



## KONTROLLÜ İLAÇ SALIMINDA SİLİMARİN YÜKLÜ ALJİNAT MİKROKAPSÜL VE BONCUKLARININ HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ezgi NAHİRCİ<sup>1</sup>, Esra ÇİNİ<sup>1</sup>, Belgin TUNÇEL KIRKAR<sup>2</sup>, F. Burcu ALP<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup>İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

Anahtar Kelimeler	Öz
<i>Silybum Marianum</i> <i>Silimarin</i> , <i>Aljinat</i> , <i>Enkapsülasyon</i> , <i>Kontrollü İlaç Salımı</i> .	Deve dikenini ( <i>Silybum marianum</i> ) tohumuna çözücü ile ekstraksiyon yöntemi uygulanarak %7,3 verimle silimarin tozu elde edilmiştir. Ekstrakte tozun %57,8 silimarin içerdiği bulunmuştur. Silimarin içeriği dikkate alınarak <i>Silybum marianum</i> tohumunun silimarin içeriği %4,21 olarak bulunmuştur. Ekstrakt ve orjinal silimarin, Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR), Optik Mikroskop, X-ışını kırınımı (XRD) ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Püskürtme ve enjeksiyon yöntemleri ile ekstrakt ve orjinal silimarin tozları aljinat ile enkapsüle edilmiştir. Silimarin enkapsülasyonu sonrasında mikrokapsüllerin tutuklama verimleri %83,14-%91,27 aralığında bulunmuştur. Simüle mide (0,1N HCl) ortamında kümülatif silimarin salımı %13-%71 aralığında, simüle bağırsak (PBS) ortamında kümülatif silimarin salımı %28,3-%82 aralığında hesaplanmıştır. Tüm örneklerde simüle bağırsak (PBS) ortamında daha yüksek silimarin salımı gözlenmiştir. Salım deneyleri sonrasında örneklerin fonksiyonel gruplarındaki değişiklikler FTIR ile belirlenmiştir.

### PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SILYMARIN LOADED ALGINATE MICROCAPSULE AND BEADS IN CONTROLLED DRUG RELEASE

Keywords	Abstract
<i>Silybum Marianum</i> , <i>Silymarin</i> , <i>Alginate</i> , <i>Encapsulation</i> , <i>Controlled Drug Delivery</i> .	Silymarin powder was obtained with 7.3% yield by applying solvent extraction method from milk thistle ( <i>Silybum marianum</i> ) seed. Silymarin content of silybum marianum seed was found to be 4.21% based on the extracted amount. The extract and original silymarin have been characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Optical Microscope, X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscope (SEM). Extract and original silymarin powders were encapsulated with alginate by spraying and injection methods. After silymarin encapsulation, the microcapsule's entrapment efficiency was determined between 83.14% and 91.27%. The cumulative silymarin release in simulated stomach (0.1N HCl) medium was calculated between 13% and 71%, in simulated intestinal (PBS) medium, the cumulative silymarin release was calculated between 28.3% and 82%. Higher silymarin release was observed in simulated intestinal (PBS) medium in all samples. After the release experiments, changes in the functional groups of the samples were determined by FTIR.

#### Alıntı / Cite

Nahirci, E., Çini, E., Kırkar B., Alp B., B. (2021), Kontrollü İlaç Salımında Silimarin Yüklü Aljinat Mikrokapsül ve Boncuklarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 9(2), 561-573.

Yazar Kimliği / Author ID (ORCID Number)	Makale Süreci / Article Process
E. Nahirci, 0000-0003-0046-2953	Başvuru Tarihi / Submission Date
E. Çini, 0000-0001-8963-009X	Revizyon Tarihi / Revision Date
B.Tunçel Kırkar, 0000-0003-3600-0240	Kabul Tarihi / Accepted Date
F. B. Alp, 0000-0002-0380-2020	Yayın Tarihi / Published Date

#### 1. Giriş (Introduction)

Deve dikenini (*Silybum marianum*), Akdeniz bölgesine özgü olup, Isparta'nın Yenişarbademli köyünde bolca bulunur (Doğanoğlu vd.,2006). Meyve ve *Silybum marianum* tohumları bitkinin tıbbi kısmıdır. *Silybum marianum*un aktif

\* İlgili yazar / Corresponding author: burcualp@sdu.edu.tr, +90-246-211-0902

bileşeni, silibinin, izosilibinin, silisristin ve silidianin olmak üzere dört izomerden oluşan bir flavonolignan karışımı olan silimarindir. *Silybum marianum* tohumunun silimarin içeriğine dayalı olarak Yunanistan'da doğal olarak oluşan 30 yabancı popülasyonu değerlendirmek için yapılan çalışmada flavonolignan ve taksifolin içeriğinin yanı sıra %2,31-%7,71 (ortalama %3,31) arasında değişen değerler ile silimarin içeriğinde önemli farklılıklar kaydedilmiştir (Arampatzis vd., 2019). Silimarin, uzun yıllardır karaciğer hastalıkları için organik bir ilaç olarak kullanılmaktadır, kronik karaciğer hastalığının seyrini önemli ölçüde değiştirmemiş olsa da karaciğer enzim seviyelerini düşürdüğü ve anti-enflamatuar ve T hücre modüle edici etkileri gösterdiği bildirilmiştir (Post-White vd., 2007). Silimarin çekirdeğinin içinde betain, trimetilglisin ve esansiyel yağ asitleri gibi bileşenleri de içermektedir. Bu gibi bileşenler silimarinin karaciğer koruyucu ve antienflamatuar etkisine katkı sağlamaktadır (Dixit vd., 2007). Silimarin karaciğerde oluşan toksik maddeleri parçalar ve bu maddelerin atılımını sağlar. Bu atılımı sağlarken dokuları korur ve güçlü bir antioksidan oluşturur. Yapılan bir çalışmada Tip 2 diyabetlilere uygulanan silimarinin hücrede lipoperoksidasyonu azalttığı gözlemlenmiştir (Velussi vd., 1997; Matsuda vd., 2005; Fallah Huseini vd., 2006). Çalışmalar silimarinin ek olarak genomik yaralanmaya karşı koruduğunu ve protein sentezini arttırdığını kanıtlamıştır (Sheela vd., 2013; Serçe vd., 2015). Tıbbi bir bakışta, silimarin ve silibinin sitoproteksiyon ve her şeyden önce hepatoproteksiyon sağlamış olduğu mevcuttur (Rainone, 2005). Silimarinin antioksidan aktivitesini farklı şekillerde de görmek mümkündür. Silimarin serum insülini artırarak antidiyabetik özelliği gösterebilir. Silimarinin pankreas üzerinde etkisini kanıtlamak için çalışmalar yapılmış ve bu çalışmaların sonucunda diyabet tedavisi için bir ilaç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Saller vd., 2012; Matsuda vd., 2005). Alloksanla diyabet oluşturulmuş farelerle yapılan bir çalışmada silimarinin, pankreatik lipit peroksidasyonundaki artışı engellediği gözlemlenmiştir. Bu gözlem sonucunda kan glikozundaki artışı yavaşlattığı sonucuna varılmıştır. Bu etkinin de silimarinin antioksidatif özelliğinden kaynaklanabilir olduğu düşünülmüştür. Bu çalışma da aynı zamanda diyabetli hayvanların karaciğerinde SOD, glutatyon ve GSH-Px aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Huseini vd., 2006). *Silybum marianum* ekstraktını diyabetli hastalara vererek HbA1c ve kan glikoz seviyelerinin azaldığı sonucuna varılmıştır (Matsuda vd., 2005). Silimarin veya silibinin göğüs kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, cilt kanseri, prostat kanseri, rahim ağzı kanseri, mesane kanseri, karaciğer karsinomu ve kolon kanseri üzerindeki olumlu etkileri bildirilmiştir (Karimi vd. 2011). Silimarin ile tedavi, MDA-DNA eklentilerinin ve alfa-fetoprotein, karsinoembriyonik antijen, aminotransferaz, alkalın fosfataz, laktat dehidrojenaz, gamma glutamiltransferaz ve 5'-nükleotidaz gibi hepatoselüler karsinom serum belirteçlerinin oluşumunu önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Ramakrishnan vd. 2007).

Biyoyararlılık gıdada bulunan bileşiğin sindirim sisteminde emilen miktarıdır (Ercan ve El, 2010). Silimarin, suda çözünürlüğü zayıf (0,04mg/mL) olmasına rağmen lipofilik özelliklere sahip değildir (Javed vd., 2011). Silimarin zayıf çözünürlüğü nedeniyle, genellikle bitki çayı yerine kapsül veya tablet şeklinde kullanılır. Oral emilimi yaklaşık % 23-47'dir ve in-vivo zayıf biyoyararlanıma yol açar. Geçmişte devedikeni ile ilgili yapılan tüm klinik denemeler, silimarinin 1200-1500 mg/gün dozlarında güvenliğini ve etkinliğini göstermiştir. Silimarinin tipik oral yetişkin dozu, iki veya üçe bölünmüş dozlarda 240-800 mg/gün'dür. Silimarinin transcutol, etanol, polisorbata 20 ve gliseril monooleat gibi çeşitli diğer çözücüler içindeki çözünürlüğü sırasıyla 350,1 mg/mL, 225,2 mg/mL, 131,3 mg/mL ve 33,2 mg/mL'dir. Fulvonik asitin 15 kata kadar silimarinin çözünürlük ve çözünme özelliğini arttırdığı bildirilmiştir (Javed vd., 2016). Suda çözünürlüğü düşük olan silimarinin emilimi ince bağırsakta olmaktadır. Biyoyararlılığı geliştirmede kullanılan yeni ilaç salım yaklaşımı, tanecik boyutunun nano boyuta getirilmesidir. Tanecik boyutunun 100nm'nin altına düşürülmesi bile daha hızlı çözünme profilinin artırılmasında yardımcı olduğu bildirilmiştir (Beg vd., 2010). Suda zayıf çözünürlüğe sahip farmasötiklerin daha düşük kristallite ve daha küçük boyuta sahip olduklarında daha yüksek çözünme hızı ve biyoyararlanım sergilediğine inanılmaktadır (Zang vd., 2009). Enkapsülasyon işleminde mikro-kapsüller küçük parçacıklar ya da damlacıklar ile çevrilidir. Enkapsülasyon kontrollü ilaç salım uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. İlaçların mide ortamında bozunmasını engelleyerek ince bağırsakta emilimini sağlar (Özbek vd., 2017). Enkapsülasyon için aljinat, hemen hemen tüm kapsülleme yöntemlerine uygun olması, toksik olmaması, kapsüllerinin mekanik olarak dayanıklı ve gözenekliliğinin yüksek olması nedeni ile sıklıkla kullanılmaktadır (Pandey ve Khuller, 2004; El-Sherbiny vd., 2011; Yousefdoost vd., 2019).

Bu çalışmada suda çözünürlüğü zayıf silimarinin biyoyararlılığının artırılması için *silybum marianum* tohumu etanol ile ekstrakte edilerek elde edilen silimarin tozu ve saf silimarin(Sigma-Aldrich) iki farklı enkapsülasyon yöntemleri kullanılarak aljinat ile enkapsüle edilmiştir. Ekstrakt silimarin ve saf silimarinin ve kapsüllenmiş tane boyutunun; tutuklama kapasitesi, simule mide ve bağırsak ortamlarında salımı üzerine etkileri incelenmiştir.

## 2. Kaynak Araştırması (Literature Survey)

Silimarinin suda çözünürlüğünü iyileştirmek ve oral biyoyararlanımını arttırmak için, iki yeni teknik kullanarak silimarin formülasyonları geliştirilmiş bir çalışmada nanokristaller ve fitozomların formülasyonu hazırlanmış, kimyasal ve fiziksel özellikleri incelenmiştir (El Batal vd., 2018). Çözünürlük, ilaç içeriği ve in-vitro çözünme çalışmaları için hazırlanan formülasyonlardan 5 mg silimarine eşdeğer toz numuneler alınmış ve daha sonra

metanol-sudan oluşan 50 mL çözücü sistemi (75:25) içinde çözülmüştür. Ardından 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5'lik seri seyreltmeler metanol-sudan oluşan çözücü sisteminden (75:25) 10 mL'ye tamamlanmıştır. UV-spektrofotometrik analizi 288 nm'de gerçekleştirilmiştir. Her formülasyondaki silimarin konsantrasyonu, silimarin'in kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasından sonra belirlenmiştir. İn vitro salım çalışmaları, dissolüsyon test cihazı kullanılarak nanokristaller ve fitozomlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Toz (5 mg formül içeren) 250 mL çözünme ortamına (0.1N HCL) ilave edilmiş ve cihaz 37°C'de 100 dev/dk.'da çalıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında, 5mL dispersiyon numuneleri çekilmiş ve sabit hacmi (250 mL) korumak için taze çözünme ortamı ilave edilmiştir. Santrifüjlenip filtre edilen örnekler, silimarin yüzdesini belirlemek için 288 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

Gastrik ülserin potansiyel tedavisinde kullanılmak üzere iyonotropik jelleşme yöntemi ile silimarin yüklü kitosan-montmorillonit mikroboncukları formüle etmek ve değerlendirmek için üretilmiştir (Sharma vd., 2018). Formüle edilen mikro boncuklar, boyut, tutma kapasitesi ve in vitro muko-yapışma açısından değerlendirilmiştir. Mikro boncuklardan ilaç salım mekanizmasını anlamak için in vitro ilaç salım verileri çeşitli ilaç salım kinetik modelleri ile uyumu incelenmiştir. Tutma verimini belirlemek için elde edilen 120-150 µm aralığında tane boyutuna sahip mikroboncuklar (10 mg) havanda ezilerek 24 saat kloroform: metanol (10mL) çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra 1000 dev/dk.' da santrifüjlenip silimarin içeriği 290 nm' de dalga boyunda UV- spektrometresi ile süpernatana bakılarak belirlenmiştir. Tutma verimi %75-92 aralığında, boncukların boyutuna göre değişkenlik göstermiştir. Mikroboncukların in vitro ilaç salım deneyleri dissolüsyon test cihazı ile 0,1N HCl içinde 10 saat süreyle 100 dev/dk. karıştırma hızı ve 37°C' de gerçekleştirilmiştir. 0,1 N HCl içeren çözünme ortamı, mide bağırsak sistemi boyunca pH'daki değişikliği uyarmak için kullanılmıştır. Düzenli zaman aralıklarında, numuneler çözünme ortamından çıkarılarak Whatman filtre kâğıdı (0,22 µm) ile süzülümüştür. Absorbans, 290 nm'de UV/görünür spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar kümülatif olarak rapor edilmiştir. Örneklerde %58-%86 aralığında salım gerçekleştiği bildirilmiştir. Hibrit lipozomlarla kapsüllenmiş silimarinin fiziksel kararlılığı ve in-vivo performans açısından değerlendirilmesi yapılmıştır. Bunun sonucunda silimarin hibrit lipozomlar tersinir buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır (Samaligy vd., 2006). Tutma kapasitesi, toplanan filtratın belirli bir hacminin 15,000 rpm'de 1 saat süreyle 4°C'de santrifüjlenip, lipozomlar süpernatandan ayrılarak ve metanol içinde silimarinin maksimum absorpsiyonunun dalga boyu olan 288 nm'de ölçülmesiyle belirlenmiştir. Tutuklama kapasitesi %69 olarak bildirilmiştir. Lipozomdan silimarin salımı için diyaliz membran kullanılmıştır. Salım deneyleri için 50 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH: 7.4) kullanılmıştır. PBS çözeltisinin doyumluk konsantrasyonunun silimarin oranı ise 0,526 mg/mL' dir. 4 mL salım sıvısından alınıp 4mL taze PBS çözeltisi eklenerek 6 saat süresince salım deneyleri yapılmış ve sonuçlar kümülatif olarak rapor edilmiştir. Hibrit lipozomlarla kapsüllenmiş silimarinin 6 saat sonunda salımı %74 olarak rapor edilmiştir.

Etlik piliçlerde CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidan ve hepatoprotektif aktivitelerini iyileştirmek için nanokapsüllenmiş silimarin uygulaması yapılmıştır (Yousefdoost vd., 2019). Kurutulmuş *Silybum marianum* tohumları öğütülerek, 20 gr toz, 300 mL petrol eteri kullanılarak 16 saat süreyle soksetet cihazında yağdan ayrıldı. Yağdan arındırılmış toz daha sonra etanol (300mL) içinde 10 saat süreyle ekstrakte edilip ardından 39°C'de vakumlu kurutucuda etanol buharlaştırılması ile silimarin elde edilmiştir. Silimarinin toplam fenol, toplam flavonoid ve antioksidant içeriğini sırasıyla 3,51; 2,39 ve 75,35 (içerik/aktivite) olarak belirlemişlerdir. Toplam silimarin (mg/kurutulmuş ekstrakt) içeriğini 59,13 bulmuşlardır. Nanokapsüller modifiye emülsiyon/internal jelleşme yöntemiyle hazırlanmıştır. 2 mL sulandırılmış silimarin 8 mL aljinat çözeltisi (%1 w/v) ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 60 mL konola yağı ve 5 gr tween80 içeren mekanik karıştırıcıdaki çözeltiye damla damla ilave edilmiştir. Elde edilen karışım, %62,5 genliğe ve 12 mm prob çapına sahip 20 kHz frekanslı ultrason kullanılarak 25 °C'de 15 dakika süreyle sonikasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra uygun hacimde 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (100mL) çapraz bağlayıcı emülsiyon yüzeyine püskürtülmüş ve 10 dakika boyunca daha karıştırılarak santrifüj ile ayrılmıştır. Elde edilen tanecik boyutunu 169-657 nm aralığında bildirmişlerdir. Fenolik içeren kapsüller, fenol salımı için 90 mL %1'lik sodyum sitrat (pH:6) çözeltisi ile oda sıcaklığında 300 dev/dk.'de sabit çalkalama altında 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra açığa çıkan fenolik bileşikler absorbans okunarak ölçülmüştür. Simule mide sıvısı için 3,2 gr pepsin enzimi ve 2 gr NaCl 1 L deiyonize suda çözünerek 0,1 M HCl ile pH:1,5'a ayarlanmıştır. 0,1 gr ıslak kapsül 9 mL simule gastrik çözeltisinde 60 dk 37°C' de inkübe edilip 30 dk 200 dev/dk.'da santrifüjlenmiştir. Süpernatana toplam fenol tayini için Folin-Ciocalteu metodu ile tayin edilmiştir. Simule bağırsak sıvısı için pankreatin (10 gr/L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,05 mol) ve pH:7 ile karıştırılmış ve bir miktar kimyon 20 mL intestinal suya eklenmiştir. pH: 6,5'e NaOH ile ayarlanıp 37°C'de çalkalanarak 2 saat süresince 30 dakikalık periyotlarda örnek alınarak 1000 dev/dk.'da 15 dk boyunca 4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatana Folin-Ciocalteu metodu ile toplam fenol tayini yapılmıştır. Mide ortamında 1 saatin sonunda %10, bağırsak ortamında ise 2 saat sonunda %92 toplam fenol tayin edilmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntem (Material and Method)

### 2.1 Materyal (Material)

Bu çalışmada *Silybum marianum* tohumu Yenişarbademli köyünden temin edildi. *Silybum marianum* tohumundan yağın uzaklaştırılması için hegzan (Merck), ekstraksiyon işleminde ise Etanol (Merck) kullanılmıştır. Enkapsülasyon için, Na-aljinat (Alfasol), D-manitol (Sigma-Aldrich), orjinal silimarin (Sigma-Aldrich) ve çapraz bağlanma reaksiyonunun gerçekleşmesi için  $\text{CaCl}_2$  (Merck) kullanılmıştır. İlaç salım deneylerinde HCL (Merck), ve fosfat tampon çözeltisi (PBS) hazırlanmasında NaCl (Sigma-Aldrich), KCl (Merck),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (Analiz Kimya)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck) ve  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

### 2.2 Metot (Method)

#### 2.2.1 Silimarin Ekstraksiyonu (Silymarin Extraction)

*Silybum marianum* tohumları 3 gün hava sirkülasyonlu etüvde  $37,5^\circ\text{C}$ 'de kurutulmuş, daha sonra öğütülmüştür. 10 gr öğütülmüş *Silybum marianum* tohumu tartılıp filtre kağıdına paketlenerek sokselet cihazına yerleştirilmiştir. 300 mL hegzan ile işlem görerek *Silybum marianum* tohumunun yağı ayrılmıştır. Kurutulan ve yağı alınmış numune, sokselet cihazında 300 mL etanol ile 4 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyonun sonunda silimarin ve etanol elde edilmiştir. Kurutulmuş silimarin elde etmek için etanolün büyük bir kısmı, vakum altında  $40^\circ\text{C}$ 'de döner buharlaştırıcı (Heldolph-Laborata 4001) kullanılarak uzaklaştırılmış, belirleyici karışıma 50 mL'den fazla damıtılmış su ilave edilerek karışımda kalan etanolün tamamı döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Sulu silimarin buzlukta 24 saat dondurulduktan sonra  $-48,5^\circ\text{C}$  ve 0,08 mbar'da liyofilizatör (Telstar-cryodos) ile kurutulmuştur. Elde edilen sarı renkte kurutulmuş toz ekstrakt tartılıp ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır.

#### 2.2.2 Silimarin Enkapsülasyonu (Silymarin Encapsulation)

Ağırlıkça %2 Na-aljinat ve %2 D-Mannitol (Na-aljinatın çapraz bağlayıcı düzenleyicisi) 100 mL deiyonize su içinde çözünerek aljinat çözeltileri hazırlanmıştır. Tamamen çözünmüş aljinat çözeltisine daha sonra 50/20 mg ekstrakte/veya 50 mg orijinal silimarin eklenmiştir. Enjeksiyon ile enkapsülasyon işlemi için aljinatın çapraz bağlayıcısı olan  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içine (ağırlıkça %2'lik) enjektör kullanılarak damlatılmıştır. Damlacıklar silimarin boncuklarını oluşturmuştur. Çapraz bağlanma reaksiyonunun tamamlanması için 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oluşan boncuklar, filtre edilerek deiyonize su ile yıkanıp bir kısmı hava sirkülasyonlu etüvde kurutulurken bir kısmı da buzlukta 24 saat dondurulup liyofilizatörde kurutulmuştur. Filtrasyon işlemindeki süzüntü ve yıkama suyu tutuklama kapasitesi hesaplamalarında kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Püskürtme ile enkapsülasyon işlemi için silimarin yüklü aljinat çözeltisi boya tabancasından hava kompresörü (3 atm) ile  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içine (ağırlıkça %2'lik) püskürtülmüştür. Yukarıda anlatılan filtrasyon, yıkama ve liyofilizatörde kurutma işlemleri yapılmıştır. Tablo 1.'de hazırlanan örneklerin üretim metodu, örnek kodları ve silimarin içerikleri verilmiştir.

**Tablo 1.** Hazırlanan örneklerin üretim metodu, örnek kodları ve silimarin içerikleri (Production method, sample codes and silymarin contents of the prepared samples).

Örnek Kodu	Üretim Yöntemi	Silimarin Miktarı, [mg]
P-orjinal silimarin		50
P-ekstrakt silimarin-20	Püskürtme	20
P-ekstrakt silimarin		50
E-orjinal silimarin		50
E-ekstrakt silimarin	Enjeksiyon	50

#### 2.2.3 Silimarin Standart Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması (Preparation of Standard Silymarin Calibration Curve)

UV-analizleri, 288 nm dalga boyunda Perkin Elmer Lambda25 spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Önce etanol-su (75:25) sıvı sistemi hazırlanmıştır.  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  (ppm) konsantrasyonunda silimarin stok çözeltisi 5 mg orijinal silymarinin 50 mL etanol-su (75:25) sıvı sistemi içinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Bu stok çözelti kullanılarak 6 farklı standart çözelti (1, 2, 4, 8, 10 ve  $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin absorpsiyon değerleri 288 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Bu veriler kullanılarak silimarinin standart kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Ekstre edilmiş silimarin tozunun silimarin içeriği hesaplanmıştır.

### 2.2.4 Karakterizasyon ( Characterization)

Ekstrakt ve orjinal silimarin tozları ile mikrokapsüllerin fonksiyonel grupları FTIR (Shimadzu FTIR-8400S) spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Spektrumlar KBr peletleri (1,5 mg kurutulmuş toz 150 mg KBr ile karıştırılarak pelet elde etmek için preslenmiştir) ile transmisyon modunda  $4\text{ cm}^{-1}$  çözünürlükte  $4000$  ve  $400\text{ cm}^{-1}$  arasında 32 tarama ile elde edilmiştir. Kristal yapıları XRD (Bruker D8 Advance Twin) cihazı ile ölçülmüştür. X-ışını kırınımı analizi, Ni ile filtrelenmiş Cu-K $\alpha$  radyasyonu kullanarak  $6^\circ\text{dak}^{-1}$  tarama hızında,  $2\theta$  açısı ile  $5$  ile  $70^\circ$  aralığında yapılmıştır.

Kristal boyutları Debye-Scherrer denklemi (Denklem 1) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$L = \frac{K \cdot \lambda}{B \cdot \cos \theta} \quad 1$$

Burada L kristal boyutu(nm), K şekil faktörü (0,9),  $\lambda$  Cu-K $\alpha$  ışımalarının dalga boyu (1,54 nm) ve B  $\theta$  açısındaki maksimum pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliği (radyan) olarak alınmıştır (Pharas vd., 2008).

Morfolojileri optik mikroskop (Olympus BX60) ve örnekler altın kaplama yapılarak SEM (Fei Quanta Feg 250) ile incelenmiştir.

### 2.2.5 İn-Vitro İlaç Salımı (In-Vitro Drug Release)

Liyofilizatörde kurutulan silimarin yüklü örneklerin zamana bağlı salım miktarlarını belirlemek için salım deneyleri yapılmıştır. Deney düzeneği simule mide ve bağırsak olmak üzere iki farklı ortam için hazırlanmıştır. Simule mide ortamı için gastritik sıvı 1000 mL 0,1 N HCl stok çözeltisi hazırlanmıştır. Simule bağırsak ortamı için yine 1000 mL PBS (pH=7,4) stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Silimarin yüklü örneklerden 0,1 gram tartılarak 100 mL 0,1N HCl çözeltisine eklenmiştir. Çözeltiler oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda çok düşük hızda karıştırılarak 6 saat süresince belirli zaman aralıklarında 4 mL örnek alınıp 4 mL taze 0,1N HCl çözeltisi eklenerek tekrar 100 mL'ye tamamlanmıştır. Alınan örnekler santrifüjlenip, süpernatant ayrılıp UV analizi için bekletilmiştir. Yukarıda anlatıldığı şekilde PBS çözeltisi ortamında da aynı işlemler tekrar edilmiştir.

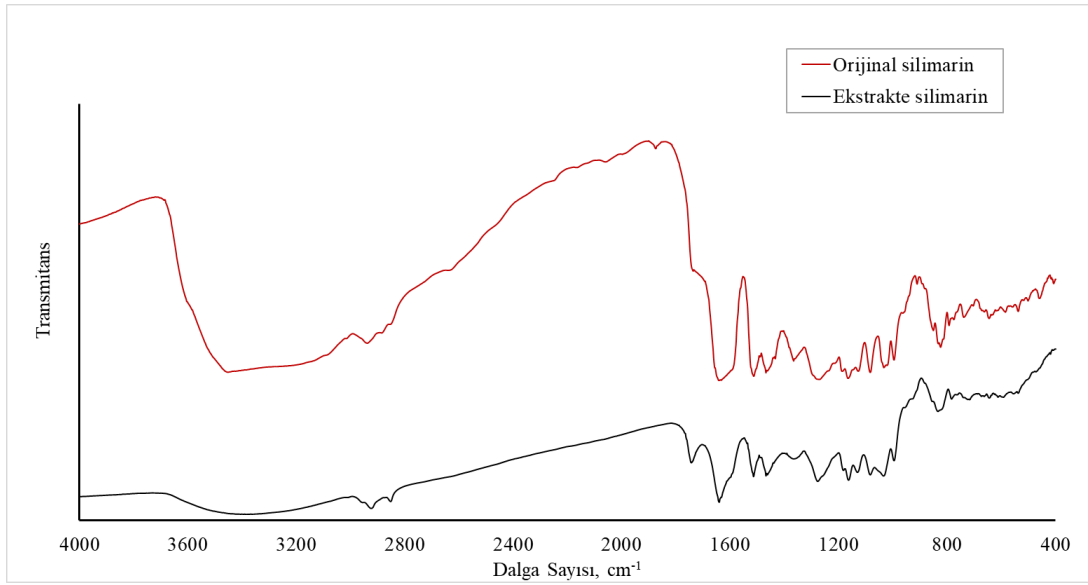
## 3. Deneysel Sonuçlar (Experimental Results)

### 3.1 Ekstraksiyon verimi ve Silimarin İçeriği (Extraction Yield and Silimarin Content)

Öğütülmüş 10 gr *silybum marianum* tohumu örneğinden ekstraksiyon sonucunda 0,7275g ekstrakt elde edilmiş ve bu sonuca göre ekstraksiyon verimi %7,3 olarak hesaplanmıştır. Standart silimarin kalibrasyon grafiği kullanılarak ekstrakte tozun %57,8 silimarin içerdiği bulunmuştur. Silimarin içeriği dikkate alınarak *silybum marianum* tohumunun silimarin içeriği %4,21 olarak bulunmuştur. Literatürde bu değer %2,31 -%7,71 aralığındadır (Arampatzis vd., 2019).

### 3.2. Karakterizasyon (Characterization)

Şekil 1.'de ekstrakte ve orjinal silimarin tozlarının FTIR spektrumları verilmiştir. Spektrumlarda silimarinin karakteristik pikleri gözlenmiştir. Tablo 2.'de FTIR analizinde gözlenen fonksiyonel gruplar listelenmiştir. Silimarin, fenolik O-H gerilme frekansına karşılık gelen  $3600-3200\text{ cm}^{-1}$  arasında geniş bir bant gösterir, metilen (CH<sub>2</sub>) gruplarının asimetric ve simetric gerilme modları sırasıyla  $2920$  ve  $2848\text{ cm}^{-1}$ 'de meydana gelir. Spektrumdaki IR bandı, yaklaşık  $1740\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen C=O gerilme titreşimlerine aittir.  $1640\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen bant C = C esneme titreşimine aittir.  $1512\text{ cm}^{-1}$  tepe noktası (C = O) 'ya atanmıştır,  $1462\text{ cm}^{-1}$ 'den itibaren görülen bant olefinik C-H bükülme titreşimine aittir ve  $1274$ ,  $1159$  ve  $1088\text{ cm}^{-1}$ 'de aromatik (C-O) gerilme titreşimi elde edilmiştir. Ayrıca  $1032\text{ cm}^{-1}$ 'de C-O-C pik,  $995\text{ cm}^{-1}$ 'de benzoat-CH titreşimi ve  $833\text{ cm}^{-1}$ 'de aromatik halkanın CH titreşimi olarak atanmıştır. Gözlenen piklerin literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir (Bhuvaneswari vd., 2014; El-Batal vd.,2018). Grafiklerdeki piklerin dalga sayısı ekseninde aynı aralıkta olduğunu görebiliriz.

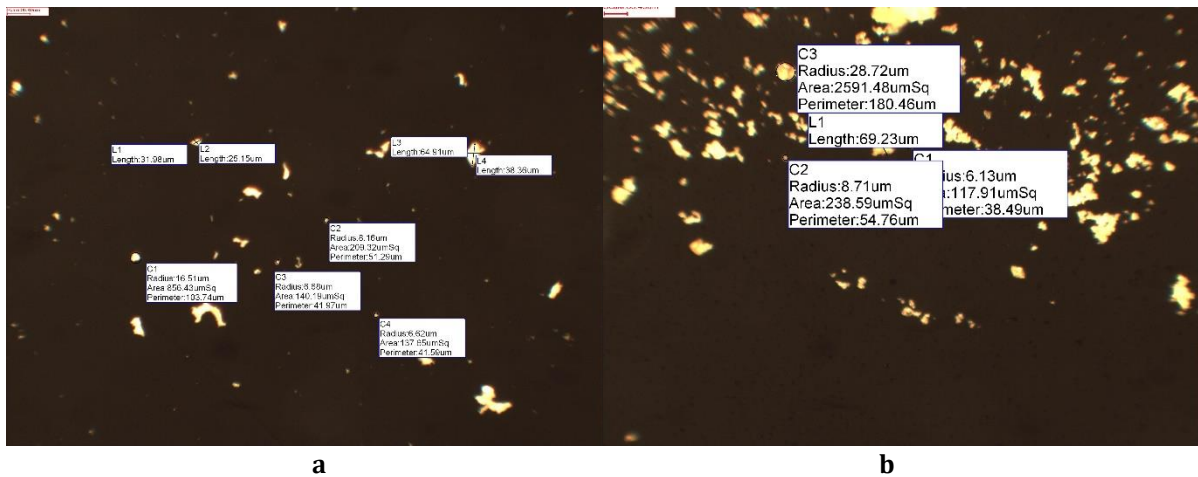


Şekil 1. Ekstrakte ve orijinal silimarin tozlarının FTIR spektrumları (FTIR spectra of extracted and original silimarin powder)

Tablo 2. FTIR analizinde gözlenen fonksiyonel gruplar (Functional groups observed in the FTIR analysis)

Fonksiyonel grup	Ekstrakte Silimarin (cm <sup>-1</sup> )	Orijinal Silimarin (cm <sup>-1</sup> )
Fenolik O-H gerilme titreşimi	3500-3200	3500-3200
C-H metil halkası	2920-2849	2930-2881
C=O gerilme titreşimleri	1742	1738
C=C titreşimleri	1641	1631
C-O gerilme titreşimleri	1512	1512
Olefinik C-H bükme titreşimi	1462	1462
Aromatik C-O gerilme titreşimleri	1274-1159-1088	1271-1163-1084
C-O-C gerilme titreşimleri	1030	1031
Aromatik C-H gerilme titreşimler	995-833	995-823

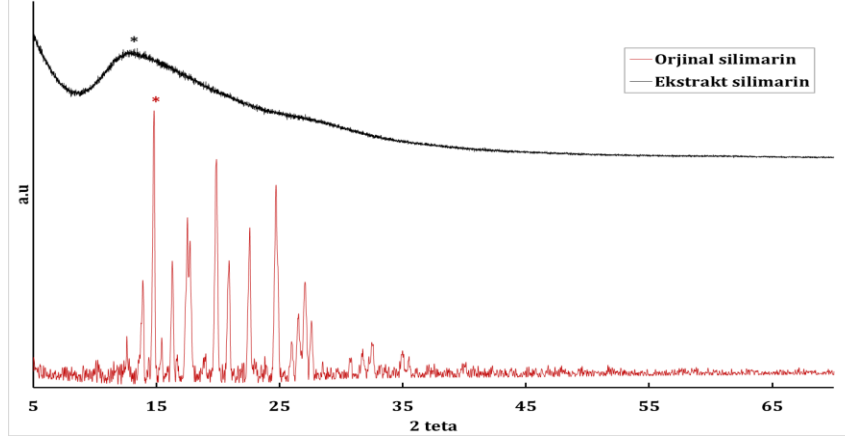
Şekil 2'de ekstrakte, orijinal silimarin tozlarının ve enjeksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen aljinat boncuklarının optik mikroskopta elde edilen görüntüleri verilmiştir. Parlak olarak görünen bölgeler silimarin tozlarının varlığını göstermektedir. Her iki örnekteki parçacıkların kümelenmeler oluşturduğu görülmektedir. Ekstrakt silimarin kümelerinin çapı 13-65µm arasında gözlemlenirken orijinal silimarin kümelerinin çapı 12-69µm arasında gözlemlenmiştir. Enjeksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen aljinat boncuklarının tane boyutunun yaklaşık 700µm olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 2. Ekstrakt silimarin (a) ve orijinal silimarinin (b) optik mikroskop görüntüsü (ölçek çizgisi: 68,49µm) (Optical microscope image of (a) extracted, (b) original silimarin (scale bar: 68,49µm)).

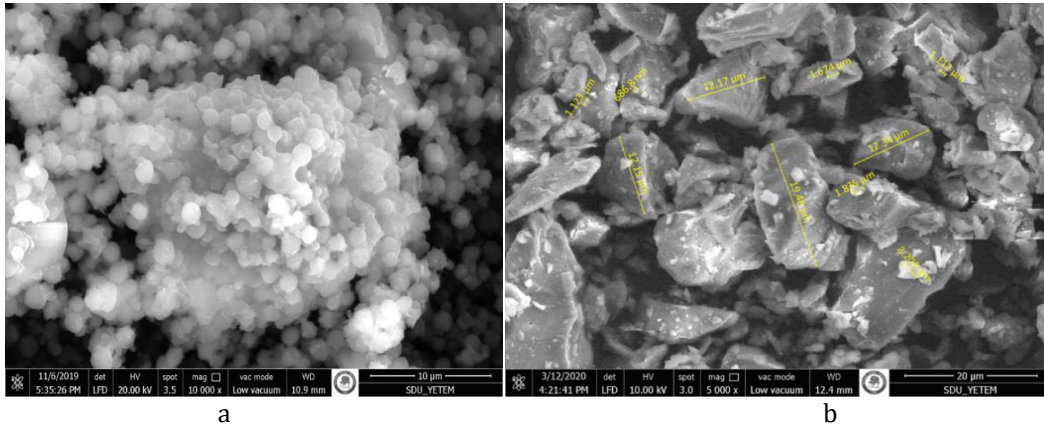
Şekil 3'te Orijinal ve ekstrakt silimarinin XRD desenleri verilmiştir. Orijinal silimarinin XRD deseni kristal yapısını

göstermektedir. 2 teta açısında 14,802 derecede verdiği en yüksek pik kırınımından Debye-Scherrer denklemi (Denklem 1) kullanılarak hesaplanan kristal boyutu 59,63nm olarak bulunmuştur. Ekstrakt silimarinin XRD deseninden amorf yapıda olduğu görülmüştür. 2 teta açısı 13,146 derecede verdiği en yüksek pik kırınımından hesaplanan kristal boyutu 1,25nm bulunmuştur. Silimarinin amorf durumu, ilaç çözünürlüğünün artmasına katkıda bulunabildiği Yang vd. (2015) tarafından rapor edilmiştir. Amorf yapının ve daha küçük kristal boyutun, suda çözünürlüğü zayıf olan silimarinin çözünürlüğünü artırarak daha fazla biyoyararlanım sağladığına inanılmaktadır.



Şekil 3. Orjinal ve ekstrakt silimarinin XRD desenleri (XRD pattern of original and extracted silimarine powders)

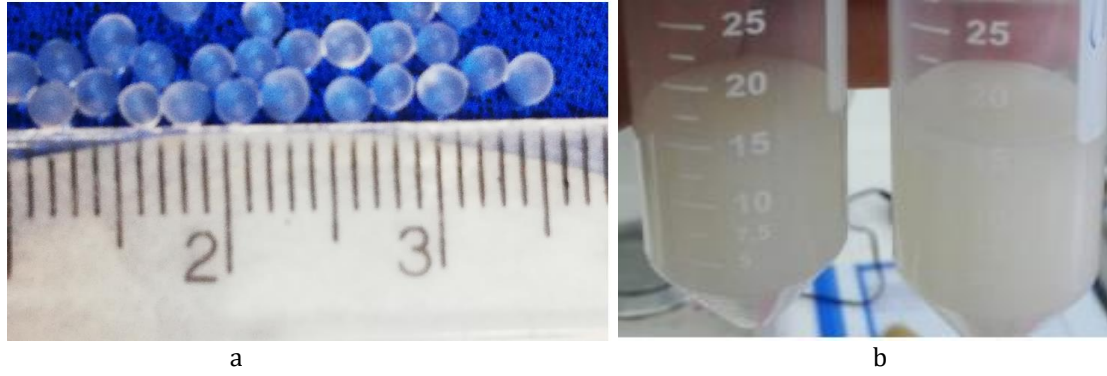
Şekil 4'te ekstrakt ve orjinal silimarine tozlarının SEM görüntüleri verilmiştir. Ekstrakt silimarinin tane boyutu yaklaşık 1,5µm görülmektedir. Ekstrakte edilen silimarinin parçacıklarının küresel yapıda ve kümelenmiş olduğu görülmektedir. Orjinal silimarinin ise yüzey morfolojisinin düzgün olmadığı, çoğunlukla küçük olmak üzere farklı boyutlarda yaklaşık 0,82-0-20µm aralığında düzensiz köşeli parçacıkların mevcut olduğu ve heterojen olarak dağıldığı görülmüştür.



Şekil 4 (a)Ekstrakte, (b)orjinal silimarine tozlarının SEM görüntüleri (SEM image of (a) extracted, (b) original silimarine powders).

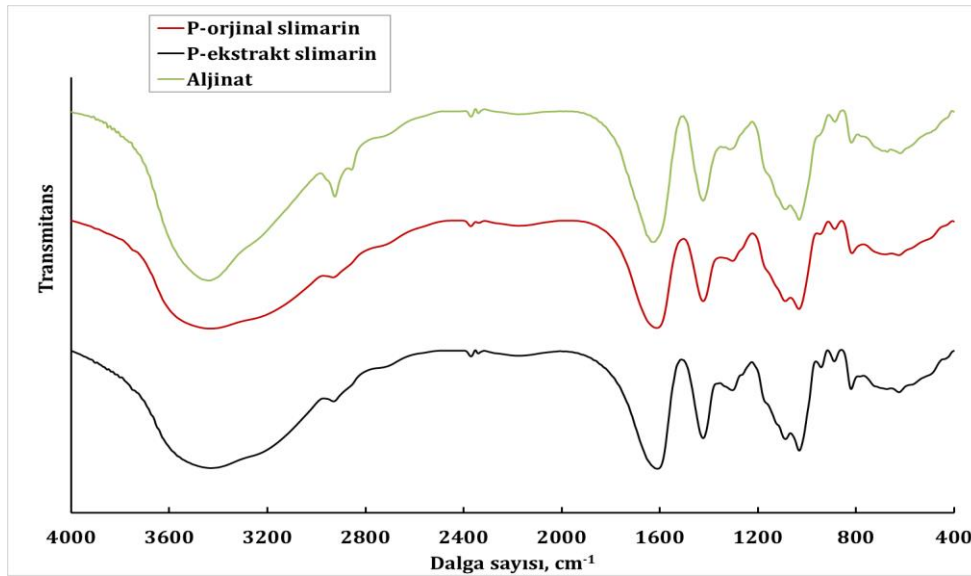
Şekil 5'te enjeksiyon yöntemi ile elde edilmiş aljinat boncukları ve püskürtme yöntemi ile elde edilmiş aljinat mikrokapsüllerinin filtrasyon sonrası görüntüleri verilmiştir. Enjeksiyon yöntemi ile elde edilen aljinat boncuklarının filtrasyon sonrasında yaklaşık 1,5 mm çapında ve düzgün küre şeklinde olduğu, püskürtme yöntemi ile elde edilen aljinat mikrokapsüllerinin ise filtrasyon sonrasında tane boyutun çok daha küçük olması nedeniyle filtre keki şeklinde olduğu görülmektedir.





**Şekil 5.** a) Enjeksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen aljinat boncuklarının b) püskürtme yöntemi kullanılarak elde edilen aljinat mikrokapsüllerinin filtrasyon sonrası görüntüleri (Post-filtration images of (a) alginate beads obtained using the injection method, (b) alginate microcapsules obtained using the spray method).

Püskürtme yöntemi kullanılarak aljinat ve silimarın yüklü aljinat mikrokürelerinin FTIR spektrumları Şekil 6'da gösterilmiştir. Aljinat (Ca-aljinat) spektrumunda, hidroksil, eter ve karboksilik fonksiyonel gruplarla ilgili önemli soğurma bantları gözlemlendi. O-H aljinat bağlarının gerilme titreşimleri  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$  aralığında ortaya çıktı. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri  $2920-2850\text{ cm}^{-1}$  de gözlemlendi. Çapraz bağlanma reaksiyonu sonucu oluşan kalsiyum aljinattaki O-H bağlarının gerilme titreşimlerinin soğurma bölgesi Na-aljinat'dan daha dardır (Aslan vd., 2019; Daemi ve Barikani, 2012). P-ekstrakt silimarın ve P-orjinal silimarın örneklerinin spektrumunda  $2920-2850\text{ cm}^{-1}$  de aljinatta daha keskin gözlenen alifatik C-H'nin gerilme titreşimlerinin azaldığı ve  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$  aralığında daha geniş soğurma bantları olduğu gözlemlendi.



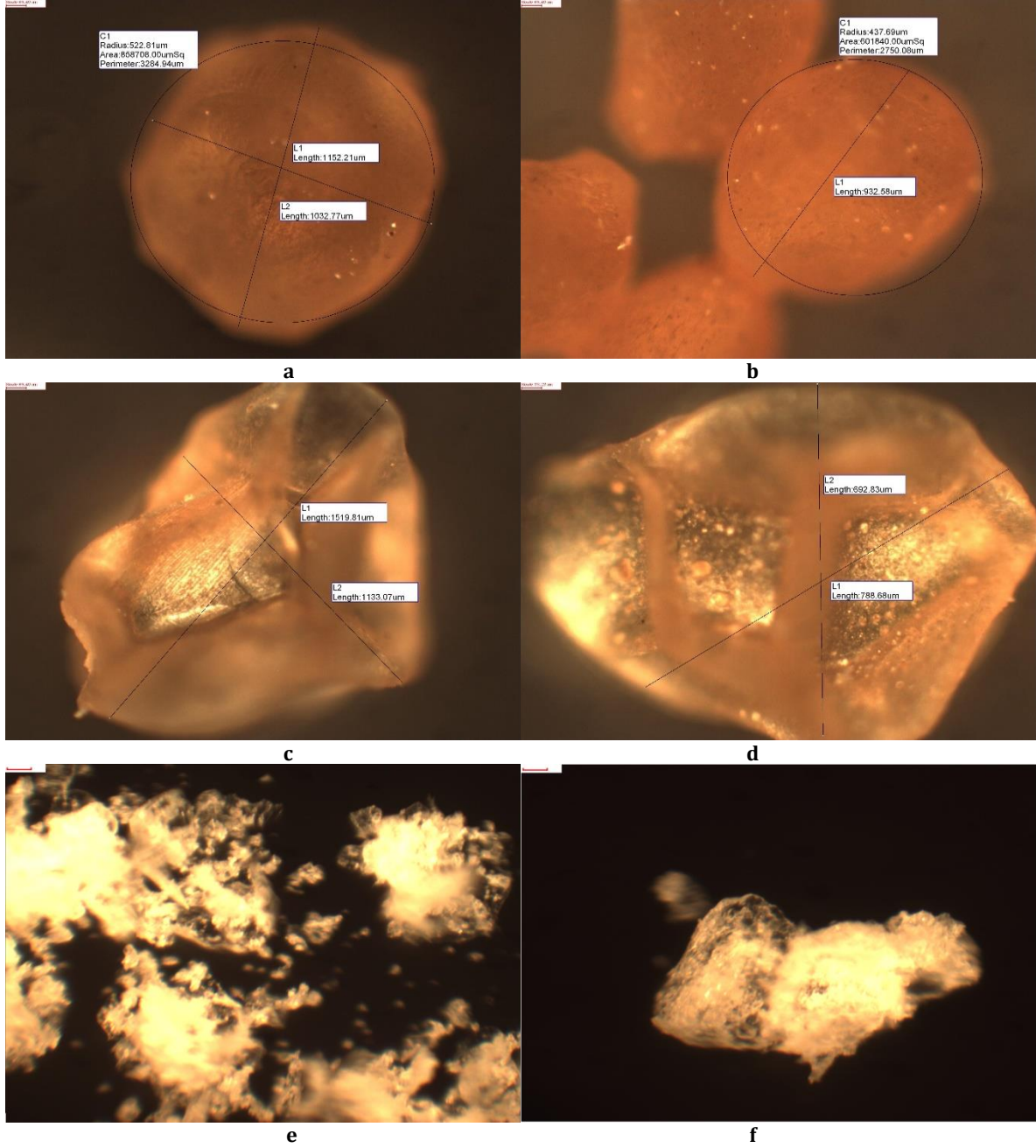
**Şekil 6.** Püskürtme yöntemi kullanılarak aljinat ve silimarın yüklü aljinat mikrokürelerinin FTIR spektrumları (Post-filtration images of (a) alginate beads obtained using the injection method, (b) alginate microcapsules obtained using the spray method).

Şekil 7'te etüvde ve liyofilizatörde kurutulmuş silimarın yüklü aljinat boncuklarının optik mikroskopta elde edilen görüntüleri verilmiştir. Kurutma yönteminin tane düzenliliği ve yüzey morfolojisi üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Etüvde kurutulmuş örneklerin (Şekil 7 a-b) şeklini koruduğu, liyofilizatörde kurutulmuş örneklerin (Şekil 7c-d) ise şeklinin bozulduğu anlaşılmaktadır. El-Sherbiny vd. (2011), yaptıkları çalışmada havada kurutulmuş mikro partiküllerin dondurarak kurutma yoluyla elde edilen mikro partiküllerinden daha kompakt, yoğun, nispeten daha küçük ve daha pürüzsüz görüldüğünü rapor etmişlerdir. Etüvde kurutulmuş olarak elde edilen E-ekstrakt ve E-orjinal silimarın örneklerinin tane çapı sırasıyla  $1045\mu\text{m}$  ve  $875\mu\text{m}$ 'dir. Liyofilizatörde kurutulmuş olarak elde edilen E-ekstrakt ve E-orjinal silimarın tane çapı sırasıyla  $1519\mu\text{m}$  ve  $788\mu\text{m}$ 'dir. Liyofilizatörde kurutulmuş ve püskürtme yöntemi ile hazırlanan P-ekstrakt silimarın (Şekil 7-e) ve P-orjinal silimarın (Şekil 7-f) örneklerde kümelenme görülmektedir. Kümelerin boyutu P-ekstrakt silimarın ve P-orjinal silimarın için sırasıyla  $5-90\mu\text{m}$ ;  $30-280\mu\text{m}$  aralığındadır.

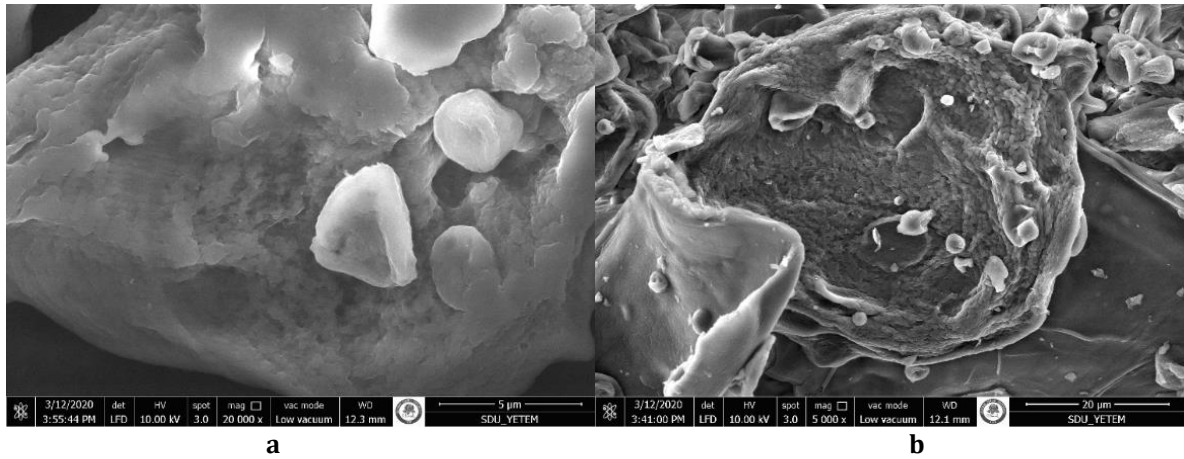
Şekil 8'de püskürtme yöntemi kullanılarak enkapsüle edilen ve liyofilizatörde kurutulmuş ekstrakte ve-orjinal silimarın yüklü kapsüllerin SEM görüntüleri verilmiştir. Örnekler liyofilize edildiğinden belirli bir derecede



kümelene meydana gelse de küresel veya elipsoidal bir şekil aldıkları görülebilir. Bu durum Ji vd. (2019)'nin yaptıkları çalışmada da gözlenmiştir. Mirokapsüllerin yüzeylerinin gözenekli olduğu görülmüştür. Gözenek çapları yaklaşık 0,1-0,5 $\mu$ m aralığındadır. P-ekstrakt silimarinin tane boyutu yaklaşık 3-20 $\mu$ m aralığında, P-orjinal silimarinin ise 0,9-60 $\mu$ m aralığında gözlenmiştir.



**Şekil 7.** Enjeksiyon yöntemi ile elde edilen silimarın yüklü aljinat boncuklarının etüve kurutulmuş a) E-ekstrakt silimarın, b) E-orjinal silimarın, lyofilizatörde kurutulmuş c) E-ekstrakt silimarın d)E-orjinal silimarın e) P-ekstrakt silimarın, f)P-orjinal silimarının optik mikroskopta elde edilen görüntüleri (ölçek çizgisi a ve b için 68,49 $\mu$ m, c ve d için 36,23 $\mu$ m, e-f için 18,05  $\mu$ m) (Optical microscope images of silymarin loaded alginate beads obtained by injection method; Oven dried (a) E-extract silymarin, (b) E-original silymarin, lyophilizer dried (c) E-extract silymarin (d) E-original silymarin (e) P-extract silymarin, (f) P-original silymarin (68.49 $\mu$ m for scale lines a and b, 36.23 $\mu$ m for c and d, 18.05  $\mu$ m for e-f)



**Şekil 8.** Püskürtme yöntemi kullanılarak enkapsüle edilen a-ekstrakt, b-orijinal silimarin yüklü kapsüllerin SEM görüntüleri (SEM images of (a) extracted, (b) original silymarin loaded capsules encapsulated by the spray method).

### 3.3 Tutuklama Verimi (Entrapment Efficiency)

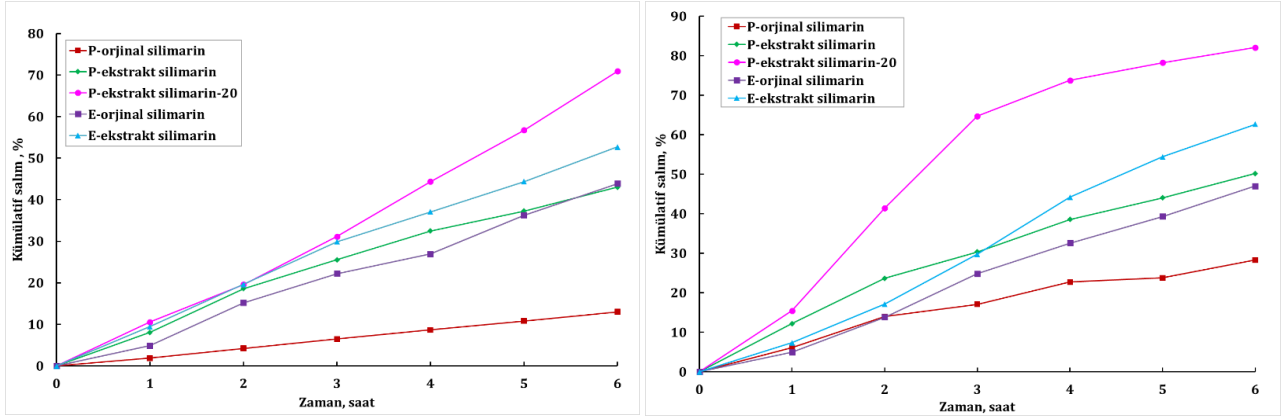
Enkapsülasyon sonrasında mikrokapsüllerin tutuklama verimleri hesaplanmıştır. Tablo 3.'de farklı yöntemlerle enkapsülasyon yapılan örneklerin silimarin tutuklama verimleri ve buna göre hesaplanan tutuklanan silimarin miktarları verilmiştir. Örneklerin tutuklama verimi %83,14-%91,27 aralığında bulunmuştur. P-orijinal silimarin örneği %91,27 ile en yüksek tutuklama verimine sahiptir. Enkapsülasyon işleminde P-orijinal silimarin ve P-ekstrakt silimarin örneklerinde 50 mg silimarin tozu kullanılmıştır. Ekstrakt silimarin tozunun silimarin içeriği ise %57,8 olduğundan daha az miktarda silimarin tutuklanmıştır. Püskürtme ile yapılan enkapsülasyonda enjeksiyon ile yapılabildiği gibi tane boyutları çok daha küçük olduğundan tutuklama verimleri arasında da fark büyük olmuştur. Literatürde mikro boncukların silimarin tutuklama verimi % 72.52 $\pm$ 2.53 ile % 92.39 $\pm$ 4.02 arasında bildirilmiştir (Sharma vd., 2018).

**Tablo 3.** Farklı yöntemlerle enkapsülasyon yapılan örneklerin silimarin tutuklama verimleri (Silymarin entrapment efficiency of samples encapsulated by different methods).

Örnek Kodu	Tutuklama verimi, [%]	Tutuklanan Silimarin Miktarı, [mg]
P-orijinal silimarin	91,27	45,64
P-ekstrakt silimarin	85,76	24,78
P-ekstrakt silimarin-20	85,76	9,91
E-orijinal silimarin	86,94	43,47
E-ekstrakt silimarin	83,14	41,57

Simule mide (0,1N HCl) ortamında 6 saat süresince yapılan silimarin salım sonuçları Şekil 9-a'da verilmiştir. Örneklerin kümülatif silimarin salımı %13-%71 aralığındadır. En çok kümülatif salım miktarı %71 ile P-ekstrakt silimarin-20'de gözlenmiştir. P -ekstrakt silimarininin %43, P-orijinal silimarininin %13, E-ekstrakt silimarininin %52,6, E- orijinal silimarininin %43,8 bulunmuştur.

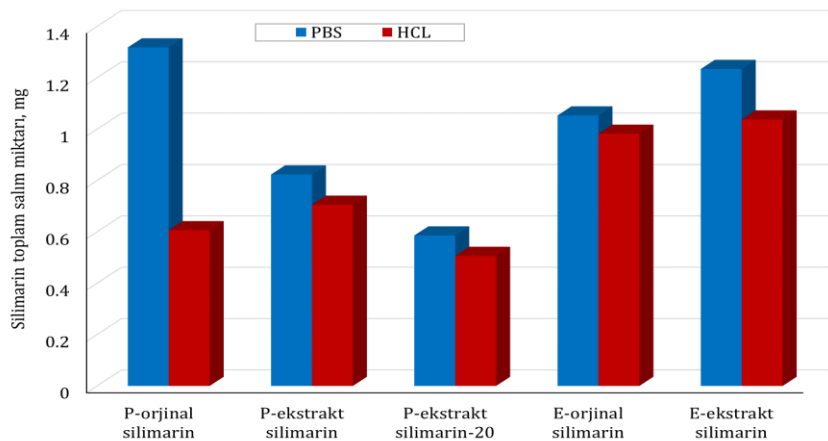
Simule bağırsak (PBS) ortamında 6 saat süresince yapılan silimarin salım sonuçları Şekil 9-b'de verilmiştir. Örneklerin PBS ortamında kümülatif silimarin salımı %28,3-%82 aralığındadır. En çok kümülatif salım miktarı %82 ile P-ekstrakt silimarin-20'de gözlenmiştir. P -ekstrakt silimarininin %50,2, P-orijinal silimarininin %28,3, E-ekstrakt silimarininin %62,6, E-orijinal silimarininin %47 bulunmuştur.



**Şekil 9.** Hazırlanan örneklerin a-0,1N HCL ortamında b-PBS salım grafiği (Percent cumulative silimarin release plots of prepared samples in (a) 0.1N HCL (b) PBS media).

Şekil 9 ekstrakt silimarin ve saf silimarinin kapsüllenmiş tane boyutunun; silimarin miktarının, kapsülleme yönteminin ve tutuklama kapasitesinin, simule mide(0,1N HCL) ve bağırsak (PBS) ortamlarında salımı üzerine etkisini göstermektedir. Az miktarda silimarin yüklü örnekte (P-ekstrakt silimarin-20) en çok salım gerçekleşirken en yüksek silimarin yüklü örnekte (P-orjinal silimarin) en düşük salım gerçekleşmiştir. Enjeksiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan hem ekstrakt (E-ekstrakt silimarin) hem de orjinal silimarin (E-orjinal silimarin) daha yüksek salım gerçekleştirmiştir. Tane boyutu daha küçük ve amorf yapıda olan ekstrakt silimarin tozunda orjinal silimarin tozuna göre her iki kapsülasyon yönteminde de daha fazla salım gözlenmiştir.

Silimarin yüklü örneklerin simule mide (0,1 N HCL) ve bağırsak ( PBS) ortamlarında gerçekleştirilen salım deneyleri sonunda toplam silimarin salım miktarının karşılaştırılması Şekil 10 da gösterilmiştir. Tüm örneklerde simule bağırsak (PBS) ortamında daha yüksek silimarin salımı gözlenmiştir. Simule mide (0,1 N HCL) ve bağırsak ( PBS) ortamlarında toplam silimarin salım miktarı sırasıyla P-orjinal silimarinin 0,60 mg ve 1,31 mg, P-ekstrakt silimarinin 0,70 mg ve 0,82 mg, P-ekstrakt silimarin-20'nin 0,50 mg ve 0,58 mg, E-ekstrakt silimarinin 1,03 mg ve 1,23 mg, E-ekstrakt silimarinin 0,98 mg ve 1,05 mg olarak bulunmuştur. Enjeksiyon ile enkapsülasyon yönteminde tutuklama kapasitesi (E-orjinal silimarin) püskürtme yöntemi ile hazırlanan (P-orjinal silimarin) örnekte daha düşük olmasına rağmen her iki ortamda da daha yüksek silimarin salımı gerçekleşmiştir. Bu durum ekstrakte ve orjinal silimarin tozlarının kristal yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir. XRD desenlerinden ekstrakt silimarin tozunun amorf yapıda olduğu göstermiştir. Salım sonuçları da bunu desteklemiştir. Enjeksiyon yönteminde tane boyutu ve gözenekleri daha büyük olduğundan daha fazla silimarin salınmıştır. Aynı şekilde ekstrakt silimarin tozunun tane boyutu daha küçük ve enjeksiyon yönteminde kapsül tane boyutu ve gözenekleri daha büyük olduğundan E-ekstrakt silimarinin salım miktarı P-ekstrakt silimarininden fazla bulunmuştur.

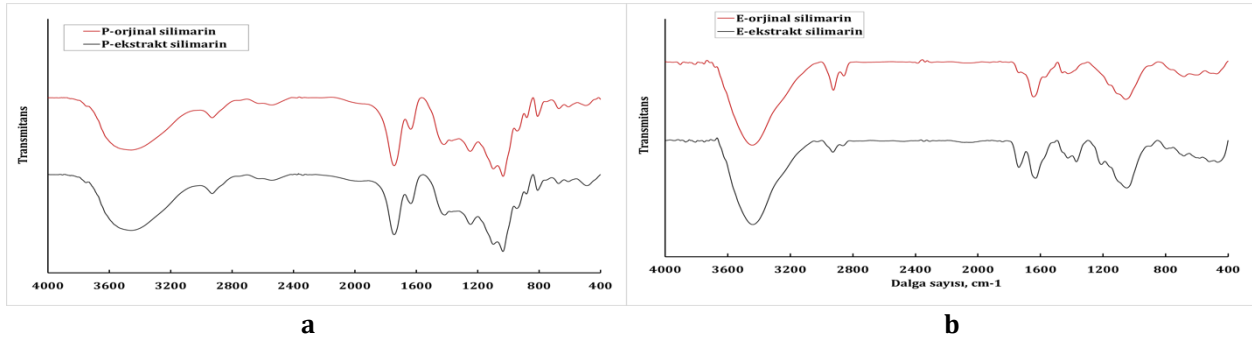


**Şekil 10.** Silimarin yüklü örneklerin PBS ve 0,1 N HCL ortamlarında gerçekleştirilen salım deneyleri sonunda toplam silimarin salım miktarının karşılaştırılması (Comparison of the amount of total silimarin release at the end of the release experiments of silimarin loaded samples in PBS and 0.1 N HCL media).

Püskürtme yöntemiyle hazırlanan silimarin yüklü mikrokürelerin simule mide (0,1N HCL) ortamında gerçekleştirilen salım deneylerinden sonra yapılan FTIR analizi sonuçları Şekil 11-a'da verilmiştir. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimlerinin azaldığı ve 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında gözlenen soğurma bantlarının daraldığı ve 2526  $\text{cm}^{-1}$  de pik oluştuğu gözlenmiştir. Silimarine ait olan 1740  $\text{cm}^{-1}$ de görülen C=O gerilme titreşimleri 1744  $\text{cm}^{-1}$ de,

1640  $\text{cm}^{-1}$  de ki C = C esneme titreşimi piki 1636  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. 1242  $\text{cm}^{-1}$  de gözlenen pik C-O gerilme titreşimi olarak atanmıştır.

Enjeksiyon yöntemiyle hazırlanan silimarin yüklü mikrokürelerin simule bağırsak (PBS) ortamında gerçekleştirilen salım deneylerinden sonra yapılan FTIR analizi sonuçları Şekil 11-b'de verilmiştir. 3200–3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında gözlenen soğurma bantlarının daraldığı, 2924  $\text{cm}^{-1}$  ve 2856  $\text{cm}^{-1}$ 'deki piklerin belirgenleştiği gözlenmiştir. Salım öncesi (Şekil 6) 1742  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik 1390 $\text{cm}^{-1}$  ve 1212 $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır.  $\text{CH}_2$  gerilme titreşimlerinin görüldüğü 1426 $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik şiddeti azalmıştır. Simule mide (0,1N HCL) ortamında salınan örneklerde gözlenen 1740 $\text{cm}^{-1}$  piki PBS de azalırken, 1636 $\text{cm}^{-1}$  piki artmıştır. Asidik pH'ta, aljinatın karboksil grupları -COOH biçimindedir. -COOH tarafından oluşturulan H-bağlanması, polimer zincirleri arasında ağır etkileşimlere neden olur. Net yükleri ve elektrostatik itmeyi azaltan bu reaksiyon, daha yavaş salınma yol açar. Asidik koşulların aksine, hapsedilmiş fenolik maddelerin salım hızı alkali koşullar altında artar, bu da aljinatın alkali pH'a duyarlılığını gösterir. Alkalin ortamda, karboksil grupları iyonize hale gelir (-COO-), asidik ortamın aksine, elektrostatik itme, aljinat zincir düzenlemelerini değiştirir ve kabuğun şişmesi meydana gelir (Gunasekaran vd., 2007; Deng et al., 2010, Yousefdoost vd., 2019). FTIR sonuçları da (Şekil 11) bunu desteklemiştir.



**Şekil 11.** 6 saat (a) 0,1 N HCL ortamında, (b)PBS ortamında silimarin salımı gerçekleştirilmiş örneklerin FTIR spektrumları (FTIR spectra of samples in which silimarin was released in 6 hours (a) 0.1 N HCL medium, (b) PBS medium).

## 5. Sonuç ve Tartışma (Result and Discussion)

Bu çalışmanın amacı *silybum marianum* tohumundan ekstrakte edilen silimarinin ve orjinal silimarinin mikroenkapsülasyonu ile biyoyararlanımın artırılmasıdır. *Silybum marianum* tohumuna çözücü ile ekstraksiyon yöntemi uygulanarak %7,3 verimle silimarin tozu elde edildi. Ekstrakt silimarin tozunun silimarin içeriği %57,8, *silybum marianum* tohumunun silimarin içeriği %4,21 bulunmuştur. Ekstrakt ve orjinal silimarin, FTIR, Optik Mikroskop, XRD ve SEM ile karakterize edilmiştir. Püskürtme ve enjeksiyon yöntemleri ile ekstrakt ve orjinal silimarin tozları aljinat ile enkapsüle edilmiştir. Enkapsülasyon sonrasında mikrokapsüllerin tutuklama verimleri %83,14-%91,27 aralığında bulunmuştur. Kurutma yönteminin örneklerin tane düzenliliği ve yüzey morfolojisi üzerindeki etkisi optik mikroskop ile gözlenmiştir. Etüvde kutulan örneklerin şeklini koruduğu, liyofilizatörde kurutulan örneklerin ise şeklinin bozulduğu görülmüştür.

Simule mide (0,1N HCl) ortamında kümülatif silimarin salımı %13-%71 aralığında, simule bağırsak (PBS) ortamında kümülatif silimarin salımı %28,3-%82 aralığındadır. Tüm örneklerde simule bağırsak (PBS) ortamında daha yüksek silimarin salımı gözlenmiştir. Salım deneyleri sonrasında örneklerin fonksiyonel gruplarındaki değişimler FTIR ile belirlenmiştir. Aljinatın pH duyarlılığı özelliğinden dolayı PBS ortamında daha çok salım gerçekleşmiştir. Bu durumda silimarinin biyoyararlanımı artırma potansiyeline sahip olduğu hipotezini doğruladığını göstermiştir.

## Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBY 2019-7111 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması (Conflict of Interest)

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması beyan edilmemiştir. Noconflict of interest was declared by the authors.

**Kaynaklar (References)**

- Ameya Sharma, Vivek Puri, Vandita Kakkar, Inderbir Singh, 2018. "Formulation and Evaluation of Silymarin-Loaded Chitosan-Montmorillonite Microbeads for the Potential Treatment of Gastric Ulcers."
- Arampatzis, D. A., A. C. Karkanis and N. G. Tsiropoulos, 2019. "Silymarin content and antioxidant activity of seeds of wild *Silybum marianum* populations growing in Greece." *Annals of Applied Biology* 174(1): 61-73.
- Aslan K., Çoban O., Alp F.B., 2019 Yüksek Konsantrasyonlu Borik Asit Gideriminde Aljinat Bazlı Kompozit Adsorbent Kullanımı, Uluslararası Bor Sempozyumu-Boron, 2019, Nevşehir, Türkiye.
- Beg, S., S. Javed and K. Kohli, 2010. "Bioavailability enhancement of coenzyme Q10: an extensive review of patents." *Recent Pat Drug Deliv Formul* 4(3): 245-255.
- Bhuvaneshwari R., Chidambaramathan N. and J. K., 2014. "Hepatoprotective Effect of *Emblica officinalis* and Its Silver Nanoparticles Against CCl<sub>4</sub> Induced Hepatotoxicity in Wistar Albino Rats." *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9(1): 223-235p.
- Deng, K., Zhong, H., Tian, T., Gou, Y., Li, Q., Dong, L., 2010. "Drug release behavior of a pH/temperature sensitive calcium alginate/poly (N-acryloylglycine) bead with coreshelled structure". *Express Polym. Lett.* 4 (12), 773-780.
- El-Batal, A., S. Elmenshawi, A. Ali and E. Eldbaiky, 2018. "Preparation and Characterization of Silymarin Nanocrystals and Phytosomes with Investigation of their Stability using Gamma Irradiation." *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 52: S174-S183.
- El-Sherbiny, I. M., M. Abdel-Mogib, A.-A. M. Dawidar, A. Elsayed and H. D. C. Smyth, 2011. "Biodegradable pH-responsive alginate-poly (lactic-co-glycolic acid) nano/micro hydrogel matrices for oral delivery of silymarin." *Carbohydrate Polymers* 83(3): 1345-1354.
- Ercan P., El S. N., 2010., "Koenzim Q10'un Beslenme Ve Sağlık Açısından Önemi Ve Biyoyararlılığı", *Tübbav Bilim Dergisi*, Cilt:3, Sayı:2, Sayfa:192-200.
- Gunasekaran, S., Ko, S., Xiao, L., 2007. "Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications". *J. Food Eng.* 83, 31-40.
- Huseini, H. F., B. Larijani, R. Heshmat, H. Fakhrzadeh, B. Radjabipour, T. Toliat and M. Raza, 2006. "The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial." *Phytotherapy Research* 20(12): 1036-1039.
- Javed, S., K. Kohli and A. Ali, 2011. "Reassessing Bioavailability of Silymarin." *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 16: 239-249.
- Javed, S., K. Kohli and W. Ahsan, 2016. "Solubility and Dissolution Enhancement of Silymarin with Fulvic Acid Carrier." *International Journal of Drug Development & Research* 8: 9-14.
- Matsuda, T ve ark., 2005. "Silymarin protects pancreatic beta cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways". *Endocrinology*, 146(1): 175-185.
- Ö.Doğanoğlu, A.Gezer, C.Yücedağ, 2006. "Göller Bölgesi-Yenişarbademli Yöresi'nin Önemli Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Taksonları Üzerine Araştırmalar." *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 10-1: 66-73
- Özbek, Z., A. & Ergönül, P., G., 2017. "A Review on Encapsulation of Oils". *CBU J. of Sci.*, Volume 13, Issue 2, 2017, p 293-309.
- Pandey, R. and G. K. Khuller, 2004. "Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers." *J Antimicrob Chemother*, 53(4): 635-640.
- Post-White, J., E. J. Ladas and K. M. Kelly, 2007. "Advances in the Use of Milk Thistle (*Silybum marianum*)." *Integrative Cancer Therapies* 6(2): 104-109.
- Rainone, F., 2005. "Milk thistle." *Am Fam Physician* 72(7): 1285-1288.
- Ramakrishnan G, Augustine TA, Jagan S, Vinodhkumar R, Devaki T. 2007, Effect of silymarin on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Exp Oncol*; 29:39-44.
- Saller, R., R. Meier and R. Brignoli (2001). "The use of silymarin in the treatment of liver diseases." *Drugs*, 61(14): 2035-2063
- Sharma, A., V. Puri, V. Kakkar and I. Singh (2018). "Formulation and Evaluation of Silymarin-Loaded Chitosan-Montmorillonite Microbeads for the Potential Treatment of Gastric Ulcers." *Journal of Functional Biomaterials*, 9(3): 52.
- Serçe, A., B. Ç. Toptancı, S. E. Tanrikut, S. Altaş, G. Kızıl, S. Kızıl and M. Kızıl, 2016. "Assessment of the Antioxidant Activity of *Silybum marianum* Seed Extract and Its Protective Effect against DNA Oxidation, Protein Damage and Lipid Peroxidation." *Food technology and biotechnology*, 54(4): 455-461.
- Sheela, N., M. A. Jose, D. Sathyamurthy and B. N. Kumar, 2013. "Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic nephropathy in rats." *Iran J Kidney Dis* 7(2): 117-123.
- Soto, C., 2003. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 136, 205-212.
- Velussi, M., A. M. Cernigoi, A. De Monte, F. Dapas, C. Caffau and M. Zilli, 1997. "Long-term (12 months) treatment with an antioxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients." *J Hepatol*, 26(4): 871-879.
- Yang, G., Y. Zhao, N. Feng, Y. Zhang, Y. Liu and B. Dang, 2015. "Improved dissolution and bioavailability of silymarin delivered by a solid dispersion prepared using supercritical fluids." *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(3): 194-202.
- Yousefdoost, S., F. Samadi, S. M. Jafari, S. S. Ramezanzpour, S. Hassani and F. Ganji, 2019. "Application of nanoencapsulated silymarin to improve its antioxidant and hepatoprotective activities against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in broiler chickens." *Livestock Science*, 228: 177-186.
- Zhang, Z.-B., Z.-G. Shen, J.-X. Wang, H.-X. Zhang, H. Zhao, J.-F. Chen and J. Yun, 2009. "Micronization of silybin by the emulsion solvent diffusion method." *International Journal of Pharmaceutics*, 376(1): 116-122.