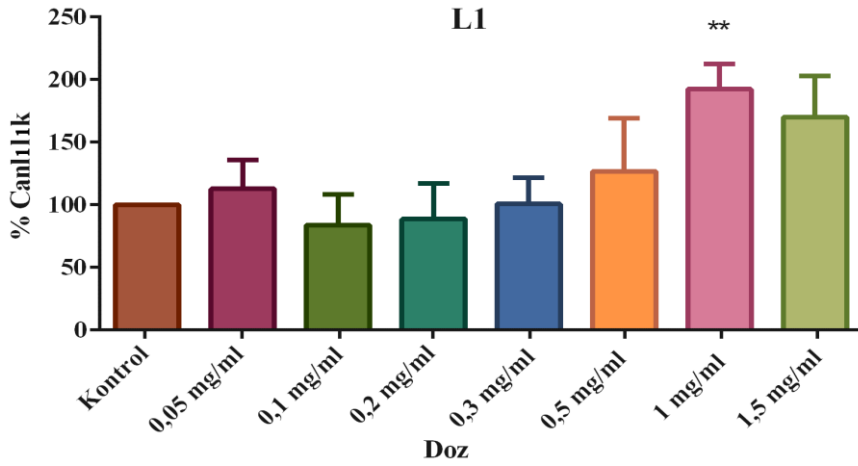
Şekil 4.30. Qu, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı

SKOV-3 hücre hattı üzerinde yapılan MTT çalışmasının 24 saat sonunda, saf Qu ve Plasebo, L1, L3, L4 ve SS formüllerine ait konsantrasyonlarına bağlı % hücre

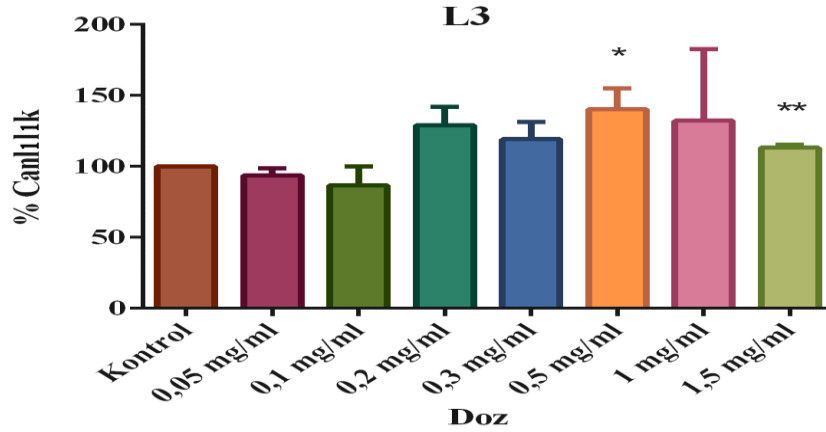
canlılığının istatistiksel analizleri Anova Two-Way yöntemiyle hesaplanmış ve birbirlerine göre anlamlılıkları yıldız (\*) ile gösterilmiştir.



Şekil 4.31.Saf Qu'nun 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi

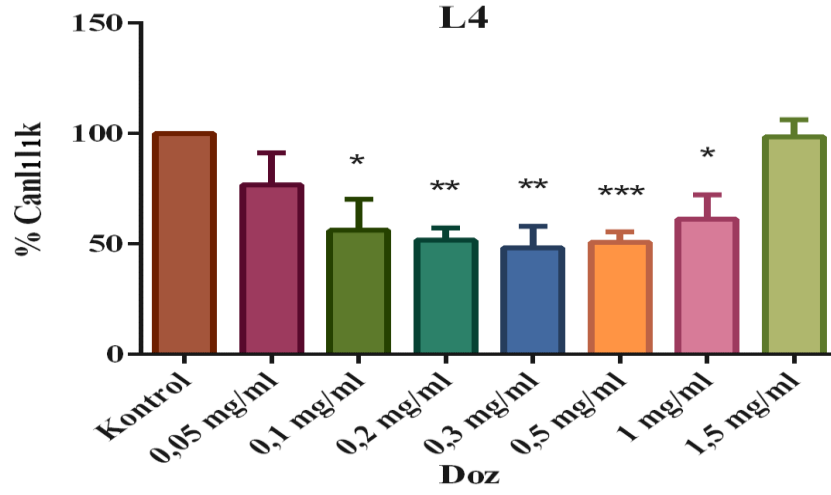


Şekil 4.32.L1 formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi

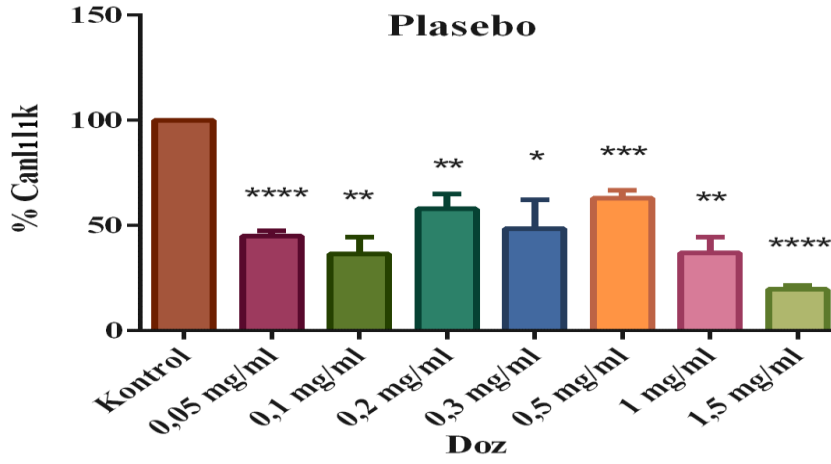


Şekil 4.33.L3 formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi

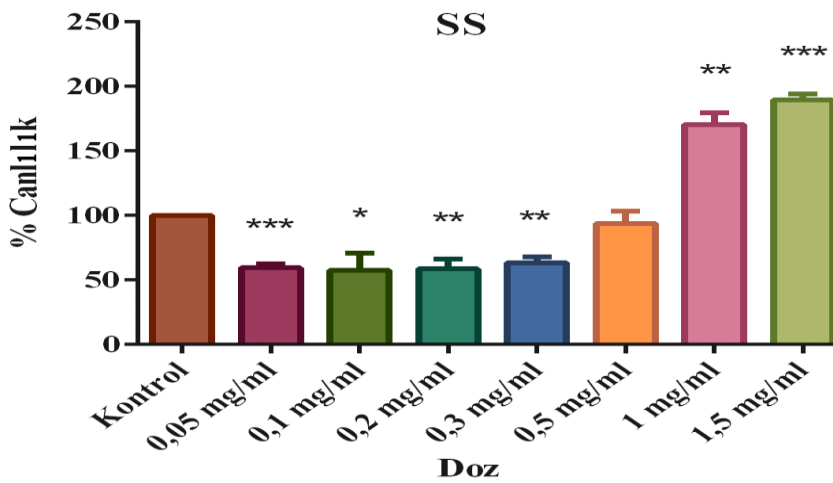




Şekil 4.34.L4 formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi



Şekil 4.35.Plasebo formülün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi



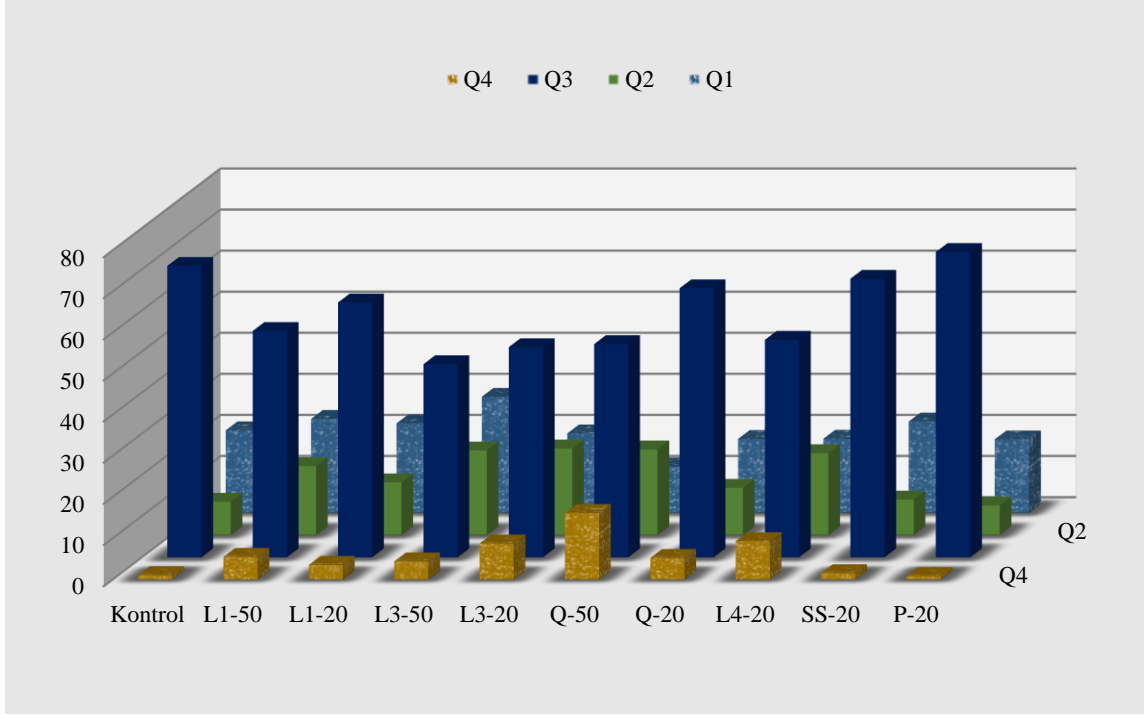
Şekil 4.36.SS formülünün 24 saat sonrası SKOV-3 hücreleri ile % hücre canlılığı istatistiksel analizi

#### 4.11.2. Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile apoptozun belirlenmesi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidilserinler (PS) hücre apoptoza gittiğinde hücre zarının dış yüzeyine transloke olurlar. Plazma zarı bütünlüğü ve geçirgenlik farklılıkları yoluyla hücrelerin apoptotik ya da nekrotik olup olmadığını belirlemek için yaygın olarak, PI ve Anneksin V bağlantılı olarak kullanılır. Ekstrasellüler membran yüzeyine transloke olmuş PS molekülünün, floresan işaretli Anneksin-V ile kompleks oluşturması erken apoptotik hücrelerin, hücre geçirgenliğinin tamamen kaybolması sonrasında PI ile hücre çekirdeğinin boyanması ise geç apoptotik hücrelerin kantitatif olarak akım sitometrisinde ölçümüne olanak sağlamaktadır (Rieger ve ark., 2011).

Canlı hücrelerde PS lokalizasyonu iç membranda lokalize olurken, erken apoptotik süreçte PS molekülü dış membrana doğru yer değiştirmekte ve böylelikle  $Ca^{+2}$  bağımlı fosfolipit bağlanma proteini olan Anneksin-V ile kompleks oluşturabilmektedir. Ayrıca membran bütünlüğü bozulan geç apoptotik hücrelerin genetik materyalinin PI ile boyanması mümkün olmaktadır (Overbeeke ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1998).

HeLa hücrelerinin Qu, Qu/M- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksleri ve plasebo ile 24 saat inkübasyonu sonunda apoptoz etkisine bakılmıştır. Her bir deney düzeninde üç tekrar kullanılmış olup, her bir deney üç kez bağımsız olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda kontrol hücre canlılığına göre L3 formülasyonunun  $IC_{50}$  değeri için kullanılan konsantrasyonda (400 $\mu$ g/mL) diğer formülasyonların aynı bölgelerine göre sırasıyla, Q3 bölgesi canlı hücre yüzdesi % 46.90 ile en düşük, Q2 bölgesi geç apoptotik/nekrotik hücre yüzdesi % 20.50 ile en yüksek değer elde edilmiştir. Benzer şekilde L3 formülasyonunun sitotoksik olmayan konsantrasyonu için kullanılan konsantrasyonda (110 $\mu$ g/mL) ise Q3 bölgesi canlı hücre yüzdesi % 51.05, Q2 bölgesi geç apoptotik/nekrotik hücre yüzdesi % 21.00 olarak bulunmuştur. Şekil 4.37.'de deneyden elde edilen verilerin ortalaması gösterilmiştir.



Şekil 4.37. *Qu* ve *Qu/M-β-CD* inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 24 saat sonrası akım sitometrisi

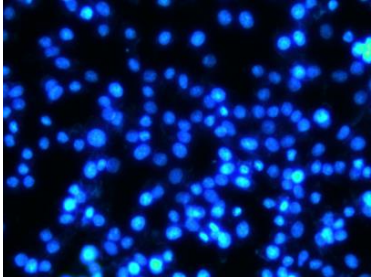
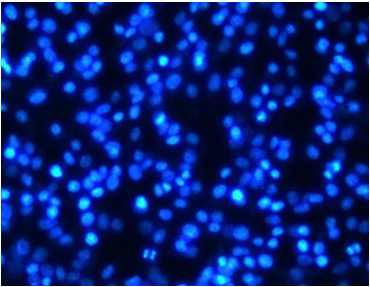
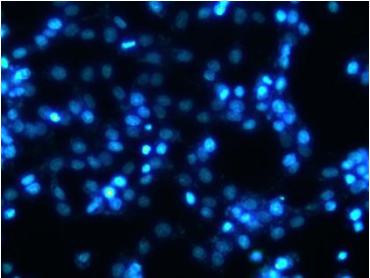
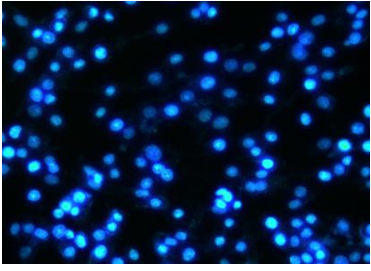
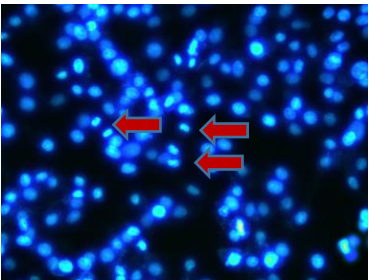
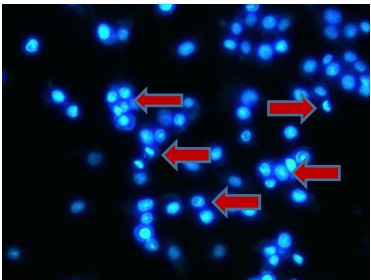
#### 4.11.3. Hoechst boyama

Apoptotik hücrelerin tespitinde birçok yöntemin kullanılması mümkündür. Hücre canlılığı kaybı, DNA parçalanması ve DNA yoğunlaşması (nükleer DNA Hoechst boyama ile tespit edilir) gibi bazı özellikler apoptozun görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Tipik DNA fragmentasyonu apoptoza giden hücrelerde görülen en önemli bulgudur. Hoechst 33342 (2'-[4-etoksifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroklorid trihidrat), DNA ultraviyole ışık ile uyarıldığı zaman 460 ila 490 nm' de mavi floresan yayar. Zardan geçebilen bir boya olan Hoechst 33342, hücrelerin kolaylıkla boyanmasında avantaj sağlar. DNA'nın Adenin-Timin (AT) bakımından zengin bölgelerine tercihen bağlanır ve DNA'da floresan yoğunluğunu büyük ölçüde artırır (Chazotte, 2011; Zhang ve ark., 1997).

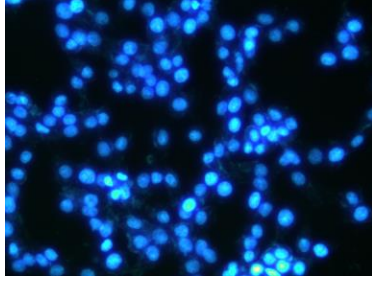
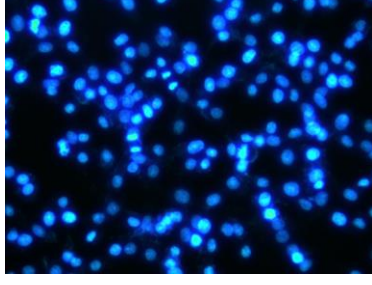
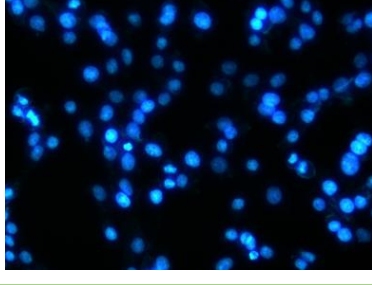
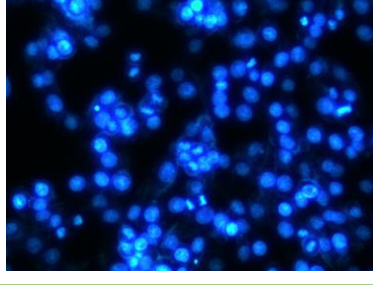
Çalışmamızda, HeLa hücrelerinde *Qu*, *Qu/M-β-CD* inklüzyon kompleksleri ve plasebo formülünün 24 saat inkübasyonu sonrasında nükleuslarında apoptoza bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişimler Hoechst boyası kullanılarak floresan mikroskopta 40x'lik objektifle incelenmiştir. Kontrol grubu, toksik olmayan ve  $IC_{50}$  konsantrasyonlarına bağlı sonuçlar Şekil 4.38'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna ve plasebo formülüne toksik olmayan konsantrasyonlara ait görüntülerde hücrelerin

nükleer yapısını koruduğu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak diğer formülasyonlar karşılaştırıldığında L3'ün toksik olmayan ve IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında yoğun olarak kromatin kondenzasyonu (ok ile gösterilen) görülmüştür. L3'ü takiben sırasıyla L1, Qu, L4 ve SS gruplarındaki apoptotik etkiler kondenzasyon varlığına bağlı olarak gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada (Xiang ve ark., 2014), 24 saat boyunca 25 µmol/L Qu ile inkübe edilen HeLa hücrelerindeki apoptotik etkiye bağlı morfolojik değişimler Hoechst boyaması yapılarak gösterilmiştir.

<i>Kontrol</i>		
	<i>Sitotoksik olmayan Konst.</i>	<i>IC<sub>50</sub></i>
<i>Plasebo</i>		-
<i>L1</i>		
<i>L3</i>		

Şekil 4.38. Qu, Qu/M-β-CD inklüzyon kompleksleri Hoechst boyaması görüntüleri

	<i>Sitotoksik olmayan Konst.</i>	<i>IC<sub>50</sub></i>
<i>L4</i>		-
<i>SS</i>		-
<i>Qu</i>	 	

Şekil 4.38. (devam) *Qu*, *Qu/M-β-CD* inklüzyon kompleksleri *Hoechst* boyaması görüntüleri

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Qu/M- $\beta$ -CD komplekslerinin karakterizasyonu flavonoid molekülünün her iki yöntemle de M- $\beta$ -CD matrisi içerisinde tamamen veya kısmi olarak yerleşmiş olduğunu göstermektedir. Kompleksin, yüksek enerjili amorf halde olması ve moleküller arası hidrojen bağları sayesinde Qu'nun sudaki çözünürlüğünde artış elde edilmesi sağlanmıştır. İnküzyon komplekslerinin hazırlanma metotlarına göre formülasyonların birbirlerine göre üstünlükleri tespit edilmiştir. Çözünürlük açısından modifiye liyofilizasyon yönteminde Qu'nun 83.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$  çözünürlüğü ile 254 kat artış sağlanmış olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Buna ek olarak, Qu'nun artan antioksidan aktivitelerinin fizikokimyasal karakterizasyonunun olumlu gelişmeleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Kararlılık çalışmalarında da modifiye liyofilizasyon metodunun evaporasyon metoduna göre daha olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular literatürdeki çalışmaları desteklemekle birlikte umut verici analizler göz önüne alındığında komplekslerin verimliliği biyolojik sistemlerde değerlendirilecek durumda olduğundan bahsedilebilir.

Hücre kültürü çalışmalarının sonucunda, sitotoksik etki açısından, modifiye liyofilizasyon metodu ile hazırlanan formülasyonların ve evaporasyon metodu ile hazırlanan formülasyonun hücre tipine göre farklı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. HeLa hücrelerinde özellikle zamana bağlı, modifiye liyofilizasyon metodu ile hazırlanan L3 formülasyonunun diğer modifiye liyofilizasyon formülasyonlarına ve evaporasyon metoduyla hazırlanan formülasyona göre düşük konsantrasyonda ( $\text{IC}_{50}$ : 195  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

Bunun aksine SKOV-3 hücrelerinde ise evaporasyon metodu ile hazırlanan L4 formülasyonu ile 24 saat inkübasyon sonrasında  $\text{IC}_{50}$  değeri olarak 235  $\text{mg}/\text{mL}$  belirlenmiş olup diğer formülasyonlara karşı bu hücrelerin dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Formülasyonların servikal kanser hücresi üzerine olası apoptotik etkilerinin incelemesi sonrasında ise, hem erken apoptozun uyarılmasında hem de DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde L3 formülasyonunun etkili olduğu görülmüştür.

Tez çalışmasının hücre kültürü kısmında L3 ve L4 formülasyonlarının her iki hücre tipi üzerine gösterdikleri sitotoksik etki yüksek dozda gözlenmiştir.

Kemoterapötik aday bir ilacın kanser hücrelerine karşı etkinliğini artırmak ve aynı zamanda normal hücrelere karşı sitotoksik etkisinin minimum düzeyde tutabilmek için, o ilaca ait sitotoksik etkiye düşük dozlarda ulaşmak gerekmektedir. Bu nedenle, tez çalışmasının devamı olarak formülasyonların sitotoksik etkisinin düşük dozda elde edilmesine yönelik deneysel çalışmaların planlanması ve bunun devamı olarak da bu formülasyonların apoptotik mekanizma üzerine olası etkilerinin daha detaylı olarak incelenmesi düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Ağabeyoğlu, İ., 2007. Biyofarmasötik, Modern Farmasötik Teknoloji. Fersa Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara.
- Ahmed, A., Wang, H., Yu, H., Zhou, Z., Ding, Y., Hu, Y., 2015. Surface engineered cyclodextrin embedded polymeric nanoparticles through host–guest interaction used for drug delivery. *Chem. Eng. Sci.* 125, 121–128.
- Akçakoca, E.P., Atav, R., 2006. Siklodekstrinlerin inklüzyon kompleksleri. *Tekst. ve Konfeksiyon Araştırma Uygul. Merk. Yayınları* 16, 94–99.
- Akçalı, A., 2010. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkol. Derg.* 25, 119–123.
- Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L.A., Torres-Rivas, F., Rodrigo-Garcia, J., González-Aguilar, G.A., 2005. Complexation of apple antioxidants: Chlorogenic acid, quercetin and rutin by  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). *J. Incl. Phenom.* 53, 121–129.
- Anandam, S., Selvamuthukumar, S., 2014. Fabrication of cyclodextrin nanosponges for quercetin delivery: Physicochemical characterization, photostability, and antioxidant effects. *J. Mater. Sci.* 49, 8140–8153.
- Apaydın, E., 2016. Hücre İçi Mekanizmalara Dayalı İntrasellüler Kalsiyum Artışının Apoptoz Üzerine Etkileri. *Anadolu Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Biyoteknoloji BD Yüksek Lisans Tezi.*
- Ayrim, A., 2016. Ovaryum Kanserinde Hücre İçi Kalsiyum Değişimlerinin Ultrayapısal Olarak İncelenmesi. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.*
- Başaran, B., 2008. Siprofloksasin ve hidroksipropil- $\beta$ - siklodekstrin kompleksini içeren oftalmik in-sitü jel formülasyonlarının geliştirilmesi ve değerlendirilmesi. *Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilim. Enstitüsü Farmasötik Teknol. ABD Yüksek Lisans Tezi.*
- Bekers, O., Uijtendaal, E. V., Beijnen, J.H., Bult, A., Underberg, W.J.M., 1991. Cyclodextrins in the pharmaceutical field drug development and industrial pharmacy. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17, 1991.



- Bellamy, C.O.C., Malcomson, R.D.G., Harrison, D.J., Andrew, H., 1995. Cell death in health and disease : The biology and regulation of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 6, 3–16.
- Bilensoy, E., Doğan, L., Şen, M., Hincal, A., 2007. Complexation behavior of antiestrogen drug tamoxifen citrate with natural and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57, 651–655.
- Borghetti, G.S., Lula, I.S., Sinisterra, R.D., Bassani, V.L., 2009. Quercetin/ $\beta$ -Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture. *AAPS PharmSciTech* 10, 235–242.
- Bose, S., Michniak-Kohn, B., 2013. Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 442–52.
- Boyle, P., Levin, B., 2008. Dünya Kanser Raporu 2008. Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC), Lyon.
- Braganhol, E., Zamin, L.L., Canedo, A.D., Horn, F., Tamajusuku, A.S.K., Wink, M.R., Salbego, C., Battastini, A.M.O., 2006. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer. Drugs* 17, 663–71.
- Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C.R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmüller, G., Schlimok, G., 2000. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 525–33.
- Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 645–666.
- Carlotti, M.E., Sapino, S., Ugazio, E., Caron, G., 2011. On the complexation of quercetin with methyl- $\beta$ -cyclodextrin: Photostability and antioxidant studies. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 70, 81–90.
- Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M.V., Igartuburu, J.M., Garcia Barroso, C., 2014. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem.* 165, 198–204.

- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K., 2005. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech* 6, E329–E357.
- Chao, J., Liu, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Guo, Z., Wang, Y., 2014. Investigation of the inclusion behavior of ofloxacin with methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Mol. Liq.* 200, 404–409.
- Chao, J., Su, J., Li, J., Zhao, W., Huang, S., Du, R., 2011. Investigation on the inclusion behaviour of baicalein with  $\beta$ -cyclodextrin and derivatives and their antioxidant ability study. *Supramol. Chem.* 23, 641–649.
- Chazotte, B., 2011. Labeling nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 83–86.
- Chien, S.-Y., Wu, Y.-C., Chung, J.-G., Yang, J.-S., Lu, H.-F., Tsou, M.-F., Wood, W.G., Kuo, S.-J., Chen, D.-R., 2009. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 28, 493–503.
- Choi, E.J., Bae, S.M., Ahn, W.S., 2008. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch. Pharm. Res.* 31, 1281–5.
- Coneac, G., Gafițanu, E., Hădărugă, N.G., Hădărugă, D.I., 2009. Quercetin and rutin / 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles : obtaining , characterization and antioxidant activity. *Scan. Electron Microsc.* 15, 441–448.
- Corciova, A., Ciobanu, C., Poiata, A., Mircea, C., Nicolescu, A., Drobotă, M., Varganici, C.-D., Pinteala, T., Marangoci, N., 2015. Antibacterial and antioxidant properties of hesperidin: $\beta$ -cyclodextrin complexes obtained by different techniques. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 81, 71–84.
- Curcio, M., Cirillo, G., Parisi, O.I., Iemma, F., Picci, N., Puoci, F., 2012. Quercetin-imprinted nanospheres as novel drug delivery devices. *J. Funct. Biomater.* 3, 269–282.

- Çalışkan, G., Çelik, O., Erdoğan, H., Gölgeci, M.H., Kavalcı, A., 2002. Anormal servikal sitoloji sonucu olan hastalarda servikal biyopsi ve HPV sonuçlarının korelasyonu. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara  
<http://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/600/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmpzsnm13/13.S15.pdf>.
- Çapanoğlu Güven, E., Toydemir Otkun, G., Boyacıoğlu, D., 2010. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. GIDA Derg. 35, 387–394.
- Çaylak, E., 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Derg. 9, 73–83.
- Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2007. CUPRAC total antioxidant capacity assay of lipophilic antioxidants in combination with hydrophilic antioxidants using the macrocyclic oligosaccharide methyl  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. React. Funct. Polym. 67, 1548–1560.
- Çiftçi, R., Yüce, A., 2013. Effect of Quercetin on Homocysteine Level and Coronary Vascular Damage in Rats with Liver Fibrosis. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilim. Vet. Derg. 27, 159–167.
- Dajas, F., 2012. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. J. Ethnopharmacol. 143, 383–396.
- Das, S., Suresh, P.K., Desmukh, R., 2010. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 6, 318–323.
- Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: A review. Process Biochem. 39, 1033–1046.
- Denli, Z., 2003. Siprofloksasin içeren oftalmik çözeltilerin formülasyonunda hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin kullanımının değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji ABD Yüksek Lisans Tezi.
- Derviş, E., 2011. Oral Antioksidanlar. Dermatoz, SB. Haseki Eğitim Hastan. Dermatoloji Klin. 2, 263–267.

- Duarte, A., Martinho, A., Luís, Â., Figueiras, A., Oleastro, M., Domingues, F.C., Silva, F., 2015. Resveratrol encapsulation with methyl- $\beta$ -cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 1254–1260.
- Duchêne, D., Wouessidjewe, D., 1990. The current state of  $\beta$ -Cyclodextrin in pharmaceuticals. *Acta Pharm. Technol.* 36, 1–6.
- Duchêne, D., Wouessidjewe, D., 1990. Pharmaceutical Uses of Cyclodextrins and Derivatives. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16, 2487–2499.
- Dupuy, N., Barbry, D., Bria, M., Marquis, S., Vrielynck, L., Kister, J., 2005. <sup>1</sup>H-NMR study of inclusion compounds of phenylurea derivatives in  $\beta$ -cyclodextrin. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 61, 1051–1057.
- Duraj, J., Zazrivcova, K., Bodo, J., Sulikova, M., Sedlak, J., 2005. Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma* 52, 273–279.
- Elik, M., Serdaroğlu, G., Özkan, R., 2007. Mirisetin ve kuersetin bileşiklerinin antioksidan etkinliklerinin dft yöntemiyle incelenmesi. *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilim. Derg.* 28, 53–65.
- Ercan, P., El, S.N., 2010. Koenzim Q10 ' un beslenme ve sağlık açısından önemi ve biyoyararlılığı. *Türk Bilim Araştırma Vakfı Bilim Derg.* 3, 192–200.
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 59, 221–226.
- Folch-Cano, C., Guerrero, J., Speisky, H., Jullian, C., Olea-Azar, C., 2013. NMR and molecular fluorescence spectroscopic study of the structure and thermodynamic parameters of EGCG/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes with potential antioxidant activity. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 287–298.
- Forman, D., Ferlay, J., 2014. The global and regional burden of cancer, B. W., Stewart, C. P., Wild, (Eds) *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- Fukuda, N., Higuchi, N., Ohno, M., Kenmochi, H., Sekikawa, H., Takada, M., 1986. Dissolution behavior of prednisolone from solid dispersion system with cyclodextrin and polyvinylpyrrolidone. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 1366–1369.
- Gao, L., Liu, G., Wang, X., Liu, F., Xu, Y., Ma, J., 2011. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *Int. J. Pharm.* 404, 231–237.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1–9.
- Guo, C.Y., Yang, C.F., Li, Q.L., Tan, Q., Xi, Y.W., Liu, W.N., Zhai, G.X., 2012. Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. *Int. J. Pharm.* 430, 292–298.
- Gupta, H., Aqil, M., Khar, R.K., Ali, A., Bhatnagar, A., Mittal, G., 2010. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6, 324–333.
- Güleşci, N., Aygül, İ., 2016. Beslenme Yeri Alan Antioksidan Ve Fenolik Madde İçerikli Çerezler. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.* 5, 109–129.
- Hans, M., Lowman, A., 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6, 319–327.
- Higuchi, T., Connors, A., 1965. Phase solubility techniques, Higuchi, T.; Connors, A. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 1965, 4, 117–212. *Adv. Anal.* 4, 117–212.
- Hsieh, T.-C., Wu, J.M., 2009. Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, genistein and quercetin. *Anticancer Res.* 29, 4025–32.
- http-1 <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html>  
(Erişim tarihi: 19.05.2016)
- http-2 <http://www.cancer.gov/types/cervical/patient/cervical-treatment-pdq>  
(Erişim tarihi: 19.05.2016)

http-3

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/q4951?lang=en&region=TR>

(Erişim tarihi: 21.05.2016)

http-4 <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2351>

(Erişim tarihi: 13.06.2016)

http-5 <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003094-pdf.pdf>

(Erişim tarihi: 13.06.2016)

http-6 <http://www.flow-cytometry.us/index.php?page=apoptosis>

(Erişim tarihi: 13.06.2016)

http-7

<http://aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=13&USER=1228>

(Erişim tarihi: 20.07.2016)

ICH, 2005. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, International Conference on Harmonization.

Kahraman, A., Serteser, M., Köken, T., 2002. Flavonoidler. Kocatepe Tıp Derg. 1–8.

Kakran, M., Sahoo, N.G., Li, L., 2011. Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion. Colloids Surfaces B Biointerfaces 88, 121–130.

Kang, J.W., Kim, J.H., Song, K., Kim, S.H., Yoon, J.-H., Kim, K.-S., 2010. Kaempferol and Quercetin, Components of Ginkgo biloba Extract (EGb 761), Induce Caspase-3-Dependent Apoptosis in Oral Cavity Cancer Cells. Phyther. Res. 24, 77–82.

Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N., Soyer, Y., 2005. Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey. Turk J Agric 29, 297–303.

Kaya, C., Çalışkan, Y., Yönden, Z., 2012. APOPTOZİS. Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg 3, 26–37.

Kim, H., Choi, J., Jung, S., 2009. Inclusion complexes of modified cyclodextrins with some flavonols. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 64, 43–47.

- Kim, M.K., Park, K.S., Yeo, W.S., Choo, H., Chong, Y., 2009. In vitro solubility, stability and permeability of novel quercetin-amino acid conjugates. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 1164–1171.
- Koca, N., Karadeniz, F., 2005. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda Derg.* 30, 229–236.
- Kockx, M.M., Muhring, J., Knaapen, M.W., de Meyer, G.R., 1998. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.* 152, 885–8.
- Koshiyama, M., Matsumura, N., Konishi, I., 2014. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type i and type II. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Kroon, P. a., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C., Williamson, G., 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *A. J. Clin. Nutr.* 80, 15–21.
- Kumari, A., Yadav, S.K., Pakade, Y.B., Singh, B., Yadav, S.C., 2010. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 80, 184–192.
- Lakhanpal, P., Rai, D.K., 2007. Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet J. Med. Updat.* 2, 22–37.
- Li, B., Konecke, S., Harich, K., Wegiel, L., Taylor, L.S., Edgar, K.J., 2013. Solid dispersion of quercetin in cellulose derivative matrices influences both solubility and stability. *Carbohydr. Polym.* 92, 2033–2040.
- Liu, M., Dong, L., Chen, A., Zheng, Y., Sun, D., Wang, X., Wang, B., 2013. Inclusion complexes of quercetin with three  $\beta$ -cyclodextrins derivatives at physiological pH: Spectroscopic study and antioxidant activity. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 115, 854–860.
- Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Drug solubilisation and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85, 1017–1025.
- Loftsson, T., Duchêne, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329, 1–11.

- Masood, F., 2015. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C* 60, 569–578.
- Mohammadi Ghalaei, P., Varshosaz, J., Sadeghi Aliabadi, H., 2014. Evaluating Cytotoxicity of Hyaluronate Targeted Solid Lipid Nanoparticles of Etoposide on SK-OV-3 Cells. *J Drug Deliv* 2014, 746325.
- Mülazımoğlu, İ.E., Özkan, E., 2008. NPDAS İle Modifiye Edilmiş Camı Karbon Elektrot Yüzeyinde Kuersetin'in Elektrokimyasal Ve Spektroskopik Davranışlarının İncelenmesi. *Selçuk Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Derg.* 201–216.
- Nacz, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111.
- Oatley, M., Fry, M., Mullen, L., 2015. A cross-sectional study of the clinical characteristics of cancer patients presenting to one tertiary referral emergency department. *Int. Emerg. Nurs.* 24, 5–8.
- Onyeneho, S.N., Hettiarachchy, N.S., 1993. Antioxidant activity fatty acids and phenolic acids of potato peels. *J. Sci. Food Agric.* 345–350.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Haanen, C., 1998. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis.*
- Öğünç, Y., 2015. Hedeflendirilmiş kanser tedavisinde vinkristin ve  $\epsilon$ -viniferin yüklü polimerik nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve in vitro uygulamaları. *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilim. Enstitüsü Biyokim. ABD Yüksek Lisans Tezi.*
- Önder, N.İ., 2013. Bazı Sentetik Bileşiklerin Anti-Kanser Özelliklerinin Belirlenmesi. *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilim. Enstitüsü Biyokim. ABD Yüksek Lisans Tezi.*
- Pessine, F.B.T., Calderini, A., Alexandrino, G.L., 2012. Review : Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. *Magn. Reson. Spectrosc.* 1, 237–264.



- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042.
- Pinton, P., Giorgi, C., Zecchini, E., Rizzuto, R., 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407–6418.
- Poggi, M.M., Coleman, C.N., Mitchell, J.B., 2001. Sensitizers and Protectors of Radiation and Chemotherapy. *Curr. Probl. Cancer* 25, 329–412.
- Prabhu, A.A.M., Kumar, G.S.S., Fatiha, M., Sorimuthu, S., Raj, M.S., 2015. Encapsulation of phenylalanine and 3,4-dihydroxyphenylalanine into  $\beta$ -cyclodextrin: Spectral and molecular modeling studies. *J. Mol. Struct.* 1079, 370–382.
- Pralhad, T., Rajendrakumar, K., 2004. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 333–339.
- Priego, S., Feddi, F., Ferrer, P., Mena, S., Benlloch, M., Ortega, A., Carretero, J., Obrador, E., Asensi, M., Estrela, J.M., 2008. Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3330–3342.
- Ren, M.-X., Deng, X.-H., Ai, F., Yuan, G.-Y., Song, H.-Y., 2015. Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro. *Exp. Ther. Med.* 10, 579–583.
- Rieger, A.M., Nelson, K.L., Konowalchuk, J.D., Barreda, D.R., 2011. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J. Vis. Exp.* 37–40.
- Sabbağ, Ç., Sürücüoğlu, M.S., 2011. Likopen: İnsan Sağlığında Vazgeçilmez Bir Bileşen. *Gıda Teknol. Elektron. Derg.* 6, 27–41.
- Scalia, S., Haghi, M., Losi, V., Trotta, V., Young, P.M., Traini, D., 2013. Quercetin solid lipid microparticles: A flavonoid for inhalation lung delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 278–285.

- Seufi, A.M., Ibrahim, S.S., Elmaghraby, T.K., Hafez, E.E., 2009. Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. *J. Exp. clinical Cancer Res.* 28, 80.
- Shabir, G., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *J Chromatogr A.* 987(1-2), 57–66.
- Shaw, T.J., Senterman, M.K., Dawson, K., Crane, C.A., Vanderhyden, B.C., 2004. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol. Ther.* 10, 1032–1042.
- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* 20, 341–359.
- Singh, R., Bharti, N., 2010. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes—a review. *J. Pharm. Sci. Technol.* 2, 171–183.
- Singh, R., Lillard, J.W., 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 86, 215–223.
- Singireddy, A., Subramanian, S., 2013. Cyclodextrin nanosponges to enhance the dissolution profile of quercetin by inclusion complex formation. *Part. Sci. Technol.* 34, 341–346.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 70, 1–20.
- Sotillo, D.R., Hadley, M., Holm, E.T., 1994. Potato peel waste: Stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. *J. Food Sci.* 59, 1031–1033.
- Sri, K.V., Kondaiah, A., Ratna, J.V., Annapurna, A., 2007. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 245–253.

- Srinivas, K., King, J.W., Howard, L.R., Monrad, J.K., 2010. Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *J. Food Eng.* 100, 208–218.
- Stockert, J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 114, 785–796.
- Szejtli, J., 1998. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 98, 1743–1753.
- Szejtli, J., 1988. *Cyclodextrin Technology*, Springer, New York, ISBN: 978-90-277-2314-7.
- Szente, L., Szejtli, J., 1999. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36, 17–28.
- Şen, M., 2015. Bazı Sentetik Bileşiklerin Topoizomeraz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilim. Enstitüsü Biyokim. ABD Yüksek Lisans Tezi.
- Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C., 1998. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 757–762.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Awani, K.R., 2010. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2, 72–79.
- Tsao, J.-Y., Wu, C.-P., Tsai, H.-H., Peng, K.-C., Lin, P.-Y., Su, S.-Y., Chen, L.-D., Tsai, F.-J., Tsai, Y., 2011. Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation on the aqueous solubility, structure, thermal stability, antioxidant activity, and tyrosinase inhibition of paeonol. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 72, 405–411.
- Tuncer, M., 2009. Türkiye’de Kanser Kontrolü. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, ISBN: 978-975-590-300-2.

- Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunakaran, D., Nagini, S., 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 649, 84–91.
- Voncina, B., Vivod, V., 2013. Cyclodextrins in Textile Finishing. *InTech 3*, 53–75.
- Vyas, A., Saraf, S., Saraf, S., 2008. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 62, 23–42.
- Wu, T.H., Yen, F.L., Lin, L.T., Tsai, T.R., Lin, C.C., Cham, T.M., 2008. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 346, 160–168.
- Xiang, T., Fang, Y., Wang, S.-X., 2014. Quercetin suppresses HeLa cells by blocking PI3K/Akt pathway. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 34, 740–4.
- Xie, X., Yin, J., Jia, Q., Wang, J., Zou, C., Brewer, K.J., Colombo, C., Wang, Y., Huang, G., Shen, J., 2011. Quercetin induces apoptosis in the methotrexate-resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 via mitochondrial dysfunction and dephosphorylation of Akt. *Oncol. Rep.* 26, 687–93.
- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008. Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoitler. *Türk Bilim. Derlemeler Derg.* 1, 47–58.
- Yıldız, H., Baysal, T., 2003. Bitkisel fenoliklerin kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Gıda Mühendisliği Derg.* 29–35.
- Yurtdaş, G., Demirel, M., Genç, L., 2011. Inclusion complexes of fluconazole with  $\beta$ -cyclodextrin: Physicochemical characterization and in vitro evaluation of its formulation. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 70, 429–435.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, Steven, R., Yan, G., 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 23, 525–531.
- Zhao, Z., Dong, L., Wu, Y., Lin, F., 2011. Preliminary separation and purification of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold extracts by macroporous resins. *Food Bioprod. Process.* 89, 266–272.

Zheng, Y., Haworth, I.S., Zuo, Z., Chow, M.S.S., Chow, A.H.L., 2005.

Physicochemical and structural characterization of quercetin- $\beta$ -cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* 94, 1079–1089.

Zidan, A.S., Sammour, O.A., Megrab, N.A., Habib, M.J., Khan, M.A., 2007. Quality by

design: understanding the product variability of a self-nanoemulsified drug delivery system of cyclosporine A. *J. Pharm. Sci.* 96, 2409–2423.

# TEZ İLE İLGİLİ YAYINLAR



## Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes



Kadri Güleç<sup>1</sup> and Müzeyyen Demirel<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Program in Nanotechnology, Graduate School of Sciences, Anadolu University, Eskişehir, Turkey;

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

**Abstract:** Quercetin (Qu), a polyphenolic flavonoid, is one of the most effective plant originated antioxidants. Despite the potential use of Qu in clinical trials, low water solubility, stability problems and the scarcity of cellular bioavailability limit its applications. The purpose of this study was to enhance aqueous solubility, dissolution rate and antioxidant activity of Qu by complexation with Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD). Analyses results showed that the aqueous solubility, dissolution rate and antioxidant activity of the complex were increased 254-fold, ~3-fold and 10% respectively compared to the pure Qu. Complexes were prepared by freeze-drying and evaporation method. The characteristics of the complexes were evaluated by DSC, XRD, <sup>1</sup>H-NMR, FT-IR, SEM, encapsulation efficacy, *in-vitro* dissolution rate analyses. Antioxidant activity studies on complexes carried out with DPPH tests. Analyses results showed that the formation of the complexes resulted in enhanced solubility with increased its antioxidant activity of Qu.



M. Demirel

**Keywords:** Antioxidant activity, DPPH, inclusion complex, methyl- $\beta$ -cyclodextrin, phase solubility, Quercetin.

Received: June 01, 2015

Revised: August 03, 2015

Accepted: October 09, 2015

### 1. INTRODUCTION

Flavonoids are very common in nature and can be extracted from different types of plants easily. Due to some valuable health-benefiting properties, flavonoids are widely studied in terms of their chemistry as well as considering their biological activity. Many researchers in pharmaceutical and medicine chemistry focused on flavonoids considering their anti-oxidant, anti-tumor, anti-inflammation, blood lipid degrease, coronary artery dilatation, anti-platelet aggregation, anti-anemic action, anti-anaphylaxis and antibacterial activities [1, 2]. The antioxidant capacities of these compounds are based on their efficiency as radical scavengers, which can block the formation of reactive oxygen species and also radical chain reactions [3].

Quercetin (Qu), a natural pentahydroxyflavone, is widely distributed in the medicinal plants, flowers, fruits, leaves and variety of beverages as their important constituent. It plays an important role in science of nutrition and medical application. Qu has many biological activities such as antitumor activity, cardiovascular protection, anti-inflammatory, estrogenic and anti-allergy activity and Qu act as an effective radical-scavenger against oxidative cell damage [4, 5]. In spite of being so effective in a wide range, its use in pharmaceutical field is limited by its low aqueous solubility. In recent years, cyclodextrin (CD) complexation has been successfully used

to improve solubility, chemical stability and bioavailability of such polyphenolic flavonoids (Fig. 1) [6, 7].

Cyclodextrins (CDs) are the cyclic oligomers of glucose which has a lattice-like super molecular structure with lipophilic inner cavity and hydrophilic exterior surfaces. CDs can form inclusion complexes easily with many of the drug molecules. Inclusion with CDs protect the drug from physical, chemical and enzymatic degradation and also increase the membrane permeability and bioavailability of active molecule [8-10]. These changes may increase the potential therapeutic use of the drugs. Among the chemically modified CDs, methylated CDs deserve special attention due to its higher water solubility and greater solubilizing and complexation ability [11].

The antioxidant activity of phenolic compounds can be modified in the presence of CDs. Native CDs;  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, and  $\gamma$ -CD, are cyclic oligosaccharides with six, seven, and eight glucopyranose units, respectively. These compounds have a hydrophilic external part and a relatively hydrophobic cavity in which active molecules can be encapsulated by inclusion complex formation [3].

Studies have shown that the association of Qu with CDs to form inclusion complexes improves the aqueous solubility, dissolution rate and antioxidant activity of the flavonoid [12-15]. There are two studies about the complexation of Qu with M- $\beta$ -CD in literature. In these studies, inclusion complexes were formed in tris-HCl buffer solution (pH 7.40) and water media [13, 16]. It is the first time that properties of the inclusion complexes have investigated in ethanol:water (1:1, v/v) medium in our study. Also in former studies, complexes

\*Address correspondence to this author at the Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, P.O. Box: 26470, Eskişehir, Turkey; Tel: +90-222-335-0580; Fax: +90-222-335-0750; E-mail: mdemirel@anadolu.edu.tr



**ANKARA UNIVERSITY  
FACULTY OF PHARMACY**



**I  
S  
O  
P  
S** **11<sup>th</sup>** **International  
SYMPOSIUM ON  
PHARMACEUTICAL  
SCIENCES**

**JUNE 09-12, 2015  
ANKARA, TURKEY**



**SYMPOSIUM SECRETARIAT**

**Sinem ASLAN ERDEM**

Ankara University, Faculty of Pharmacy  
Tandogan 06100 Ankara, TURKEY

Phone: +90 312 203 3104 • Fax: +90 312 213 1081

E-mail: [isops@ankara.edu.tr](mailto:isops@ankara.edu.tr) • Web: [www.isops-ankara.org](http://www.isops-ankara.org)





## P-90: Characterization Studies of Freeze-Dried Quercetin/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Complex

K. Gülec<sup>1</sup>, M. Demirel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Anadolu University, Graduate School of Sciences, Program in Nanotechnology

<sup>2</sup>Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology  
26470 Eskişehir, TURKEY

Quercetin (Qu), a polyphenolic flavonoid, is one of the most effective plant originated antioxidants. Despite the potential usage of Qu in cancer treatment, low water solubility, stability problems and the scarcity of cellular bioavailability limit its applications. In this scope, inclusion complex of Qu with Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (Me- $\beta$ -CD) was prepared by freeze-drying method.

### INTRODUCTION

CD inclusion complexes have been shown to improve the stability, solubility, dissolution rate, and bioavailability of the drugs.

### MATERIALS AND METHODS

*Phase solubility studies and preparation complex:* Phase solubility studies were performed according to the method of Higuchi and Connors [1]. A validated HPLC method was used for the determination of Qu. Qu/Me- $\beta$ -CD complex prepared by freeze-drying method with 1:1 molar ratios determined by the phase solubility diagram studies (Fig. 1).

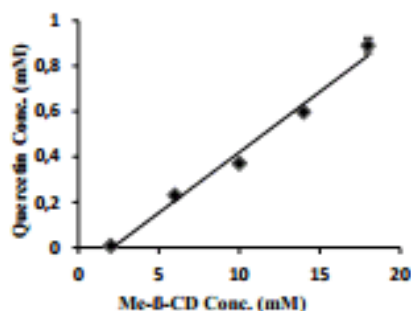


Fig. 1. Phase Solubility Diagram of Qu/Me- $\beta$ -CD System in Ethanol:Water (1:4) at 25°C (n=3, SE)

*Characterization:* Aqueous solubility tests carried out at 25 °C. The antioxidant properties were evaluated by determination of the scavenging activity towards DPPH radical [2]. The complex was characterized by FT-IR, DSC, XRD, NMR.

### RESULTS AND DISCUSSION

The phase solubility diagram showed a linearity between increases solubility of Qu and Me- $\beta$ -CD ( $r^2=0.992$ ) (Fig. 1). The curve obtained can be classified as type A<sub>1</sub> [1]. Complexation strongly increases the water solubility of Qu from 0.3  $\mu$ g/ml to 83.9  $\mu$ g/ml, at 25 °C (n=3). In addition, the antioxidant activity of the complex was more effective than pure Qu on DPPH scavenging (Fig. 2).

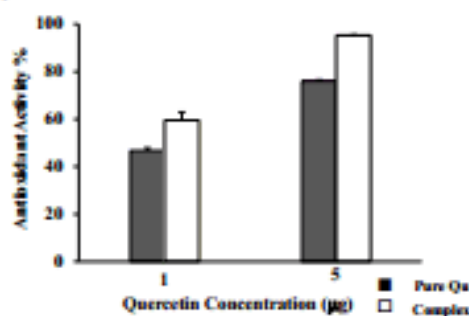


Fig. 2. Antioxidant Activity of Pure Qu and Qu/Me- $\beta$ -CD Complex (n=5, SE)

The formation of inclusion complex with Me- $\beta$ -CD in the solid-state were confirmed by DSC, XRD, NMR and FT-IR.

### CONCLUSIONS

As a conclusion, the overall of Qu/Me- $\beta$ -CD inclusion complex designed to be developed showed that increasing the aqueous solubility and antioxidant activity.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by Anadolu University Scientific Research Project Foundation (No: 1501S059).

### REFERENCES

- Higuchi, T.; Connors, K.A., Phase solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum* 1965, 4, 117-212.
- Cirillo, G.; Vittorio, O.; Hampel, S.; Iemma, F.; Pardi, P.; Cecchini, M.; Pauci, F.; Picci, N., Quercetin nanocomposite as novel anticancer therapeutic: Improved efficiency and reduced toxicity. *Eur J Pharm Sci* 2013, 49, 359-365.



The image is a promotional poster for the Gazi Pharma Symposium Series (GPSS). The background features a dark blue space theme with a satellite, a molecular model, and a view of Earth from space. The text is arranged in a circular pattern around the Earth. At the top, the acronym 'GPSS' is prominently displayed in large, white, sans-serif font, with 'GAZI PHARMA SYMPOSIUM SERIES' written below it. To the right, the logo of Gazi University Faculty of Pharmacy, established in 1982, is visible. A central grey box contains the event details: 'INTERNATIONAL GAZI PHARMA SYMPOSIUM November 12-15, 2015 Spice Hotel / Belek - ANTALYA / TURKEY'. The symposium topics are listed in a circular arc: PHARMACEUTICAL TOXICOLOGY, PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY, ANALYTICAL CHEMISTRY, BIOCHEMISTRY, PHARMACOGNOSY, PHARMACOLOGY, and FOOD ANALYSIS. At the bottom left, the logo of Akademi Kongre is shown with the text 'AKADEMİK KONGRE www.akademikongre.com 0 512 427 11 14'. The website 'www.gpss2015.org' is printed at the bottom center.

GAZI SYMPOSIUM SERIES PHARMA

**GPSS**  
GAZI PHARMA SYMPOSIUM SERIES

GAZI UNIVERSITY FACULTY OF PHARMACY  
1982

INTERNATIONAL  
**GAZI PHARMA SYMPOSIUM**  
November 12-15, 2015  
Spice Hotel / Belek - ANTALYA / TURKEY

PHARMACEUTICAL TOXICOLOGY  
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY  
PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY  
ANALYTICAL CHEMISTRY  
BIOCHEMISTRY  
PHARMACOGNOSY  
PHARMACOLOGY  
FOOD ANALYSIS

AKADEMİK KONGRE  
www.akademikongre.com  
0 512 427 11 14

[www.gpss2015.org](http://www.gpss2015.org)



## INVESTIGATION ON THE COMPLEXATION OF QUERCETIN WITH METHYL- $\beta$ -CYCLODEXTRIN

Kadri Güleç<sup>1</sup>, Müzeyyen Demirel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program in Nanotechnology, Graduate School of Sciences, Anadolu University, Tepebaşı, Eskişehir, Turkey

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

Quercetin (Qu) has many biological activities such as antitumor activity, cardiovascular protection, anti-inflammatory, estrogenic and anti-allergy activity and Qu act as an effective radical-scavenger against oxidative cell damage [1]. In spite of being so effective in a wide range, its use in pharmaceutical field is limited by its low aqueous solubility. The purpose of this study was to enhance aqueous solubility, dissolution rate and antioxidant activity of Qu by complexation with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD). The inclusion compounds were prepared by modified co-lyophilisation (L1), lyophilisation (L2) and evaporation (L4) methods, using a molar ratio Qu/M- $\beta$ -CD, 1:1. The quantity of Qu was determined by HPLC method. The characteristics of the complexes were evaluated by DSC, XRD, <sup>1</sup>H-NMR, FT-IR, SEM, encapsulation efficacy, *in-vitro* dissolution rate analyses. Dissolution experiments studied in 50 ml pH 1.2 by adding pure Qu (1 mg), physical mixture or the complexes containing an equivalent amount of Qu. Antioxidant activity of the pure Qu and complexes were evaluated *in vitro* by DPPH assay [2]. The drug-entrapment efficiency were found 52.33 %, 96.22 % and 90.99 % for L1, L2 and L4 formulation respectively. Analyses results demonstrated that formation of complexation strongly increases the aqueous solubility of Qu at 25°C. The results of characterization studies suggest that the Qu molecule was located inside the M- $\beta$ -CD cavity and, consequently a Qu/M- $\beta$ -CD inclusion complexes was formed. The pure Qu and physical mixture showed a low dissolution rate with 36 % and 30 % drug dissolved within 120 min respectively. On the other hand, 72 % and 70 % of drug was released within 5 min for L1 and L4 complexes respectively. According to results of DPPH studies, scavenging effect of Qu increased with an increased Qu concentration. It was noted that the antioxidant activity of Qu was influenced by M- $\beta$ -CD. The highest antioxidant activity were observed in L2 complex (62.11 % for 1 mg Qu concentration and 80.74 % for 5 mg Qu concentration).

### References

- [1] Z. Zhang, S. Gu, Y. Ding, M. Shen, L. Jiang, Mild and novel electrochemical preparation of  $\beta$ -cyclodextrin/graphene nanocomposite film for super-sensitive sensing of quercetin, *Biosens. Bioelectron.*, 57, 239-244, 2014.
- [2] A. Kumari, S. Kumar Yadav, Y.B. Pakade, B. Singh, S. Chandra Yadav, Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin, *Colloids Surf., B*, 80, 184-192, 2010.

### Acknowledgements

This study was financed by Anadolu University Scientific Research Project Foundation (No: 1502S059). We thank, Anadolu University, Plant, Drug and Scientific Research Center (AUBIBAM) for <sup>1</sup>H-NMR analyses.