

Hidroksiapatit-Jelatin ve Hidroksiapatit-Kitosan Biyokompozitlerin Yapay Vücut Sıvısı Ortamında Üretimi Sırasında 5-FU İlacının Yüklenmesi ve İlaç Salım Çalışmaları

Nalan ERDÖL AYDIN

İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Maslak, Sarıyer, İstanbul

Geliş / Received: 06/04/2018, Kabul / Accepted: 12/11/2018

Öz

Hidroksiapatit, ($\text{HAp}, \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) farklı medikal alanlarda uygulaması olan bir biyoseramiktir. Son yapılan çalışmalarda, nanoboyutlu HAp parçacıklarının farklı tümör türleri üzerinde gelişimi önleyici etki gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle, HAp veya HAp içeren kompozit malzemeler kontrollü ilaç salımı uygulamalarında ilaç taşıyıcı ortam olarak tercih edilmiştir. Ancak, sert yapısı ve yüksek kırılabilirliği klinik uygulamalarda kullanımını sınırlamaktadır. Bu mekanik dezavantajlar, polimer kullanılarak hidroksiapatit-polimer biyokompozit üretilmesiyle aşılabilmektedir. Bu çalışmada, hidroksiapatit-jelatin (HAp-GEL) ve hidroksiapatit-kitosan (HAp-CTS) biyokompozitler, pH 7.4 ve 37°C’ de yaş çöktürme yöntemiyle, çapraz bağlama ajanı olarak glutaraldehitin (GA) kullanıldığı SBF (Yapay Vücut Sıvısı) ortamında üretilmiştir. İlaç yüklemi işlemi, biyokompozitlerin yaş çöktürme yöntemi ile üretimi sırasında gerçekleştirilmiştir. Farklı miktarlarda (%2 ve %5) glutaraldehit (GA) ve farklı biyokompozitler ile yürütülen deneylerde glutaraldehitin ve biyokompozit türünün ilaç yüklenme verimi ve ilaç salım profili üzerine etkisi incelenmiştir. Tüm deneyler 5-Fluorouracil (5-FU) ilacı ile gerçekleştirilmiştir. HAp-GEL ve HAp-CTS biyokompozitlerde 5-FU ilacının yüklenme performansı deiyonize su, fosfat tampon çözelti (PBS) ve HCl çözelti ortamında incelenmiştir. Numunelerin 5-FU ilaç yüklenme ve ilaç salımı performansının belirlenmesinde UV spektrofotometre kullanılmıştır. Üretilen biyokompozitleri karakterize etmek için, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), X-ışını kırınımı (XRD), taramalı elektron mikroskopu (SEM), termogravimetrik analiz (TGA) ve partikül boyut analizleri yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyokompozit, Hidroksiapatit, İlaç Salım, İlaç Yükleme, Jelatin, Kitosan

5-FU Drug Loading During the Production of Hydroxyapatite-Gelatin and Hydroxyapatite-Chitosan Biocomposites in the Simulated Body Fluid Medium and Drug Release Studies

Abstract

Hydroxyapatite, ($\text{HAp}, \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) is a bioceramic applied in different biomedical areas. In recent studies, it has been concluded that hydroxyapatite nanoparticles has inhibition effect on different kind of tumors. Therefore, HAp or composite materials including HAp have been preferred in controlled drug delivery studies as a drug carrier. However, hard structure and highly fragile structure of hydroxyapatite limited its usage in clinical applications. This mechanical disadvantages can be overcome by using a polymer to produce a hydroxyapatite-polymer biocomposite. In this study, hydroxyapatite-gelatin (HAp-GEL) and hydroxyapatite-chitosan (HAp-CTS) biocomposites were produced by wet precipitation method at pH 7.4 and 37°C implementing glutaraldehyde (GA) as a cross-linking agent in the SBF (Simulated Body Fluid) medium. Drug loading process was performed during the production of biocomposites by wet precipitation method. By running experiments with different amounts (2% and 5%) of glutaraldehyde (GA) and different biocomposites, the effect of glutaraldehyde and type of composite on drug loading efficiency and drug release profiles were investigated. All experiments were performed with 5-Fluorouracil (5-FU) drug. Drug loading performance of 5-FU at the HAp-GEL and HAp-CTS biocomposites were determined in deionized water, phosphate buffer solution (PBS) and HCl solution. To determine of drug loading and drug release performance of the samples, UV spectrophotometer was used. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and particle size analyses were performed to characterize the produced biocomposites.

Keywords: Biocomposite, Hydroxyapatite, Drug Release, Drug Loading, Gelatin, Chitosan

1. Giriş

Hidroksiapatit (HAp), klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılan, dişlerin mine ve dentin tabakasında bulunan kalsiyum fosfat esaslı bir madde olup ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), toksik etki göstermemesi ve biyouyumluluğu sayesinde biyoseramik malzeme olarak kabul edilmektedir. HAp'in bir diğer özelliği ise ulaşılabilir ve kolay üretilebilir olmasıdır (Best vd.,2008; Kalita ve Bhardwaja, 2007; Hench, 1991). HAp gözenekli yapısı nedeniyle alan/hacim oranı oldukça yüksek bir biyoseramiktir. Sert dokularla direk olarak bağ kuran HAp, yapısındaki gözenekler sayesinde, kanın ve diğer vücut sıvılarının kemiğe ulaşmasını ve hücrelerin gözeneklerin içine doğru büyümesinden kaynaklı, dokuların implanta geçmesini sağlar (Best vd.,2008; Kalita ve Bhardwaja, 2007; Hench, 1991; Murugan ve Ramakrishna, 2005). Hidroksiapatit, yapay kemik olarak çeşitli protezlerin yapımında, kemiklerdeki kırık ve çatlak onarılmasında ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında, çene kemiğinin güçlendirilmesi ve stabilizasyonda, protez kalp kapakçıklarında, omurilik füzyonu ve tümör ameliyatından sonra kemik dolgu maddelerinde ve ayrıca, kromatografide, nükleik asit, protein ve antikörlerin ayrıştırılmasında adsorban olarak kullanılmaktadır(Hench,1991) Hidroksiapatit sentezinde yaş kimyasal, hidrotermal, katı hal esaslı reaksiyonlar, sol-jel gibi yöntemler kullanılmaktadır. Orto-fosforik asit ve kalsiyum hidroksitten başlayarak çöktürme yöntemi ile HAp taneciklerini sentezlemiş, bu yöntemin sonunda yüksek saflıkta, stokiyostride ve termal kararlılıkta son ürün elde etmişlerdir (Afshar vd., 2002). Siddharthan ve diğ., kalsiyum nitrat ve amonyum hidrojen fosfattan başlayarak çöktürme metoduyla elde ettiği çökeltiyi mikrodalgada çeşitli işlemlere tabi tutarak HAp taneciklerinin sentezini yapmışlardır. Mikrodalga prosesi hızlı büyüme, ince tanecik büyüklüğü ve dar tanecik büyüklüğü dağılımı sağlama yönünden avantajlı olduğu

görülmüş, bu çalışmanın sonucu hammaddelerin çözelti içinde dağılımında artış gözlemlenmiştir (Siddharthan vd., 2006). Yapılan başka bir çalışmada, mikrodalga prosesiyle birlikte beta-glikoz, kalsiyum nitrat ve fosforik asitten başlayarak sırasıyla çöktürme yöntemi ile HAp taneciklerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Ancak bu yöntemde yüksek sıcaklığın dezavantaj oluşturduğu anlaşılmıştır (Yanga vd., 2004). Santos vd. (2004) farklı sulu çöktürme prosesleri ve farklı deney koşullarında HAp sentezini gerçekleştirmişler ve bu uygulanmanın %25 oranında daha ucuz olduğunu gözlemlenmişlerdir. Yüksek pH ve sıcaklıklarda CaCl_2 ve K_2HPO_4 karışımından hareketle çöktürme yöntemiyle stokiyostride HAp sentezlemiş, bu çalışmanın da yüksek ısı işlem gerektirdiği için dezavantajlı olduğu anlaşılmıştır (Lopez-Macipe vd., 1998). Verwilghen vd. (2008) stokiyostride oranda kalsiyum karbonat ve mono-amonyum fosfattan HAp elde etmişlerdir. Bu yöntemin diğer proseslere göre avantajlı yönleri sulu karıştırma ortamında, çevre basıncında ve 60°C 'de gerçekleştirilmesidir. Kalsiyum nitrat hidrat ve amonyum hidrojen fosfat çözeltilerinden başlayarak çöktürme prosesiyle HAp eldesi ve HAp tozlarına ısı işlem uygulanması üzerinde yapılan çalışma sonucunda, sıcaklığın artışıyla birlikte HAp kristalizasyon derecesinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Fakat bu işlem, $1200-1400^\circ\text{C}$ arasında HAp fazı oksi-apatit fazına bozunduğu için dezavantajlıdır (Mobasherpour vd., 2007). Sinterleme sıcaklığının düşürülmesi ve nano boyutta HAp partiküllerinin eldesi üzerine yapılan çalışma sonucunda HAp seramiklerin teorik yoğunluklarına ulaşabildikleri fakat başlangıç partiküllerinin sahip olduğu nano-kristalinitenin kayb olduğu gözlemlenmiştir (Çakmak, 2015; Fomin vd., 2008). Liu vd. (2004) uygun yüzey aktif madde varlığında, düşük sıcaklıkta Ca-HAp nano-iplikleri sentezlemişlerdir. Bu yöntem yüksek basınç ve sıcaklığa, inert gaza ve kompleks

cihazlara gerek duyulmadığından avantajlıdır. Bu işlem sonucunda mükemmel hegzagonal kristal yapısına sahip, safsızlık içermeyen, ipliksi morfolojiye sahip HAp sentezlenmiştir. Doğrudan çöktürme yöntemiyle hızlı bir şekilde HAp nano-şeritleri sentezinin gerçekleştirildiği yöntem ise, çöktürme prosesinin verimini arttırmış ve reaksiyonun hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamıştır. İşlemin sonucunda yüksek saflıkta ürün elde edilmiştir (Arami, 2008). Başka bir çalışmada nano-kristalin HAp parçacıklarını katı fazda kalsiyum klorür ve sodyum fosfattan başlayarak mikrodalga ile kısa sürede sentezlemişlerdir (Parhi, vd., 2004). Bu işlemde mikrodalga ışınımının enerji dönüşümünü ve ısı yayılımını etkili bir şekilde sağladığı gözlemlenmiştir (Hasret, 2010). Sistemik olarak antibiyotik ile gerçekleştirilen tedavilerin istenmeyen yan etkileri ve yüksek maliyetli olması sebebi ile, ilaç yüklü kompozit malzemeler ile yapılan kontrollü ilaç salınımı çalışmaları önem kazanmıştır (Xiao, 2009). Biyomalzemeler ile yapılan ilaç salım çalışmalarında, ilaç salımının, malzemenin gözenekliliği ve geçirgenliği ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir. Kemik inorganik fazının yapısına oldukça benzer gözenekli bir yapıya sahip olması HAp'i ilaç yüklemesi için tercih edilen bir malzeme haline getirmiştir (Stigter vd., 2004). Hidroksiapatitin mekanik yapısının getirdiği dezavantajlar, polimer bir malzeme (jelatin, kitosan) ile kompozit halinde kullanımı ile azaltılabilmektedir (Lopez-Macipe vd., 1998; Verwilghen vd., 2008; Mobasherpour vd., 2007). Jelatin, kemik, deri ve tendon içeren hayvan bağ dokularının birincil protein bileşeni olan kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen yüksek moleküler ağırlıklı bir polipeptittir. Asidik ve bazik prosesler ile A tipi ve B tipi jelatin oluşturulabilmektedir. Kıvam arttırıcı, jelleştirici, yapıştırıcı gibi özellikleri vardır. Jelatin yapısında yüksek oranda glisin, prolin, alanin, hidroksprolin ve glutamik asit gibi amino asitler bulunur (Gomez-Guillen

vd., 2011). Kitosan, proteinler, lipitler ve bazı biyoaktif maddeler ile bağlanabilir ve negatif yüklü polimerlerle matris oluşturabilir. Vücuttaki hiyalüronik asit, mukopolisakkaritler gibi önemli fonksiyonel karbohidratlarla uyumludur (Wang vd., 2005; Rampine vd., 2013; Janes vd., 2001). Biyoparçalanabilir özellikte olması nedeniyle medikal ve tıbbi açıdan birçok kullanım alanlarına sahiptir. Yara bandı yapımında kullanılan kitosan, ayrıca yara tedavisini hızlandırmak amacıyla sargı bezi yapımında ve kan pıhtılaştırıcı özelliğe ile de yapay böbrek zarı yapımında kullanılmaktadır (Guang, 2002; El-Tahlawy vd., 2005). Florouracil; FU veya 5-FU olarak da bilinen, kanser tedavisinde diğer kanser ilaçları ve radyoterapi ile kombine edilebilen bir kemoterapi ilacıdır. Sıklıkla cilt kanseri, kolon kanseri ve mide kanseri tedavisinde kullanılır (Olukman vd., 2012). 5-FU'nun vücuda alınması için genellikle enjeksiyon ve enfüzyon yolları tercih ediliyor olsa da, ilacın hızlı emilimi ve toksik karakterde olması sindirimsel, sinirsel, dermatolojik ve kalbi etkileyen yan etkilere sebep olmaktadır. Tedavi edici özelliği maksimuma çıkarmakla birlikte yan etkileri minimum seviyeye indirmek için kontrollü 5-FU salımı ile, doğal ve sentetik polimerler kullanarak enkapsülasyon uygulanması üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Kitosan (Ganguly vd., 2011), jelatin (Peng vd., 2012), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) (Ashwanikumar vd., 2014), poly(d,l-lactide) (PLA) (Sastre vd., 2007), poly(methylidene malonate 2.1.2) (PMM)(Fournier vd., 2004) ve pektin (Dutta ve Sahu, 20012) 5-FU yüklenerek ilaç salımı incelenen polimerlerden bazılarıdır. Bununla birlikte, 5-FU yüklü HAp/PLGA (Lin vd., 2012), jelatin/kitosan (Zhau vd., 2012) gibi kompozit malzemeler ile yapılan kontrollü ilaç salım çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışma kompozit malzemeler ile ilaç yükleme ve salım çalışmalarının devamı olup, önceki çalışmada SBF ortamında kütlece farklı HAp/GEL kompozit

malzemelerin çöktürme yöntemiyle üretimi yapılmış, 5-FU ilaç yüklemi işlemi daha sonra püskürtmeli kurutucuda (enkapsülasyon) gerçekleştirilmiş, ilaç yükleme verimi ve ilaç salımı incelenmiştir (Kahraman, 2017). Bu çalışmada, SBF (Simulated Body Fluid) ortamında HAp/GEL ve HAP/CTS biyokompozit malzemelerin yaş çöktürme yöntemiyle üretimi sırasında 5-FU ilaç yükleme işlemi de birlikte (co-precipitation) gerçekleştirilmiştir. Biyokompozit malzemelerin sentezi öncesinde Ca(OH)₂ tarafına direkt olarak 5-FU ilacı ilave edilmiş, ağırlıkça 1:1 oranında HAp/GEL ve HAP/CTS ilaç yüklü kompozitler üretilmiştir. Sonraki aşamada, jelatin ve kitosanın 37°C'de çözünür olması nedeni ile her iki kompozit için de iki farklı Gluteraldehit (GA) oranı ile (hacimce %2 ve %5) çapraz bağlama yapılmıştır. Son aşamada, üretilen biyokompozitler ile farklı GA oranının ilaç yükleme verimi ve PBS (Phosphate Buffer Solution) ortamında ilaç salım profilleri incelenmiştir. Kompozitlerin karakterizasyonu için XRD, SEM, FTIR, TGA ve partikül boyutu analizleri yapılmıştır.

2. İlaç Yükleme ve İlaç Salımı

Kompozit malzemeye 5-FU ilaç yükleme işlemi püskürtmeli kurutucuda (Kahraman, 2017) veya bu çalışmada uygulanan ve birlikte çöktürme yöntemi olarak da tanımlanan (Teseng vd., 2015) yaş çöktürme yöntemiyle kompozit malzemenin üretimi sırasında gerçekleştirilmektedir. Etkin kanser tedavisi için kullanılan 5-FU dozlarının insan vücudunda toksik etkiye sebep olması ve hızlı yarılanma süresi, ilacın taşıyıcı malzemeye yüklenmesi ve sonrasında kontrollü salım çalışmalarının önem kazanmasına neden olmuştur. İlaç taşıyıcı bir malzeme kullanılarak, ilacın uygulanması sonrasında ani 5-FU salımının engellenmesi ve salımın istenen bölgede gerçekleşmesini sağlamak, buna bağlı olarak da yan etkileri azaltmak mümkündür. Literatürde 5-FU yüklü organik ve inorganik malzemeler ile

birlikte çeşitli kompozitlerin kullanıldığı ilaç salım çalışmaları bulunmaktadır. Santos vd. (2009) püskürtmeli kurutucu kullanarak 5-FU yüklü HAp nano parçacıkları elde etmiş ve PBS ortamında ilaç salım profilini incelemişlerdir. Elde edilen parçacıkların XRD karakterizasyonu sonucunda HAp ve 5-FU kristallerinin varlığı doğrulanmış, ancak kurutucuda yüksek sıcaklıklara (180°C) çıkılması durumunda HAp yapısında değişim ve 5-FU'da bozunma gerçekleştiği gözlemlenmiştir. İlaç salımına bakıldığında, salınan ilaç miktarı yüklenen ilaç miktarına çok yakın değerde elde edilmiş, bu nedenle HAp'ın 5-FU için uygun bir taşıyıcı olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, salım profilinde ani bir pik gözlenerek tüm ilacın 5 dakika içerisinde salınması, yalnızca HAp'ın taşıyıcı ortam olarak 5-FU'nun kontrollü salımı için yeterli olmadığını göstermektedir. Peng vd. (2012) su/yağ emülsiyon yöntemi ile 5-FU yüklü jelatin mikrokürecikleri elde ederek ilaç salım profilini incelemişlerdir. Gluteraldehit (GA) ile çaprazlama yapılarak çözünür bir polimer olan jelatine sabit bir yapı kazandırılması ve 5-FU salımının yavaşlatılması amaçlanmıştır. İlaç salım profiline bakıldığında, GA konsantrasyonu arttırıldıkça ilk 30 dakika içerisinde ilk aşamada gerçekleşen ani salım miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. GA miktarından bağımsız olarak ilk bir saat içerisinde ilaç miktarının %40-70 oranında salımı gerçekleşmiştir ve her koşulda iki fazlı salım profili ortaya çıkmıştır. GA miktarında olduğu gibi çapraz bağlama süresinin arttırılması da ilk salım miktarını azaltmıştır. Çapraz bağlama ajanı miktarı ve süresi değiştirilerek 5-FU salım hızının kontrol edilebildiği görülmektedir. 5-FU yüklü HAp/PLGA, GEL/kitosan gibi kompozit malzemelerin ilaç salım çalışmaları bulunmaktadır. Lin vd. (2012) HAp/PLGA 5-FU yüklü kompozit mikrokürecik üretimi yaparak ilaç yükleme verimi ve ilaç salım profilini incelemişlerdir. Değişen HAp/PLGA oranları dikkate alındığında, artan HAp oranı ile ilk ani salımın azaldığı

gözlemlenmiştir. HAp'ın ani salımını sınırlayıcı özellik göstermesi, doz aşımının önüne geçilmesine fayda sağlayacağından, HAp/PLGA kompozitinin 5-FU taşıyıcı ortam olarak avantajlı olacağı sonucuna varılmıştır. İlaç salım profili, tercih edilen şekilde düşük bir ani salımı takiben sıfır derece salım ile iki fazlı olarak görülmüştür. Yalnızca 5-FU yüklü PLGA parçacıkları ile yapılan çalışmalarda görülen ve ani ilaç salımına bağlı yan etkilere sebep olan üç fazlı salımın profili, HAp eklenmesi durumunda istenen iki fazlı profile yaklaşmıştır. HAp/PLGA oranı artışı ilk ani ilaç salımını azaltırken, ilaç salım hızını arttırmıştır. Bu durum, polimer yapı içerisinde yer alan HAp'ın poroziteyi arttırarak ve polar yapısına bağlı olarak mikrokürecikler içerisine su girişini kolaylaştırarak polimer bozunumunu hızlandırması, buna bağlı olarak ilaç salımının hızlanması şeklinde yorumlanmıştır. Zhou vd. (2012) 5-FU yüklü GEL/kitosan mikrokürecikleri elde ederek ve çapraz bağlama ajanı olarak GA kullanarak ilaç yükleme profilini incelemiştir. Peng vd. (2012) nolu kaynak çalışmasında olduğu gibi, çapraz bağlama ajanı miktarı arttırıldığında, ilk ani salım oranının azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, çapraz bağlama ajanının arttırılmasıyla birlikte ilaç salım hızında da artış olmuştur. Farklı 5-FU dozları ile çalışıldığında, artan 5-FU yükleme miktarı ile beraber ilk ani salım ve salım hızının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, mikrokürecikler içerisinde daha fazla boş alan olmasının 5-FU moleküllerinin taşınımını yavaşlatıyor olduğu şeklinde açıklanmıştır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde, salım profili genel olarak ilk ani salımı takiben ufak değişimler ile sabite yakın konsantrasyonda devam eden salım şeklinde olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ilaç konsantrasyonunun MIC (Minimum Inhibition Concentration) altında

seyretmesi durumunda, implantların çevresinde bakteri oluşumu olabildiği gözlenmiştir. Ani ilaç konsantrasyonu artışları yan etkilere sebep olabildiğinden, ideal ilaç salımı sisteminde ilaç konsantrasyonu MIC değeri üzerinde olmalıdır. Literatürde farklı ilaç yüklü kompozit malzemelerin salım profilinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır (Xiao vd., 2009; Kim vd., 2005).

2.1. İlaç Salım Kinetiği

İlaç salım mekanizması, ilaç taşıyıcı maddenin gözenek boyutu, şekil, bağlanabilirlik, ilaç/taşıyıcı etkileşimi, ilaç/polimer etkileşimi, polimer bozunma hızı gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu nedenle, kullanım öncesi salım mekanizmasının belirlenmesi önem taşımaktadır (Dutta ve Sahu, 2012; Santos vd., 2009). Salım kinetiğinin belirlenmesi amacı ile kullanılan matematik modeller, ilaç difüzyon katsayısı gibi önemli fiziksel parametrelerin belirlenmesine olanak sağlamakla birlikte, salım prosesinin optimizasyonunun yapılmasına katkıda bulunmaktadır (Suvakanta vd., 2010). Laboratuvar ortamında ilaç salım mekanizmasının (in vitro) belirlenmesi, fosfat tampon çözeltisi (PBS) veya yapay vücut sıvısı (SBF) ortamında alınan ölçümler ile yapılabilmektedir. Salım süresince ortam sıvısı vücut sıcaklığında (37°C) tutulmaktadır. Canlı içerisinde gerçekleşen ilaç salım profilini tahmin etmek amacı ile laboratuvar ortamında elde edilen verilerin modellenmesi için kullanılan farklı yöntemler bulunmaktadır (Kahraman, 2017; Suvakanta vd., 2010). Bu çalışmada, ilaç salım profillerinin en yakın olduğu modeli belirlemek amacı ile sıfır derece, birinci derece ve Higuchi olmak üzere üç farklı kinetik model ile salım profili oluşturulmuştur.

Sıfır derece modeli: Belirli dozlarda ilacın çözünerek yavaşça salınımı Denklem 2.1 ile

$$Q_0 - Q_t = K_0 t \quad 2.1$$

Denklem 2.1'in düzenlenmesi ile denklem 2.2 elde edilmektedir.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad 2.2$$

ifade edilebilmektedir.

Q_t : t zamanında çözünen ilaç miktarı

Q₀ : Başlangıçta çözeltide bulunan ilaç miktarı (genellikle, Q₀=0)

K₀ : Sıfır derece salınım katsayısı (konsantrasyon/zaman)

Elde edilen birikimli ilaç miktarlarının zamana karşı grafiğinin çizilmesi ile salınım profili oluşturulmaktadır.

Birinci derece modeli: Birinci derece salınım kinetiğine sahip ilaç salınımı verilen denklem 2.3 ile ifade edilebilmektedir.

$$\frac{dC}{dt} = -Kc \quad 2.3$$

$$\log C = \log C_0 - Kt / 2.303$$

C₀ : Başlangıç ilaç konsantrasyonu

K : Birinci derece hız sabiti (t-1)

T : Zaman

Birikimli ilaç konsantrasyonu yüzdelerinin logaritma değerlerinin zamana karşı grafiğinin çizilmesi ile -K/2.303 eğimine sahip bir doğru elde edilmektedir.

Higuchi modeli: Bir matris sisteminden gerçekleşen ilaç salınımını tanımlamayı amaçlayan ilk matematik model, 1961 yılında Higuchi tarafından ileri sürülmüştür. Başlangıçta düzlemsel sistemler için tasarlanmış olsa da, ilerleyen zamanlarda farklı geometrik ve gözenekli sistemlere de uygulanmıştır. Model eşitliği denklem 2.4'te verilmiştir.

$$f_t = Q = A \sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \quad 2.4$$

Q : t zamanında birim yüzey alanından salınan ilaç miktarı

A : İlaç taşıyıcı yüzey alanı

D : Matris içerisindeki ilaç difüzyon katsayısı

C_s : Matris içerisindeki ilaç çözünürlüğü

C : Matris içerisindeki başlangıç ilaç konsantrasyonu

Higuchi modeli; matris içerisindeki başlangıç ilaç konsantrasyonunun ilaç çözünürlüğünden çok yüksek olması, ilaç difüzyonunun tek boyutta gerçekleşmesi, ilaç parçacıklarının sistemin kalınlığından küçük olması, matris şişmesi ve bozunmasının ihmal edilebilir olması, ilaç yayılma katsayısının sabit olması, salınım ortamı içerisine tam batırılmanın gerçekleşmiş olması hipotezlerine dayanmaktadır. Higuchi modeli genellikle denklem 2.5'te verilen basitleştirilmiş hali ile kullanılmaktadır. KH, Higuchi çözünme katsayısını ifade etmektedir. Elde edilen veriler, birikimli % ilaç salınım miktarına karşı zamanın karekökü olarak grafik haline getirilmektedir.

$$f_t = Q = K_H \times t^{1/2} \dots\dots\dots$$

Hidroksiapatit, kemik yenilenmesini sağlamak amacı ile doku aşılama ve implant malzemesi üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat yapısındaki HAp üzerine bağlanabilme özelliğine sahip ilaçlar ile yapılan çalışmalarda, implantların kemik

yenilenmesine ek olarak ilaç taşıma fonksiyonuna da sahip olabileceği, bu şekilde kontrollü ve hedeflenen bölgelere ilaç taşınımı sağlanabileceği görülmüştür (Kahraman, 2017; Suvakanta vd., 2010, Jain vd., 2016, Singhvi vd., 2011).

3. Materyal ve Metot

3.1. Kullanılan Kimyasallar

HAp-GEL ve HAp-CTS kompozitleri üretimi aşamasında kullanılan ; jelatin, kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂, 96%), orto fosforik asit (H₃PO₄, 85%), K₂HPO₄, KH₂PO₄ ve glutraldehit, HCl (37%), Merck (Almanya) ; kitosan ve 5-Fluorouracil Sigma-Aldrich (UK) ; NaOH (97%) Riedel-de Haen (USA) firmalarında temin edilmiştir.

SBF : SBF çözeltisi hazırlama aşamasında kullanılacak olan beher, magnet, vb. ekipmanlar sterilizasyon amacı ile bir gece süresince seyreltik HCl çözeltisinde bekletilmiştir. Hazırlama aşamasında cam beher, mezur vb. kullanılmamasına dikkat edilmiştir. 750 mL deiyonize su 1000 mL'lik beher içerisine alınmış, manyetik karıştırıcıya yerleştirilmiş ve 37°C'de karıştırmaya bırakılmıştır. Gerekli kimyasallar (Kahraman, 2017), sırasıyla beher içerisine eklenmiş, herbir kimyasal eklendikten sonra çözünmesi için bir süre beklenmiştir. Çözelti sıcaklığı 37°C'ye ulaştıktan sonra yaklaşık olarak 7.5 olan pH, 1 M HCl yardımı ile 7.4 değerine ayarlanmıştır. Beherin ağzı kapatılarak bir gece süre ile bekleme bırakılmış, çökelti bulunmaması durumunda 1000 mL'lik polipropilen balonjojeye aktarılarak deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Glutraldehit (GA) çözeltisi: Hacimce %2'lik GA ve %5'lik GA çözeltisi için 50 mL'lik balonjojelere sırasıyla 1 mL ve 2,5 mL GA konulmuş ve distile suyla tamamlanmıştır.

Sodyum bisülfid çözeltisi: Hacimce %3'lük çözelti için 3 mL sodyum bisülfid 100 mL'lik balonjojeye alınarak distile su ile tamamlanmıştır.

1M HCl çözeltisi: pH ayarı için kullanılmak üzere %37'lik 83.4 mL HCl çözeltisi alınarak balonjoje içerisinde 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

1M NaOH çözeltisi: pH ayarı için kullanılmak üzere 40 g NaOH tartılarak 1000 mL'lik balonjoje içerisine alınmış ve deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Fosfat tampon çözeltisi (PBS): pH 7.4 için 0.1 M PBS hazırlanması durumunda öncelikle 0.5 L 1M K₂HPO₄ çözeltisi ve 0.5 L 1M KH₂PO₄ çözeltisi hazırlanmıştır. 1M K₂HPO₄ hazırlamak için 87.09 g K₂HPO₄, 1 M KH₂PO₄ hazırlamak için 68.045 g KH₂PO₄ tartılmış ve her ikisi de 500 mL'lik balonjojelere alınarak deiyonize su ile tamamlanmıştır. 0.1 M PBS hazırlamak için 0.5 L 1 M K₂HPO₄ çözeltisinden 80.2 mL, 0.5 L 1 M KH₂PO₄ çözeltisinden 19.8 mL alınmış ve 1000 mL'lik balonjoje içerisinde deiyonize su ile tamamlanmıştır.

3.2. SBF Varlığında Biyokompozit Malzeme (Hap-GEL / Hap-CTS) Üretimi

Hidroksiapatit çökeltisi eşitlik 3.1'in gerçekleşmesi sonucu çözeltide oluşmaktadır.

$10 \text{ Ca(OH)}_2 + 6 \text{ H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 18 \text{ H}_2\text{O}$ 3.1

1:1 HAp-GEL veya HAp-CTS üretimi için; iki ayrı plastik behere 200'er mL SBF çözeltisi konulmuş ve mekanik karıştırıcılara yerleştirilmiştir. Bir behere Ca(OH)_2 ve 20 mg 5-FU, diğer behere ise H_3PO_4 ve jelatin, diğer kompozit üretiminde kitosan ilave edilmiştir. Her iki beherdeki çözeltiler 37°C 'de 1 saat boyunca 400 rpm'de karıştırılmıştır. 1 saat karıştırma sonunda peristaltik pompa ile H_3PO_4 -SBF-GEL veya H_3PO_4 -SBF-CTS karışımı, Ca(OH)_2 -SBF-5-FU karışımı içerisine 5 mL dak^{-1} debi ile beslenmiştir. Besleme süresince çözeltinin pH ölçümü yapılmış, gerekli olduğunda HCl veya NaOH çözeltisi ilavesi ile pH değerinin 7.4'de sabit olması sağlanmıştır. Çöktürme boyunca pH düşüşü gözlenmiştir. Besleme tamamlandıktan sonra, çözelti 2 saat

3.3. Kalibrasyon Eğrisini Hazırlanması

10 mg ilaç tartılarak bir beher içerisinde 100 mL distile suya ilave edilmiştir. Bir süre karıştırıldıktan sonra, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ve 5.0 mL çözelti 25 mL'lik balonjeler içerisine alınarak distile su ile tamamlanmıştır. Elde edilen seyreltilmiş çözeltilerin absorbans değerleri UV spektrofotometre ile 266 nm dalga boyunda ölçülmüştür. UV cihazı okuma öncesi öncelikle ölçüm yapılacak çözelti ile kalibre edilmiş, her numune için okumadaki doğruluk oranının yüksek olması için 5 ölçüm yapılmış ve ortalamaları alınmıştır (Kahraman, 2017). Aynı işlem PBS ve HCl içerisinde de tekrarlanmış ve üç çözücü için kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

3.4. Hap-GEL Ve Hap-CTS Numuneleri İlaç Yükleme Verimi Ölçümü

50 mg HAp-GEL numunesi tartılarak bir beher içerisine alınan 50 mL suda, 37°C ve 250 rpm'de iki saat süre ile karıştırılmıştır. Bu süre sonunda, çözeltilerden 1 mL alınarak bir balonjoje içerisinde 25 mL'ye seyreltilmiştir. Seyreltilen çözeltinin absorbans değeri UV spektrofotometrede

karıştırılmış ve sonrasında 24 saat bekletilmiştir. Bekleme sonrası çapraz bağlama ajanı olan hacimce %2 veya %5 GA çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 600 rpm'de 3 saat boyunca karıştırılmış, daha sonra süzölmüş, çökelti sırayla %3'lük sodyum bisülfid çözeltisi ve distile su ile yıkanarak reaksiyona girmemiş olan glutaraldehitin (GA) giderilmesi sağlanmıştır (Azami vd., 2010; Chang vd., 2006; Li vd., 2013). Çökelti kuruması için 40°C 'de 24 saat etüvde (Mimmert, Almanya) bekletilmiştir. Çalışmada UV spektrofotometre (JENWAY 6305, UK) kullanılarak 5-FU içeren çözeltilerin 266 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. İlaç yükleme verimi hesaplamalarında, 5-FU/su, 5-FU/HCl ve 5-FU/PBS çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır (Kahraman, 2017).

kalibrasyon eğrisinin hazırlandığı cihaz şartlarında okunmuş, kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak numune içerisindeki ilaç konsantrasyonu belirlenmiş ve aynı işlem adımları HAp-CTS numunesi için tekrarlanmıştır. Daha sonra ilaç yükleme verimleri HAp-GEL ve HAp-CTS 5-FU ilaç yüklü kompozitler için su yerine çözücü olarak PBS ve HCl kullanılarak tespit edilmiştir. Su ve PBS kullanılması durumunda çözelti 37°C 'ye ısıtılırken, HCl kullanılması durumunda herhangi bir ısıtma işlemi yapılmamıştır (Kahraman, 2017).

3.5. PBS Ortamında İlaç Salım Deneyleri

12 mg ilaç yüklü HAp-GEL numunesi tartılarak 20 mL PBS içeren tüplere eklenmiş ve tüpler, su banyosunda 37°C ve 200 rpm'de karıştırmaya bırakılmıştır. 5, 10, 15, 30, 45. dakikalarda ve 1, 2, 3, 5. saatlerde 10 mL alınarak santrifüjlenmiş, süzöntü kısmından 5 mL alınarak 25 mL'ye seyreltilmiştir. Tüplere 10 mL taze PBS çözeltisi eklenmiştir. Seyreltilmiş çözeltilerin absorbans değerleri, ilaç yüklemede olduğu gibi kalibrasyonu tamamlanmış UV spektrofotometre ile 266 nm dalga boyunda

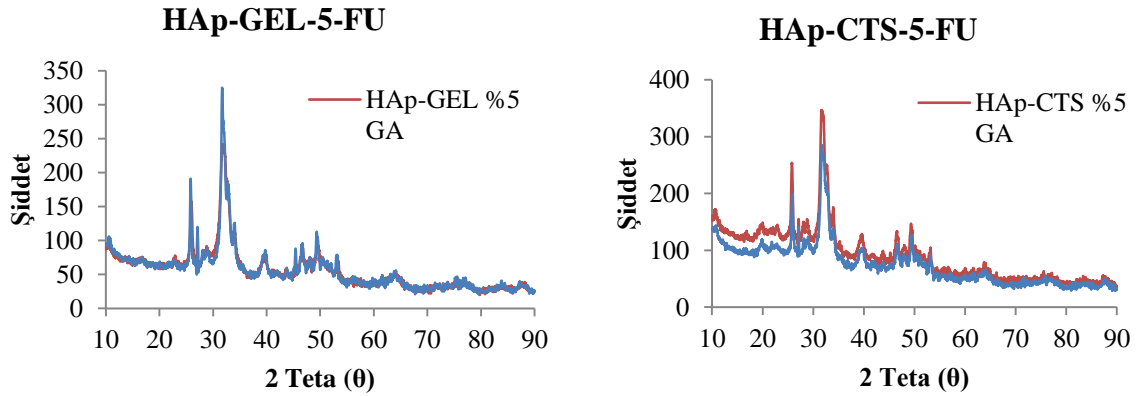
okunmuştur. Elde edilen absorpsiyon değerleri ile salınan kümülatif ilaç miktarları hesaplanmış, sıfır derece, birinci derece ve Higuchi kinetik modellerine göre salım profilleri oluşturulmuştur.

4. Bulgular

Hazırlanan biyokompozit malzemelerin karakterizasyonu için XRD, SEM ve FTIR, TGA ve partikül boyutu analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1. XRD Analiz Sonuçları

Numunelerin XRD analizleri (Bruker D8 Advance X-Ray Diffractometer, Almanya) Şekil 1’de görülmektedir. Çapraz bağlayıcı ajan GA ile sentezlenen %2 ve %5 oranlarında (1:1) HAp-GEL ve HAp-CTS biyokompozitlerinin XRD analizlerinin tümünde HAp faz varlığı doğrulanmıştır ve farklı bir kalsiyum fosfat fazına rastlanmamıştır.



Şekil 1. %2 GA ve %5 GA ile sentezlenen 5-FU yüklü HAp-GEL ve HAp-CTS biyokompozitlerinin XRD desenleri.

HAp-GEL kompozitlerinde, karakteristik HAp pikleri varlığı 2 teta (θ) açısında 25°, 31°, 39°, 45°, 46° ve 50° derecelerindeki pikler ile doğrulanmıştır. Her iki kompozitte de benzer eğilimlerin görülmesine rağmen, %2 GA ile hazırlanan HAp-GEL kompoziti piklerinde hafif bir yükselme gerçekleşmiştir. Daha önce yapılan çalışmada (Kahraman, 2017), GA miktarı fazla olan kompozitlerde jelatin miktarının daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, bir başka çalışmada jelatin eklenmesinin HAp kristalleri büyümesini baskıladığı ve XRD pik şiddetlerinde azalmaya sebep olduğu sonucuna varılmıştır (Chang vd., 2006). Benzer şekilde, %5 GA ile hazırlanan HAp-GEL kompozitinin %2 GA ile hazırlanan kompozite kıyasla daha fazla jelatin miktarına sahip olduğu ve Şekil 1’de görülen daha düşük şiddetteki XRD piklerinin oluşmasına sebep olduğu yorumu yapılabilir. Diğer yandan, 2 teta (θ) açısında 31° derecede görülen pikler aynı zamanda 5-

FU’ya ait karakteristik piklerdendir ve 5-FU ile HAp piklerinin örtüşmüş olması mümkündür (Özbaş ve Gürdağ, 2016). Buna bağlı olarak, HAp-GEL %2 GA kompozitlerindeki yüksek şiddetli piklerin HAp-GEL %5 GA kompozitlerine kıyasla daha fazla 5-FU bulunması sonucu oluştuğu yorumu yapılabilir. HAp-CTS kompozitlerinde HAp fazı varlığı 2 teta (θ) açısında 25°, 31°, 39°, 46°, 49° ve 51° derecedeki pikler ile doğrulanmıştır. Li vd. (2013) HAp-CTS kompozitleri ile yaptıkları çalışmalarda jelatine benzer olarak GA oranı arttıkça kitosanın karakteristik pikinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda, belirgin bir fark olmamakla birlikte GA oranı arttıkça karakteristik piklerin şiddetinde artış görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, bir balık cinsinden ekstarkte edilen kitinden elde edilen kitosana ait XRD analizinde, 2 teta (θ) açısında 25.85°, 31.92°, 46.74° ve 49.46° derecede şiddetli pikler görülmüştür (Kumari

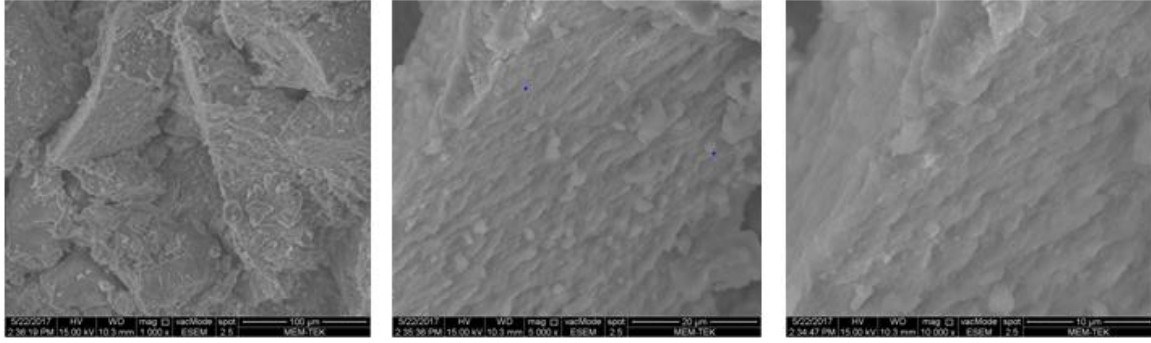
ve diğ., 2015). HAp fazı ve kitosan piklerinin çakıştığı düşünülürse, GA oranı arttıkça pik şiddetlerinin artması, TGA analizi ile doğrulandığı gibi GA oranı arttıkça kitosan

miktarının artmış olması ile açıklanabilir. Genel olarak Şekil 1'e bakıldığında, GA oranı değişiminin kristalleşme boyutuna belirgin bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

4.2. SEM Analiz Sonuçları

Çapraz bağlayıcı ajanı GA ile %2 ve %5 oranlarında sentezlenen, 5-FU ilacı yüklü HAp-GEL ve HAp-CTS (1:1)

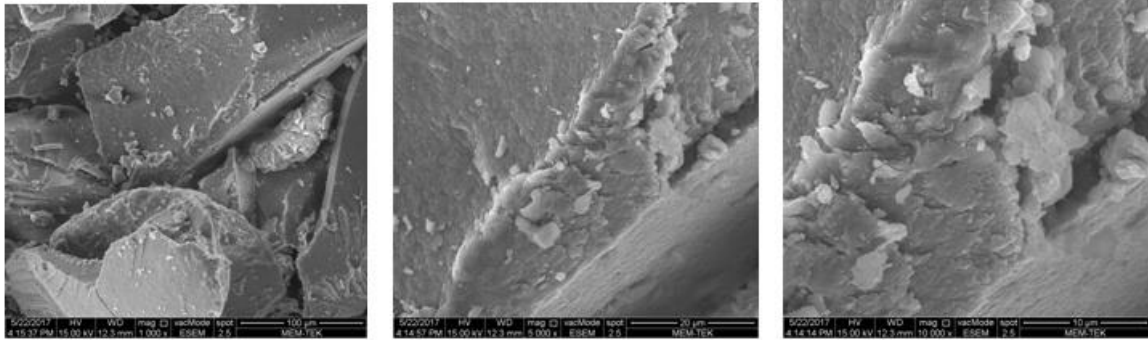
biyokompozitlerinin SEM görüntüleri (Quanta FEG 250, USA) sırasıyla Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4 ve Şekil 5'te görülmektedir



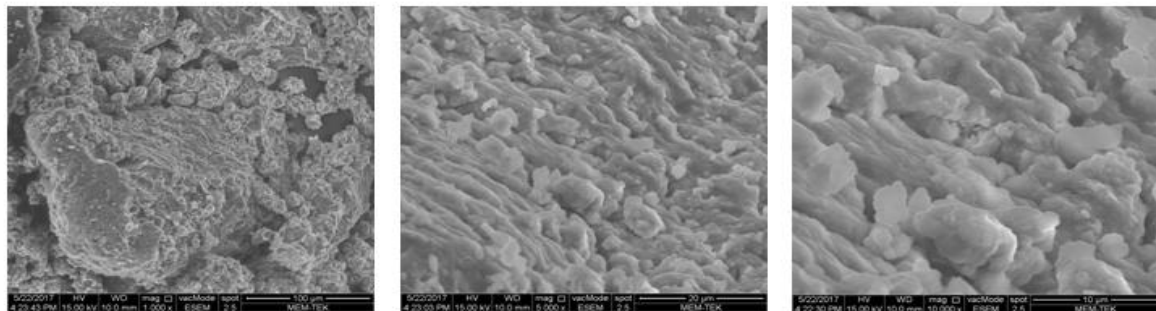
Şekil 2. %2 GA ile sentezlenen HAp-GEL (1:1) biyokompozitinin SEM görüntüsü (1000-5000-10000 büyütme).

Tüm kompozitlerde birbirine bağlı ve gözenekli bir yapı iskelesinin var olduğu görülmekte, ancak düzenli bir tanecik boyutu dağılımı görülmemektedir (Narbat vd., 2006). Şekil 2 ve Şekil 3'e bakıldığında, jelatinin morfolojisine benzer olarak

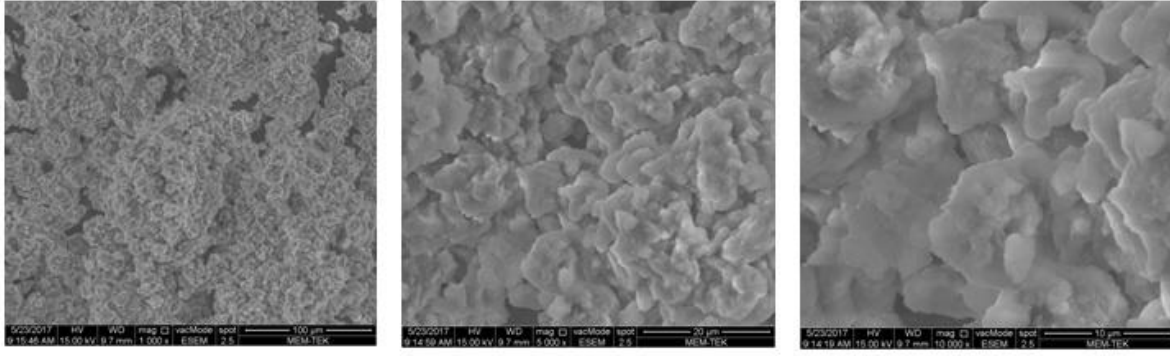
biyokompozit malzemenin laminar bir yapıya sahip olduğu, GA miktarı artırıldığında yapıda daha belirgin taneciklerin ve katmanlı bir yapının oluştuğu görülmektedir (Chang vd., 2006; Liu vd., 2013; Narbat vd., 2006; Sahoo vd., 2013).



Şekil 3. % 5 GA ile sentezlenen HAp-GEL (1:1) biyokompozitinin SEM görüntüsü (1000-5000-10000 büyütme).



Şekil 4. %2 GA ile sentezlenen HAp-CTS (1:1) biyokompozitinin SEM görüntüsü (1000-5000-10000 büyütme).



Şekil 5. %5 GA ile sentezlenen HAp-CTS (1:1) biyokompozitinin SEM görüntüsü (1000-5000-10000 büyütme).

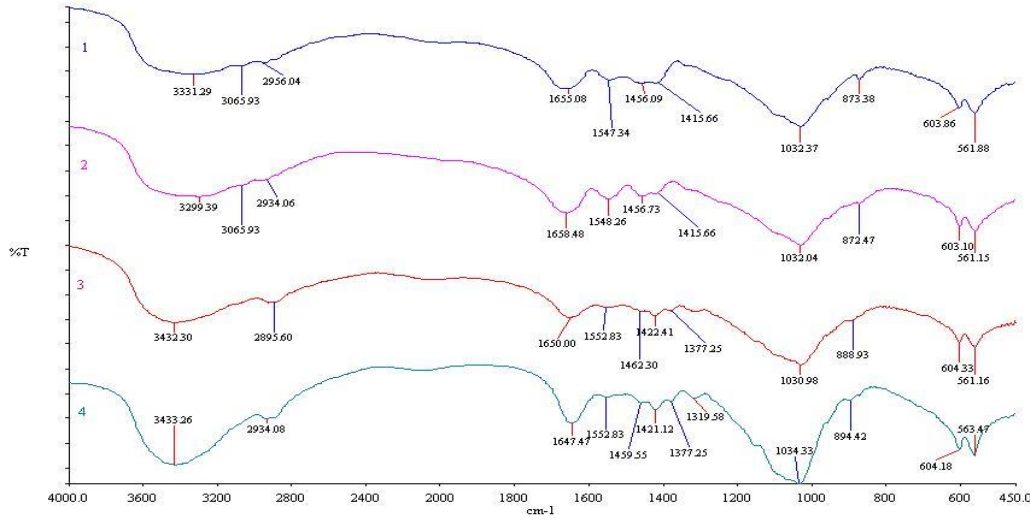
Bu durum GA miktarının artırılmasıyla birlikte, yapıda tutulan jelatin oranının artması şeklinde açıklanabilir. Şekil 4 ve Şekil 5 incelenecek olursa, dağınık yapıda bulunan HAp-CTS biyokompozitinin GA miktarı artırıldığında daha fazla çaprazlanma gerçekleştiğinden aglomerasyonunun arttığı ve daha pürüzsüz yüzeyli mikrokürelerin

oluştugu görülmektedir. Ayrıca yüzeylerin homojenliği arttığı, yapıda daha bireysel polimerler olduğu gözlenmektedir (Sahoo vd., 2013). Bunun nedeni, çapraz bağlama ajanı miktarının artırılmasıyla birlikte kompozit malzemede tutulan kitosan oranının artması şeklinde açıklanabilir.

4.3. FTIR Analiz Sonuçları

Yaş çöktürme yöntemi ile 1:1 oranında sentezlenen biyokompozit malzemelerin FTIR analizleri (Shimadzu, Japonya) Şekil 6'da görülmektedir. FTIR analizlerine bakıldığında 1030 cm^{-1} dalga boyunda güçlü bir pik ve 1300 cm^{-1} ile 1700 cm^{-1} dalga boyları arasında ve 2900 cm^{-1} ile 3500 cm^{-1} dalga boyları arasında daha küçük pikler gözlenmiştir. Sionkowska vd. (2005)'e göre; 3352 cm^{-1} 'deki pikler -OH, 2932 cm^{-1} 'deki pikler $-\text{CH}_2$ ve 2890 cm^{-1} 'deki pikler ise $-\text{CH}_3$ alifatik gruplarını, 1563 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} ve 1414 cm^{-1} deki pikler ise amino gruplarını temsil etmektedir. Rehman ve Bonfield (1997) çalışmalarına göre, hidroksiapatit molekülleri 1000 cm^{-1} civarındaki dalga sayıları fosfat bağlarını, 1400 cm^{-1} ve 800 cm^{-1} dalga sayıları karbonat bağlarını temsil etmektedir. Buna göre FTIR analizindeki piklerden; her dört kompozitte de 1030 cm^{-1} civarında en güçlü pik görüldüğünden, PO_4 bandı yer almaktadır. $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen bantlar O-H esnemesine bağlı olup karakteristik HAp piklerindedir. Biyokompozit malzeme olarak jelatinin kullanıldığı durumda iki O-H esnemesi

görülür. Kompozitlerdeki GA yüzdeleri arttıkça yapıda tutulan jelatin ve kitosan oranı arttığından O-H esneme bantlarının şiddetinin arttığı belirlenmiştir. 2900 cm^{-1} civarında CH_2 ve 2895 cm^{-1} 'deki %2 GA içeren kitosanlı biyokompozitte ise CH_3 alifatik grupları yer almaktadır. $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen bantlar amit - I, $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen bantlar ise amit - II bantlarıdır. Kompozitlerdeki jelatin ve kitosan oranı arttıkça, amit bantları şiddetinin de arttığı görülmektedir. Buna bağlı olarak, jelatin ve kitosan oranı arttıkça kompozitlerdeki organik-inorganik etkileşimin de arttığı söylenebilir. 1400 cm^{-1} civarındaki bantlar CO_3 iyonları kaynaklıdır. CO_3 bantlarının iki pike bölünmüş şekilde olduğu görülmektedir. 800 cm^{-1} civarındaki bantlar da CO_3 iyonları varlığını belirtir. GA oranının artmasıyla CO_3 piklerinin şiddeti de artmaktadır. $561\text{-}604\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki P-O esnemeleri HAp kristallerinde bulunan PO_4 varlığındandır.

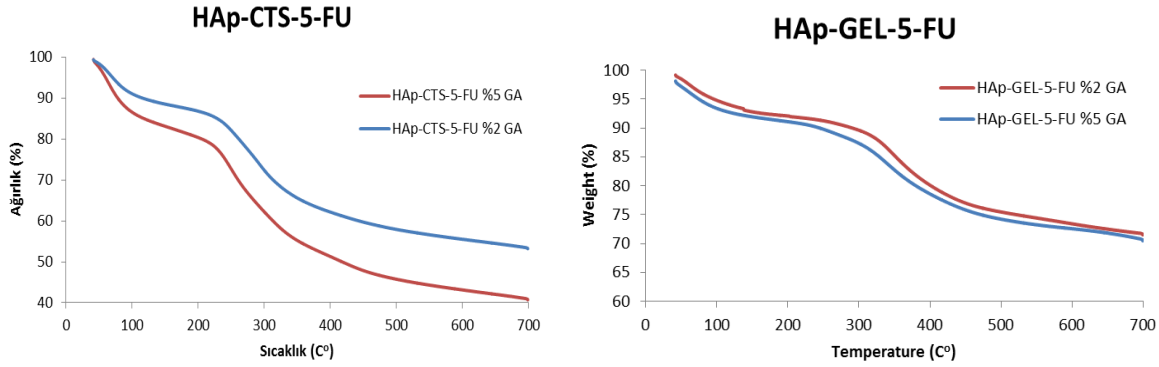


Şekil 6. Biyokompozitlerin karşılaştırmalı FTIR spektrumları 1. %2 GA içeren HAp-GEL (1:1), 2. %5 GA içeren HAp-GEL (1:1), 3. %2 GA içeren HAp-CTS (1:1), 4. %5 GA içeren HAp-CTS (1:1).

4.4. TGA Analiz Sonuçları

HAp-GEL ve HAp-CTS kompozitlerine ait TGA grafikleri (TA SDT Q600, Almanya) Şekil 7’de görülmektedir. Analizler,

10°C/dakika yakma hızı ile 25-700°C aralığında yapılmıştır.



Şekil 7. HAp-GEL ve HAp-CTS kompozitlerine ait TGA analizi sonuçları.

Şekil 7’de görüldüğü gibi HAp-GEL kompozitleri içerisinde bulunan jelatin fazı kademeli olarak bozunmuştur. 50-90°C etrafında gerçekleşen ilk kütle kaybı, kompozitlerdeki nemin buharlaşması ile açıklanabilir. Yaklaşık olarak 300°C’ye kadar azalan bir hızla bozunma devam ederken, 300°C-400 °C aralığında jelatin moleküllerinin pirolizi sonucu kütle kaybı gerçekleşmiştir. Sıcaklık 700°C’ye çıkarıldığında yalnızca kompozitlerdeki inorganik HAp fazı bozunmamış olarak kalmıştır. Her iki HAp-GEL kompozitinde

de bulunan jelatin oranı yaklaşık %30 olarak belirlenmiştir (Bera vd., 2008). HAp-CTS kompozitlerinde 100°C’ye kadar kompozitler üzerindeki nemin giderilmesine bağlı kütle kaybı gerçekleşmiştir. 250°C’ye ulaşıldığında kompozitler içerisindeki kitosanın bozunması başlamış ve 450°C yakınlarında tamamlanmıştır (Kumar ve Koh, 2012). HAp-CTS %5 GA kompozitindeki kitosan oranının yaklaşık %60, HAp-CTS %2 GA kompozitindeki kitosan oranının ise yaklaşık %55 olduğu belirlenmiştir.

4.5. Partikül Boyutu Analiz Sonuçları

Kompozitlerin Malvern Instruments, analizleri ölçüm sonuçları Tablo 1.'de Mastersizer 2000 (UK) model cihazda gösterilmiştir. gerçekleştirilen partikül boyut dağılımı

Tablo 1. Kompozit partikül boyut dağılımları.

Kompozit	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)	Ortalama boyut (µm)
HAp-GEL %2 GA 1:1	49.526	203.057	348.599	204.485
HAp-GEL %5 GA 1:1	65.420	209.134	873.932	311.888
HAp-CTS %2 GA 1:1	68.427	189.573	335.684	195.985
HAp-CTS %5 GA 1:1	56.761	124.776	308.812	150.730

Kompozitlerin ortalama partikül boyutları boyutunda artış, buna karşın HAp-CTS 150.730 µm ile 204.485 µm arasında kompozitinde glutraldehit artışının ortalama değişmektedir. Partikül boyut analizlerine partikül boyutunda azalma meydana getirdiği bağlı olarak glutraldehit oranı artışının gözlemlenmiştir. En yüksek partikül boyutu HAp-GEL kompozitinde ortalama partikül %5 GA içeren HAp-GEL kompozitinde görülmüştür.

4.6. İlaç Yükleme Verimi ve İlaç Salım Deneyleri

4.6.1. İlaç Yükleme Verimi

Yaş çöktürme yöntemiyle ilaç yüklenen HAp-GEL ve HAp-CTS kompozitlerine ait UV spektrofotometrede (JENWAY 6305, UK) ölçülen ilaç yükleme verimleri (%) Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. İlaç yükleme verimi sonuçları (%).

Kompozit malzeme	Su (%)	HCl (%)	PBS (%)
HAp-GEL, %2 GA 1:1	14	37	18
HAp-GEL, %5 GA 1:1	2	17	12
HAp-CTS, %2 GA 1:1	9	31	20
HAp-CTS, %5 GA 1:1	7	16	14

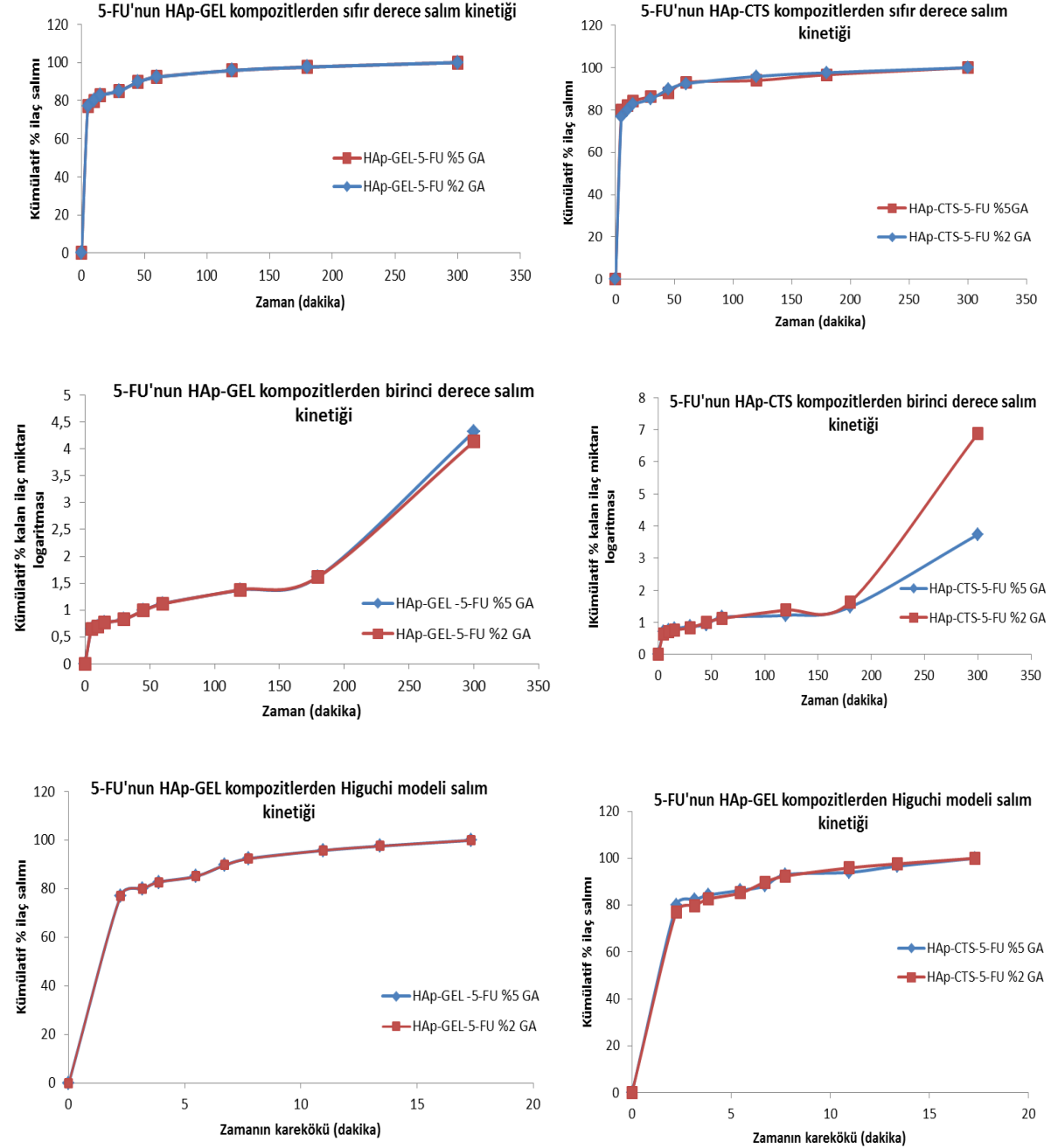
İlaç yükleme verimlerinin genel olarak asidik ortamda en yüksek olduğu görülmüştür. Bunun sebebi jelatin, kitosan gibi polimerlerin asidik ortamda daha fazla bozunması gösterilebilir. Glutraldehit miktarı arttıkça ilaç yükleme verimi azalmıştır. Deney koşullarında ideal GA miktarının %2 olduğu görülmüştür. Polimer olarak jelatinin seçilmesi durumunda daha yüksek verimler elde edilmiştir. Su ve PBS ortamlarında ilaç yükleme veriminin düşük olmasının sebebi yüklenen ilacın bir bölümünün kompozit içinden kalmış olması şeklinde tanımlanabilir. En yüksek verim %2 GA içeren HAp-GEL kompozitinde elde

edilmiştir. Bu çalışmada 5-FU ilacı kompozit malzemenin sentez aşamasında ilave edilmiştir. Hidroksiapatit-kitosan kompozit malzeme kullanarak püskürtmeli kurutucu ile ilaç yüklemesinin yapıldığı çalışmada, ilaç yükleme veriminin daha yüksek olduğu görülmüştür (Kahraman, 2017; Başargan vd., 2017). Bunun sebebi püskürtmeli kurutucularda elde edilen daha küçük boyutlu mikroparçacıkların daha homojen bir şekilde dağılıyor olması ile açıklanabilmektedir. İlacın homojen dağılması ile ilaç SBF çözeltisine daha fazla geçmiş ve yüksek verim elde edilmiştir (Kahraman, 2017; Başargan vd., 2016a). Polimer ortamda ilaç

yükleme verimini; ilacın yüklendiği ortam, pH, sistemin hidrofilik veya hidrofobik karakterde olması, ilacın çözünürlüğü, ilacın dağılımı etkilemektedir. Eğer sistem hidrofilikse ilacın büyük çoğunluğu su içerisinde kalmakta ve yükleme veriminin düşük çıkmasına neden olabilmektedir (Kahraman, 2017; Misra ve Shahiwala, 2014; Alhalafı, 2017; Başargan vd., 2016b).

4.6.2. İlaç Salım Deneyleri

Kompozitlerin sentezi sırasında ilave edilerek birlikte çöktürme yöntemi ile 5-FU yüklenen HAp- GEL ve HAp-CTS kompozitlerinin salım profilleri Sıfır Derece, Birinci Derece ve Higuchi kinetik modeli olmak üzere üç farklı kinetik modele göre oluşturulmuştur. Kinetik modellere ait karşılaştırmalı grafikler Şekil 8'de görülmektedir.



Şekil 8. HAp-GEL ve HAp-CTS biyokompozitlerine ait ilaç salım profilleri.

Şekil 8’de sıfır derece salım kinetiğine ait grafiklerde görüldüğü gibi, HAp-GEL kompozitleri içerisindeki ilacın %80’i ilk 10 dakika içerisinde salınmıştır. Farklı miktarlarda GA ile hazırlanan kompozitler için ilaç salım profilinde belirgin bir fark görülmemiştir. HAp-CTS kompozitlerine bakıldığında, %2 GA ile hazırlanan kompozite yüklü ilacın ilk 10 dakika içerisinde %77’sinin salındığı, %5 GA ile hazırlanan kompozite yüklü ilacın ise %80’inin 10 dakika içerisinde salındığı görülmektedir. Şekil 7’de görülen TGA analizleri sonucunda, HAp-CTS %5 GA kompozitlerinin HAp-CTS %2 GA kompozitine göre daha fazla miktarda kitosan içerdiği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda,

HAp-polimer kompozitlerinde artan polimer miktarlarında ilaç salım profillerindeki ilk ani salımın artabildiği görülmüştür (Lin vd., 2012). Bu nedenle, HAp-CTS %5 GA kompozitindeki yüksek kitosan oranının ilk ani salımın artmasına yol açtığı yorumu yapılabilir. Tüm HAp-GEL ve HAp-CTS kompozitleri için en yüksek korelasyon katsayıları (R^2) Higuchi Modelinde görülmüş ve salımın Higuchi kinetik modeline uygun şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, ilaç salımının zamanın kareköküne bağlı olarak değişim gösterdiği ve difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Elhassan, 2017, Gouda vd., 2017). Kompozitlere ait korelasyon katsayıları Tablo 3’te görülmektedir.

Tablo 3. Kinetik modellere ait korelasyon katsayısı (R^2) değerleri.

Kompozit Malzeme	Kinetik Model		
	Sıfır Derece	Birinci Derece	Higuchi
HAp-GEL, %5 GA	0.7486	0.8887	0.9070
HAp-GEL, %2 GA	0.7495	0.8965	0.9078
HAp-CTS, %5 GA	0.8135	0.8717	0.9390
HAp-CTS, %2 GA	0.7435	0.8038	0.9038

5. Sonuç ve Tartışma

Bu çalışmada SBF ortamında HAp-GEL ve HAp-CTS biyokompozitinin farklı konsantrasyonlarda çapraz bağlama ajanı GA kullanılarak yaş çöktürme yöntemiyle üretimi yapılmış, 5-FU ilacının kompozitlerin üretimi aşamasında direkt ilave edilmesinin ilaç yükleme verimine olan etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, sentezlenen biyokompozitlerde en yüksek ilaç yükleme veriminin çapraz bağlama ajanı olarak %2 GA içeren HAp-GEL (1:1) malzemede olduğu görülmüştür. 5-FU ilacının biyokompozit malzeme hazırlama aşamasında direkt ilave edildiği bu çalışmanın sonucu, püskürtmeli kurutucu kullanılarak ilaç yüklemesi yapılan başka bir çalışma ile karşılaştırıldığında, püskürtmeli

kurutucu ile daha etkili ilaç yüklemesi yapılabildiği görülmüştür. XRD analizlerinde; biyokompozitlerde hidroksiapatit faz varlığı doğrulanmıştır. GA konsantrasyon değişiminin karakteristik piklerin şiddetinde önemli bir farklılığa neden olmadığı görülmüştür. Buna bağlı olarak kristalleşme boyutuna etkisinin çok fazla olmadığı belirlenmiştir. SEM analizi sonucunda, ilaç yüklü HAp-GEL ve HAp-CTS taneciklerinin elde edildiği görülmüştür. Düzenli bir partikül boyutu dağılımı olmadığı, GA oranı arttıkça polimerlerin daha görülür hale geldiği tespit edilmiştir. Partikül boyutu analiziyle paralel olarak jelatin ile elde edilen kompozitlerde, GA artışı ile partikül boyutu artmış, kitosan ile elde edilen kompozitlerde ise GA artışı ile partikül boyutu azalarak daha düzenli ve homojen bir yapı oluşmuştur.

FTIR analizi sonucunda, HAp oluşumu ve hidroksiapatit ile jelatin veya kitosan arasındaki organik-inorganik etkileşimler belirlenmiştir. Yapıda var olan esnemelere, bağlara ve iyonlara karar verilmiştir. İlaç yükleme işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamak için 5-FU yüklü numunelerin karakteristik pikleri tespit edilmiştir. TGA analizi ile HAp-CTS kompozitlerindeki kitosan oranının GA miktarı arttıkça arttığı, HAp-GEL kompozitlerinde ise GA değişimi ile kompozitlerdeki jelatin miktarında belirgin bir fark oluşmadığı görülmüştür. İlaç salım çalışmaları sonucunda, tüm kompozitlerde ilaç salımının ilk 10 dakika içerisinde tamamlandığı görülmüştür. HAp-GEL kompozitlerinde GA artışı ile salım profilinde değişiklik gözlenmezken, HAp-CTS kompozitlerinde GA oranı arttıkça ilk ani salımın arttığı görülmüştür. Tüm kompozitlerde en yüksek korelasyon katsayısı Higuchi kinetik modelinde elde edilmiştir ve kompozitlerden ilaç salımının zamanın karekökü ile değişim gösteren difüzyona bağlı prosesler olduğu sonucuna varılmıştır.

6. Kaynaklar

- Afshar, A., Ghorbani, M., Ehsani, N., Saeri, M.R., Sorrell, C.C. 2002. Some Important Factors in the Wet Precipitation Process of Hydroxyapatite. *Materials and Design*, 24, 197–202.
- Alhalafi, A.M. 2017. Applications of Polymers in Intraocular Drug Delivery Systems. *Oman Journal of Ophthalmology*, 10(1), 3-8.
- Arami, H., Mohajerani, M., Mazlounia, M., Khalifehzadeh, R., Laka, A. Sadrnezhad, S.K. 2008. Rapid Formation of Hydroxyapatite Nanostrips Via Microwave Irradiation. *Journal of Alloys and Compounds*, 469, 391–394.
- Ashwanikumar, N., Kumar, N.A., Nair, S.A. ve Kumar, G.S.V. 2014. Dual Drug

Delivery of 5-Fluorouracil (5-FU) and Methotrexate (MTX) through Random Copolymeric Nanomicelles of PLGA and Polyethylenimine Demonstrating Enhanced Cell Uptake and Cytotoxicity. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 122, 520–528.

- Azami, M., Rabiee, M., Mostarzadeh, F. 2010. Glutaraldehyde Crosslinked Gelatin/hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold, Engineered Via Compound Techniques. *Polymer Composites*, 31 (12), 2112-2120.
- Başargan, T., Erdol Aydın, N., Nasun-Saygılı, G. 2017. Hydroxyapatite-chitosan Biocomposites Synthesized in the Simulated Body Fluid and Their Drug Loading Studies. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 28, 180 (10).
- Başargan, T., Erdol Aydın, N., Nasun-Saygılı, G. 2016a. In Situ Biomimetic Synthesis to Produce Hydroxyapatite-polyvinyl Alcohol Biocomposites: Precipitation and Spray Drying Methods. *Polymer-plastic Technology and Engineering*, 55(5), 447-452.
- Başargan, T., Erdol-Aydın, N., Nasun-Saygılı, G. 2016b. Spray Dried Hydroxyapatite-polyvinyl Alcohol Biocomposites, De Gruyter. *Journal of Polymer Engineering*, 36(8), 795-804.
- Bera, T., Vivek, A.N., Saraf, S.K., Ramachandrarao, P. 2008. Characterization of Biomimetically Synthesized Hap-Gel Nanocomposites as Bone Substitute. *Biomedical Materials*, 3.
- Best, S.M., Porter, A. E., Thian E.S. ve Huang, J. 2008. Bioceramics : Past, Present and for the Future. *Journal of the European Ceramic Society*, 28(7), 1319-1327.
- Chang, M.C., Douglas, W.H. ve Tanaka, J. 2006. Organic-inorganic Interaction and the Growth Mechanism of Hydroxyapatite Crystals in Gelatin Matrices between 37 and 80°C. *Journal of Materials Science*, 17, 387-396.
- Çakmak, S. 2015. Kemik Doku Onarımı için Hidroksiapatit/Peptit Amfifil Bazlı

- Nanokompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilimdalı, Ankara, 4-34.
- Dutta, R.K., Sahu, S. 2012. Development of a Novel Probe Sonication Assisted Enhanced Loading of 5-FU in SPION Encapsulated Pectin Nanocarriers for Magnetic Targeted Drug Delivery System. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82, 58–65.
- Elhassan, G.O. 2017. Design and Evaluation of Controlled Release Matrix Tablet of Aspirin by Using Hydrophobic Polymer. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*, 6(4), 32-41.
- El-Tahlawy, K.F., El-bendary, M.A., Elhendawy, A.G., Hudson, S.M. 2005. The Antimicrobial Activity of Cotton Fabrics Treated with Different Crosslinking Agents and Chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 60, 421-430.
- Fomin, A.S., Barinov, S., Ievlev, V.M., Smirnov, V.V., Mikhailov, B.P., Belonogov, E.K., Drozdova, N.A. 2008. Nanocrystalline Hydroxyapatite Ceramics Produced by Low-Temperature Sintering After High-pressure Treatment. *Chemical Technology*, 418(3), 352–355.
- Fournier, E., Passirani, C., Colin, N., Breton, P., Sagodira, S., Benoit, J. 2004. Development of Novel 5-FU-loaded Poly(methylidene malonate 2.1.2)-based Microspheres for the Treatment of Brain Cancers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 189–197.
- Ganguly, K., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. 2011. Colon targeting of 5-Fluorouracil Using Polyethylene Glycol Cross-linked chitosan Microspheres Enteric Coated with Cellulose Acetate Phthalate, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 11797–11807.
- Gomez-Guillen, M.C., Gimenez, B., Caballero, M., Montero, M.P. 2011. Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin from Alternative Sources: A Review, *Biochemical Journal*, 25(8), 1813-1827.
- Gouda, R., Baishya, H., Qing, Zhao 2017. Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. *Journal of Developing Drugs*, 6(2).
- Guang, W.Y. 2002. The effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk. Ph.D. Thesis, Hong Kong Polytechnic University.
- Hasret, E. 2010. Hidroksiapatit Sentezi, Karakterizasyonu ve Adsorban Özelliğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 10-22.
- Hench, L. 1991. Bioceramics from Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7), 1487-1510.
- Jain, A., Jain, S.K. 2016. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight. *Chemistry and Physics of Lipids*, 201, 28-40.
- Janes, K.A., Calvo, P., Alonso, M.J. 2001. Polysaccharide Colloidal Particles as Delivery Systems for Macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 83- 97.
- Kahraman, E. 2017. SBF Ortamında Üretilen Hidroksiapatit-Jelatin Kompozit Malzemelerin İlaç Salım Performansının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ-Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kalita, S.J., Bhardwaja, A. 2007. Nanocrystalline Calcium Phosphate Ceramics in Biomedical Engineering. *Material Science Engineering: C*, 27(3), 441-449.
- Kim, H.W., Knowles, J.C., Kim, H.E. 2005. Porous Scaffolds of Gelatin-Hydroxyapatite Nanocomposites Obtained by biomimetic approach: Characterization and Antibiotic Drug Release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74(2) 686-698.
- Kumar, S., Koh, J. 2012. Physicochemical, Optical and Biological Activity of Chitosan-Chromone Derivative for

- Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6102-6116.
- Kumari, S., Rath, P., Kumar, A.S.H., Tiwari, T.N. 2015. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*, 3, 77-85.
- Li, Y., Liu, T., Zheng, J., Xu, X. 2013. Glutaraldehyde-crosslinked Chitosan/hydroxyapatite Bone Repair Scaffold and Its Application as Drug Carrier for Icaritin. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(3), 1539-1547.
- Lin, Y., Li, Y., Ooi, C.P. 2012. 5-Fluorouracil Encapsulated HA/PLGA Composite Microspheres for Cancer Therapy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2453-2460.
- Liu, Y., Hou, D., Wang, G., 2004. A Simple Wet Chemical Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanorods. *Materials Chemistry and Physics*, 86, 69-73.
- Lopez-Macipe, A., Rodriguez-Clemente, R., Hidalgo-Lopez, A., Arita, I., Garcia-Garduno, M.V., Rivera, E. ve Castano, V.M. 1998. Wet Chemical Synthesis of Hydroxyapatite Particles from Nonstoichiometric Solutions. *Journal of Materials Synthesis and Processing*, 6(1), 21-26.
- Misra, A., Shahiwala, A. 2014. Applications of Polymers in Drug Delivery, *Smithers Rapra*, US, Ch.2, 1-38.
- Mobasherpour, I., Soulati Heshajin, M., Kazemzadeh, A., Zakeri, M. 2007. Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite by Using Precipitation Method. *Journal of Alloys and Compounds*, 430(1-2), 330-333.
- Murugan R. ve Ramakrishna, S.2005. Development of Nanocomposites for Bone Grafting. *Composites Science and Technology*, 65, 2385-2406.
- Narbat, M.K., Orang, F., Hashtjin, M.S., Goudarzi, A. 2006. Fabrication of Porous Hydroxyapatite-gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Iranian Biomedical*, 10 (4), 215-223.
- Olukman, M., Şanlı, O., Solak, E.K. 2012. Release of Anticancer Drug 5-Fluorouracil from Different Ionically Crosslinked Alginate Beads. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, 469-479.
- Özbaş, Z., Gürdağ, G. 2016. Synthesis and Characterization of 5-Fluorouracil-loaded Glutaraldehyde Crosslinked Chitosan Hydrogels. *Journal of Natural and Applied Sciences*, 20(3), 460-467.
- Parhi, P., Ramanan, A., Ray, R. 2004. A Convenient Route for the Synthesis of Hydroxyapatite through a Novel Microwave-mediated Metathesis Reaction. *Materials Letters*, 58, 3610-3612.
- Peng, Z., Li, Z., Shen, Y., 2012, Preparation and in Vitro Characterization of Gelatin Microspheres Containing 5-Fluorouracil. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 51 (6), 1117-1124.
- Rampine, A., Borgogno, M., Blasi, P., Bellich, B., Cesaro, A. 2013. Chitosan Nanoparticles: Preparation, Size Evolution and Stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 219-228.
- Rehman, I., Bonfield, W. 1997. Characterization of Hydroxyapatite and Carbonated Apatite by Photo Acoustic FTIR Spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8, 1-4.
- Sahoo, R., Sahoo, S., Lochan, P. 2013. Synthesis and Characterization of Gelatin-chitosan Nanocomposite to Explore the Possible Use as Drug Delivery Vehicle. *European Scientific Journal*, 9(18), 134-141.
- Santos, C., Rovath, C.F., Franke, R.P., Almeida, M.M., Costa, M.E.V. 2009. Spray-Dried Hydroxyapatite-5-Fluorouracil Granules as a Chemotherapeutic Delivery System. *Ceramics International*, 35, 509-513.

- Santos, M.H., Oliveira, M., Souza, L.F., Mansur, H.S., Vasconcelos, W.L. 2004. Synthesis Control and Characterization of Hydroxyapatite Prepared by Wet Precipitation Process. *Materials Research*, 7(4), 625-630.
- Sastre, R.L., Olmo, R., Teijon, C., Muniz, E., Teijon, J.M. ve Blanco, M.D. 2007. 5-Fluorouracil Plasma Levels and Biodegradation of Subcutaneouslyinjected Drug-loaded Microspheres Prepared by Spray-drying Poly(d,l-lactide) and Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 338, 180–190.
- Siddharthan, A., Seshadri S.K., Sampath Kumar, T.S. 2006 . Influence of Microwave Power on Nanosized Hydroxyapatite Particles. *Scripta Materialia*, 55, 175–178.
- Singhvi, G., Singh, M. 2011. Review: In-vitro Drug Release Characterization Models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 2(1), 77-84.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Vicini, S., Marsano, E. 2005. The Influence of UV Irradiation on the Mechanical Properties of Chitosan/poly(vinyl pyrrolidone) Blends. *Polymer Degradation and Stability*, 88(2) 261-267.
- Stigter, M., Bezemer, J., Groot, K. ve Layrolle, P. 2004. Incorporation of Different Antibiotics into carbonated Hydroxyapatite Coatings on Titanium Implants, Release and Antibiotic Efficacy. *Journal of Controlled Release*, 99, 127–137.
- Suvakanta, D., Murthy, P.N. Nath, L., Chowdhury, P. 2010. Kinetic Model on Drug Release from Controlled drug delivery systems, *Acta Poloniae Pharmaceutica in Drug Research*, 67(3) 217-223.
- Teseng, C., Chen, J., Wu, Y., Fang, H., Lin, F., Tang, T. 2015. Development of Lattice-Inserted 5-Fluorouracil-Hydroxyapatite Nanoparticles as a Chemotherapeutic Delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 30(4), 388-397.
- Wang, S.F., Shen, L., Tong, Y.J., Chen, L., Phang, I.Y., Lim, P.Q., Liu, T.X. 2005. Biopolimer Chitosan/Montmorillonite Nanocomposite: Preparation and Characterization. *Polymer Degradation and Stability*, 9(1), 123-131.
- Verwilghen, C., Chkir, M., Rio, S., Nzihou, A., Sharrock, P., Depelsenaire, G. 2008. Convenient Conversion of Calcium Carbonate to Hydroxyapatite at Ambient Pressure. *Materials Science and Engineering C*, 29, 771-773.
- Xiao, J., Zhu, Y., Liu, Y., Zeng, Y. ve Xu, F. 2009, An asymmetric Coating Composed of Gelatin and Hydroxyapatite for the Delivery of Water Insoluble Drug. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 889–896.
- Yanga, Z., Jianga, Y., Wangb, Y., Maa, L., Lia, F. 2004. Preparation and Thermal Stability Analysis of Hydroxyapatite Derived from the Precipitation Process and Microwave Irradiation Method. *Materials Letters*, 58, 3586-3590.
- Zhou, Z., Liu, L., Liu, Q., Zhao, Y., Xu, G., Tang, A., Zeng, W., Yi, Q. and Zhou, J. 2012, Study on Controlled Release of 5-Fluorouracil from Gelatin/Chitosan Microspheres. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 49(12), 1030-1034.