POLİELEKTROLİT NANOLİPOZOMLAR İLE HAVLICAN (*Alpinia officinarum* HANCE) EKSTRAKTININ ENKAPSÜLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN ANALİTİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

İlkyaz PATIR

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİELEKTROLİT NANOLİPOZOMLAR İLE HAVLICAN (*Alpinia officinarum* HANCE) EKSTRAKTININ ENKAPSÜLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN ANALİTİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

İlkyaz PATIR
0000-0002-3503-2550

Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

POLİELEKTROLİT NANOLİPOZOMLAR İLE HAVLICAN (*Alpinia officinarum* HANCE) EKSTRAKTININ ENKAPSÜLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN ANALİTİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

İlkyaz PATIR

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Galangin yüksek antioksidan aktivitesi ve geniş biyolojik spektrumu sebebiyle dünyanın çeşitli bölgelerinde yüzyıllardır ilaç olarak kullanılan *Alpinia officinarum* Hance bitkisinin temel bileşenidir. Yüksek biyoaktivitesinin yanında zayıf çözünürlüğü ve oksidatif kararsızlığından dolayı düşük biyoerişilebilirliğe ve biyoyararlanıma sahiptir. Bu sorunun üstesinden gelmek ve galanginin biyoerişilebilirliğini arttırabilmek için galangin yüklü polielektrolit lipozomlar geliştirilmiştir. Öncelikle *Alpinia officinarum* Hance rizomlarından galangin ekstraksiyonu gerçekleştirilerek HPLC-DAD ile ekstraktın fenolik bileşik profili ve içeriği belirlenmiştir. Spektroskopik yöntemler kullanılarak ekstraktın toplam fenolik madde içeriği, flavonoid içeriği ve toplam antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Kemometrik optimizasyon yöntemlerinden RSM-CCD kullanılarak maksimum enkapsülasyon etkinliğinde lipozomlar üretebilmek için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda lipozomlar %93,77 enkapsülasyon etkinliği ile üretilmiştir. Elde edilen optimum lipozomların yüzeyi kitosan ve gam arabik ile modifiye edilmiştir. Elde edilen polielektrolit lipozomların *in vitro* simüle vücut sıvısında salım davranışı ve kinetik modeli, *in vitro* gastrointestinal sistemde salım davranışı, biyoerişilebilirliği ve stabilitesi incelenmiştir. Çalışmalar sonunda geliştilen lipozomal sistemin galanginin biyoerişilebilirliğini 3 kat arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen sistemin simüle fizyolojik sıvıda ve simüle gastrointestinal koşullarda galangini koruduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Galangin, lipozom, katman-katman kaplama, biyoerişilebilirlik, optimizasyon

2023, xii + 122 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF ENCAPSULATION, CHARACTERIZATION AND BIOACCESSIBILITY OF LESSER GALANGAL (*Alpinia officinarum* HANCE) EXTRACT WITH POLYELECTROLITE NANOLIPOSOMES BY ANALYTICAL METHODS

İlkyaz PATIR

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Galangin is the main constituent of *Alpinia officinarum* Hance, which has been used as a medicine for centuries in various parts of the world due to its high antioxidant activity and broad biological spectrum. Despite its high bioactivity, it has low bioaccessibility and bioavailability due to its poor solubility and oxidative instability. To overcome this problem and to increase the bioaccessibility of galangin, galangin-loaded polyelectrolyte liposomes were developed. Firstly, galangin was extracted from *Alpinia officinarum* Hance rhizomes and the phenolic compound profile and content of the extract were determined by HPLC-DAD. Total phenolic content, flavonoid content and total antioxidant capacity of the extract were determined by spectroscopic methods. Optimum conditions were determined to produce liposomes with maximum encapsulation efficiency using RSM-CCD, one of the chemometric optimisation methods. As a result of the optimisation, liposomes were produced with 93.77% encapsulation efficiency. The surface of the obtained optimum liposomes was modified with chitosan and gum arabic. The release behaviour and kinetic model of the obtained polyelectrolyte liposomes *in vitro* simulated body fluid, release behaviour *in vitro* gastrointestinal system, bioaccessibility and stability were investigated. At the end of the studies, it was determined that the developed liposomal system increased the bioaccessibility of galangin 3-fold. In addition, it was determined that the developed system protects galangin in simulated physiological fluid and simulated gastrointestinal conditions.

Key words: Galangin, liposome, layer-by-layer deposition, bioaccessibility, optimization

2023, xii + 122 pages.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her anlamda bana danışmanlık yapan, tecrübeleri, deneyimleri ve bilimsel yaklaşımıyla bana yeni kapılar açan ve yol gösteren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Saliha ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimimde her konuda akademik ve teknik desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Önder AYBASTIER ve Doç. Dr. Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bilgi birikimini ve tecrübelerini esirgemeyen Dr. Büşra Karkar'a ve değerli Kromatografi Araştırma Grubu'ndaki çalışma arkadaşlarım, Yüksek Kimyager Gizem BAYAÇLI, Elif TÜLEK, Serenay EYÜBOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşantım ve eğitim hayatım boyunca en büyük idolüm ve bulunduğum noktaya gelmemdeki en büyük destekçim olan sevgili amcam Prof. Dr. Süleyman PATIR'a ve her konuda beni destekleyen ve arkamda duran sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı FGA-2023-837 kodlu proje kapsamında destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

İlkyaz PATIR
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. *Alpinia officinarum* Hance 3
2.2. Galangin 13
2.3. Enkapsülasyon 18
2.4. Lipozom 20
2.4.2. Lipozomların sınıflandırılması 26
2.4.3. Lipozom hazırlama yöntemleri 29
2.4.5. Lipozomların avantajları ve dezavantajları 37
2.5. Katman Katman (LbL) Biriktirme Yöntemi 39
3. MATERYAL ve YÖNTEM 42
3.1. Materyal 42
3.1.1. *A. officinarum* rizomu 42
3.1.2. Tez kapsamında kullanılan cihazlar 42
3.1.3. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar 44
3.1.4. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler 45
3.1.5. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler 46
3.2. Yöntem 48
3.2.1. *A. officinarum* rizomlarından galangin ekstraksiyonu 48
3.2.2. Kromatografik analiz 48
3.2.3. Spektroskopik analizler 49
3.2.4. Kemometrik analizler 51
3.2.5. Galangin yüklü lipozomların hazırlanması 55
3.2.7. Galangin yüklü lipozomların kitosan-gam arabik ile modifiye edilmesi 55
3.2.8. Lipozomların karakterizasyonu 57
3.2.9. *In vitro* ilaç salım çalışması 58
3.2.10. İlaç salım kinetiği 58
3.2.11. *In vitro* gastro-intestinal sindirim çalışması 61
3.2.12. Biyoerişilebilirlik çalışması 61
3.2.13. Depolama stabilitesi 62
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 63
4.1. *A. officinarum* Ekstraktında Bulunan Fenolik Maddelerin Analizi 63
4.2. Spektroskopik Analizler 66
4.3. Kemometrik Analizler 68
4.4. Lipozomların Karakterizasyonu 77
4.5. *In vitro* İlaç Salım Çalışması 83
4.6. İlaç Salım Kinetiği 85
4.7. *In vitro* Gastrointestinal Sindirim Çalışması 90
4.8. Biyoerişilebilirlik Çalışması 94

5. SONUÇ 101
KAYNAKLAR 104
ÖZGEÇMİŞ 121

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
A	Absorbans
cal	Kalori
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molarite
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mV	Milivolt
N	Normalite
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir kısım
R^2	Korelasyon katsayısı
sa	Saat
t	Zaman
y	Yanıt
α	Alfa
β	Beta
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
ANOVA	Varyans analizi
AO	*Alpinia officinarum* Hance
CCD	Merkezi Kompozit Dizayn
CH	Kitosan
CHOL	Kolesterol
DF	Serbestlik derecesi
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
FE-SEM	Alan Emisyonlu Taramalı elektron mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GA	Galangin
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GUA	Gam arabik
GUV	Dev unilamellar veziküller
HPLC-DAD	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diod Serili Dedektör
IC_{50}	Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
LBL	Katman katman biriktirme yöntemi
LOD	Tespit sınırı
LOQ	Tayin sınırı
LUV	Büyük unilamellar veziküller
MLV	Multilamellar veziküller
MS	Ortalamaların karesi
MVV	Multivesiküler veziküller
O	Optimum
OLV	Oligolamellar veziküller
PBS	Fosfat tamponlu salin
PC	L-α-Fosfatidilkolin
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PVDF	Poliviniliden florür
QE	Kuersetin eşdeğeri
RE	Rutin eşdeğeri
RSM	Yanıt Yüzey Metodolojisi
SGF	Simüle mide sıvısı
SIF	Simüle bağırsak sıvısı
SS	Karelerin toplamı
SUV	Küçük ünilamellar veziküller
TE	Troloks eşdeğeri
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TGA	Termogravimetrik analiz
ULV	Unilamellar veziküller
UV-GB	Ultraviyole/Görünür bölge
XRD	X-ışını kırınımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	*A. officinarum* kısımları	3
Şekil 2.2.	*A. officinarum* kısımları	4
Şekil 2.3.	*A. officinarum* fenolik bileşikleri	7
Şekil 2.3.	*A. officinarum* fenolik bileşikleri (Devam)	8
Şekil 2.3.	*A. officinarum* fenolik bileşikleri (Devam)	9
Şekil 2.3.	*A. officinarum* fenolik bileşikleri (Devam)	10
Şekil 2.4.	Enkapsülasyon işlemi	18
Şekil 2.5.	Enkapsülasyon ile elde edilen partikül sistemleri	19
Şekil 2.6.	İlk gözlemlenen lipozomlar	20
Şekil 2.7.	Lipozom ve lipozomların yapısal bileşeni	21
Şekil 2.8.	Fosfolipitlerin etkileşimleri	22
Şekil 2.9.	Kolesterol ve fosfolipitlerin etkileşimi	22
Şekil 2.10.	Lipozomların oluşumu	23
Şekil 2.11.	Lipozomların sınıflandırılması	28
Şekil 2.12.	İnce film hidrasyon yöntemi	30
Şekil 2.13.	Ters faz buharlaştırma yöntemi	31
Şekil 2.14.	Solvent enjeksiyon yöntemi	32
Şekil 2.15.	Deterjan diyalizi yöntemi	33
Şekil 2.16.	LbL yöntemi ile film oluşumu	40
Şekil 2.17.	LbL yönteminin lipozomlara uygulanması	41
Şekil 3.1.	Galangin yüklü lipozomların hazırlanması	55
Şekil 3.2.	Galangin yüklü lipozomların modifiye edilmesi	56
Şekil 4.1.	*A. officinarum* ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı	63
Şekil 4.2.	Enkapsülasyon etkinliğine PC ve CHOL etkisi	72
Şekil 4.3.	Enkapsülasyon etkinliğine PC ve GA etkisi	73
Şekil 4.4.	Enkapsülasyon etkinliğine CHOL ve GA etkisi	74
Şekil 4.5.	Lipozomların FE-SEM görüntüleri	78
Şekil 4.6.	Lipozomların FTIR spektrumu	82
Şekil 4.7.	Lipozomların ilaç salım grafiği	83
Şekil 4.8.	O-Lipozom kinetik model grafikleri	85
Şekil 4.8.	O-Lipozom kinetik model grafikleri (Devam)	86
Şekil 4.9.	CH-Lipozom kinetik model grafikleri	86
Şekil 4.9.	CH-Lipozom kinetik model grafikleri (Devam)	87
Şekil 4.10.	GUA-CH-Lipozom kinetik model grafikleri	88
Şekil 4.10.	GUA-CH-Lipozom kinetik model grafikleri (Devam)	89
Şekil 4.11.	Kümülatif galangin salım grafiği	90
Şekil 4.12.	Kontrol ve lipozomlarda galanginin biyoerişilebilirlik yüzdesi	94
Şekil 4.13.	Stabilite çalışması 0. gün	96
Şekil 4.14.	Stabilite çalışması 1. gün	97
Şekil 4.15.	Stabilite çalışması 7. gün	97
Şekil 4.16.	Stabilite çalışması 14. gün	98
Şekil 4.17.	Stabilite çalışması 21. gün	99
Şekil 4.18.	Stabilite çalışması 28. gün	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	*A. officinarum* taksonomisi	3
Çizelge 2.2.	*A. officinarum* aktiviteleri	11
Çizelge 2.3.	Galangin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	13
Çizelge 2.4.	Galangin için kullanılan taşıyıcı sistemler	16
Çizelge 2.5.	Lipozom hazırlama yöntemleri	29
Çizelge 2.6.	Lipozom karakteristiği ve karakterizasyon teknikleri	34
Çizelge 3.1.	Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	42
Çizelge 3.1.	Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (Devam)	43
Çizelge 3.2.	Kullanılan kimyasallar	44
Çizelge 3.2.	Kullanılan kimyasallar (Devam)	45
Çizelge 3.3.	Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler	45
Çizelge 3.4.	HPLC-DAD gradient hareketli faz programı	48
Çizelge 3.5.	Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon verileri	49
Çizelge 3.6.	ABTS yöntemi için kalibrasyon verileri	50
Çizelge 3.7.	Toplam flavonoid analizi için kalibrasyon verileri	50
Çizelge 3.8.	CCD için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri	52
Çizelge 3.9.	CCD çizelgesi	53
Çizelge 4.1.	*A. officinarum* ekstraktının HPLC analizi verileri	63
Çizelge 4.2.	*A. officinarum* ekstraktının spektroskopik analiz sonuçları	66
Çizelge 4.3.	Deneysel ve tahmini enkapsülasyon etkinliği yüzdeleri	69
Çizelge 4.4.	Lipozom üretimi için ANOVA analizi verileri	70
Çizelge 4.5.	İkinci derece polinom denklemi	70
Çizelge 4.6.	Lipozom üretimi için optimum koşullar	75
Çizelge 4.7.	Lipozom üretimi için tahmini ve deneysel değerler	75
Çizelge 4.8.	Lipozomların hidrodinamik çap verileri	77
Çizelge 4.9.	Lipozomların boyut verileri	78
Çizelge 4.11.	Lipozomların zeta potansiyel verileri	80
Çizelge 4.12.	Lipozomların polidispersite indeksi verileri	81

1. GİRİŞ

Fenolik bileşikler binlerce farklı yapıda çeşitlilik gösteren sekonder bitki metabolitleridir. Genellikle bitkiler tarafından enfeksiyon, radyasyon gibi çeşitli stres koşullarında üretilirler. Fenolik bileşikler yapılarında en az bir fenol grubu içerir. Bu fenol grubu, bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip aromatik bir halkadan oluşur. Fenolik bileşikler sahip oldukları yapı itibariyle güçlü antioksidan özellikler gösterirler. Yüksek antioksidan aktiviteleri sebebiyle serbest radikal süpürme özellikleri kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik ve oksidatif strese bağlı bozuklukların önlenmesine yardımcı olur. Ayrıca antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, antikanser ve kardiyoprotektif aktiviteler gibi antioksidan kapasiteleri ile ilgili başka biyolojik etkilere de sahiptirler. Bununla birlikte, fenolik maddelerin çoğu, özellikle lipofilik olanlar, moleküler ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak vücutta düşük seviyelerde çözünürlük, stabilite, biyoyararlanım ve hedef doku özgüllüğüne sahiptir. Ayrıca, her bir fenolik madde sınıfı farklı kimyasal yapılara, çözünürlüğe ve oksidasyon duyarlılığına sahiptir. Fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliği ve biyoyararlanımı, biyofonksiyonel özelliklerinin ve olası faydalı etkilerinin göstergesi olarak kabul edilir. Fenolik bileşiklerden daha fazla yararlanma için gastrointestinal sindirim sırasında biyoaktif bileşiklerin salınımı ve çözünürlüğü için bir ipucu olarak biyoerişilebilirlik, biyoyararlanım için önemli bir faktördür. Örneğin, kurkumin, kuersetin, rutin veya polimetoksile flavonoidler gibi lipofilik biyoaktif maddelerin biyoyararlanımı, zayıf çözünürlükleri, yüksek erime noktaları ve kimyasal kararsızlıkları nedeniyle sınırlıdır.

Fenolik bileşiklerin suda düşük çözünürlükleri ve biyoyararlanımlarının sistemik yoldan uygulanmalarını sınırlandırdığı düşünüldüğünde, uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi klinik terapötikler için büyük önem taşımaktadır. Biyoaktif bileşenlerin biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlanımını arttırmak için, moleküllerin kimyasal modifikasyonları, dozaj formülasyonları, diğer diyet bileşenleri ile kombinasyon ve bunların mikro/nano partikül taşıyıcı sistemlerine dahil edilmesi dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar arasında enkapsülasyon en popüler ve en uygulanabilir olanıdır. Enkapsülasyon, nanometre ile milimetre boyutlarında kapsüller

oluşturmak için bir duvar malzemesi ile aktif bileşenleri korumak için kullanılan bir teknolojidir. Enkapsülasyon ile fenolik bileşiklerin depolama sırasında ısı, ışık, nem ve oksijen gibi dış ortamdan kaynaklanan faktörler sebebi ile bozulması önlenir, çözünürlüğü arttırılır, gastrointestinal sistemde stabil kalması sağlanır ve sonuçta biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlanımını arttırılır.

Bu tez çalışmasında yüksek antioksidan aktiviteye ve geniş biyolojik spektruma sahip ancak düşük çözünürlük ve yüksek hidrofobiklik, oksidatif kararsızlık gibi dezavantajları nedeniyle vücutta düşük biyoerişilebilirliğe ve dolayısıyla düşük biyoyararlanıma sahip olan galangin için lipozomal bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda *Alpinia officinarum* Hance bitkisinden galangin ekstraksiyonu gerçekleştirilerek kemometrik optimizasyon teknikleri ile maksimum enkapsülasyon etkinliğinde polielektrolit lipozomlar geliştirilmiştir. Elde edilen polielektrolit lipozomlardaki galanginin biyoerişilebilirliği simüle gastrointestinal koşullarda incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Alpinia officinarum* Hance

Alpinia officinarum Hance (*A. officinarum*), *Zingiberaceae* familyasına ait çok yıllık tıbbi bitkidir (Çizelge 2.1) (Dixit vd., 2014). Çin'e özgü bir bitki olan *A. officinarum* günümüzde Hindistan, Vietnam, Tayland gibi uzak doğu ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir (Gomaa vd., 2022; Kadam vd., 2022). *A. officinarum* Çin'de 'Gao linang jiang', Hindistan'da 'Chitrarathai chooranam', İran'da 'Khoulanjan', Japonya'da 'Ryokyo', Fas'ta 'Khoudenjal', Tayland'da 'Kha Ling', Fransa'da 'Petite galangal', Hollanda'da 'Galanga' ve Türkiye'de 'Havlıcan' olarak bilinir (Abubakar vd., 2018).

Çizelge 2.1. *A. officinarum* taksonomisi

Alem	*Plantae*
Şube	*Tracheophyta*
Sınıf	*Liliopsida*
Takım	*Zingiberales*
Familya	*Zingiberaceae*
Cins	*Alpinia*
Tür	*Alpinia officinarum* Hance



Erişim Tarihi: 26.05.2023 (https://sterpaglie.wordpress.com/alpinia-officinarum-hance/)

Şekil 2.1. *A. officinarum* kısımları

A. officinarum bitkisi yaklaşık 2 m yüksekliğindedir (Şekil 2.1). Çiçekler kısa, basit terminal başaklardır, tübüler kaliks ve üç lobdan oluşan beyaz korollaya sahiptir. Kırmızı damarlı büyük oval bir labellum vardır. Her çiçekte anter taşıyan tek bir stamen ve alt yumurtalıklı bir pistil ve ince bir stil bulunur. Yapraklar paralel, düz damarlı, keskin, yaklaşık 30 cm uzunluğunda ve 5-10 cm genişliğindedir (Attokaran, 2017). Rizomlar koyu kırmızımsı kahverengi renge sahiptir (Koçak ve Yılmaz, 2022; Wilson, 2015). İç kısımda koyu renkli bir merkez, daha geniş, soluk renkli bir katmanla çevrilidir ve bu katman kurudukça koyulaşır (Şekil 2.2). Kokusu aromatik, tadı ise keskindir (Lim, 2016).



Erişim Tarihi: 26.05.2023 (https://www.amaperbene.it/galanga-alpinia-officinarum-hance/)

Şekil 2.2. *A. officinarum* kısımları

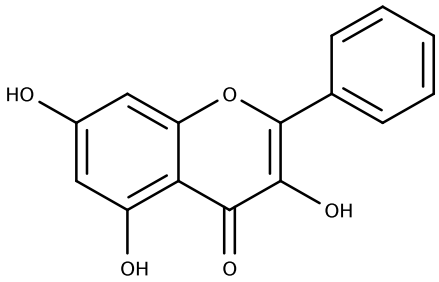
A. officinarum hem Ayurveda hem de Çin tıbbında çok eski zamanlardan beri (Çin'de MS 500) ve Avrupa'da Orta Çağ'dan beri kullanılmaktadır (Kadam vd., 2022). *A. officinarum rizomu*, Çin'de ilk kez (MS 500 civarı) Ünlü Hekimlerin Ek Kayıtları (Ming Yi Bie Lu) ve Çin Farmakopesi'nin çeşitli baskılarında ilaç olarak kaydedilmiştir (Zhou vd., 2018). Güney Afrika, Asya ve Avrupa'da da yüzyıllardır baharat ve ilaç olarak bilinmektedir (Ye vd., 2019). Rizomun esas olarak sindirim sistemi üzerinde etkili olan, aynı zamanda ağrıyı dindiren, ateşi düşüren ve bakteri ve mantar enfeksiyonlarını kontrol eden çok etkili bir bitki olduğu bildirilmektedir (Lim, 2016). *A. officinarum* geleneksel Çin tıbbında karın ağrısı, kusma ve hıçkırığın yanı sıra ishal için kullanılır. Hindistan ve güneybatı Asya'da midevi, antienflamatuar, balgam söktürücü ve sinir toniği olarak kabul edilir. Hıçkırık, hazımsızlık, mide ağrısı, romatoid artrit ve ateş tedavisinde kullanılır. Batı'da ise çoğunlukla gaz, hazımsızlık, kusma ve mide ağrısı için kullanılır. Ağız ülserlerini ve diş eti ağrılarını hafifletmek için infüzyonu önerilir (Chevallier, 2016). Vietnam'da haşlanmış rizomdan elde edilen meyve suyu sindirimi uyarmak, mide ağrısı ve sıtmayı tedavi etmek için kullanılır (Hanh ve Binh, 2014). Şarap veya sirke içinde ezilmiş rizom, saçkıran cilt enfeksiyonları için topikal olarak kullanılır (Lim, 2016). Türkiye'de topikal hemostatik ajan olarak onaylanan Ankaferd kan durdurucunun bitkisel bileşenlerinden biridir. İlaç olarak kullanımının yanı sıra birçok Asya ve Avrupa ülkesinde baharat ve yiyeceklerde aroma verici olarak da kullanılmaktadır. Rusya'da sirke ve yerel bir likör olan nastoikayı tatlandırmak için, Hindistan'da ise parfümlerde ayrıca meyve ve sebzelerde koruyucu olarak kullanılır (Abubakar vd., 2018).

Indrayan vd. (2009) tarafından *A. officinarum* rizomlarının besin içeriği enerji 348,9 cal/100 g, nem %12,4, ham protein %5,25, karbohidrat %76,9, ham yağ %2,26, ham lif %17, kül %3,22, K 3570 ppm, Ca 438,8 ppm, Na 152,8 ppm, Mg 569,5 ppm, Fe 85,50 ppm, Mn 72,30 ppm, Zn 9,331 ppm, Cu 0,753 ppm, Ni 21,02 ppm ve Cr 0,680 ppm olarak belirlenmiştir (Lim, 2016). *A. officinarum* aynı zamanda karbohidratlar, alkaloidler, glikozitler, fenolik bileşikler, proteinler, serbest amino asitler, saponinler, terpenoidler, tanenler ve steroidlerin varlığı ile geniş bir içeriğe sahiptir (Dixit vd., 2014; Srividya vd., 2010). Bitkinin en aktif kısmı rizomudur (Koçak ve Yılmaz, 2022). *A. officinarum* rizomu fenolik bileşikler, diarilheptanoidler ve uçucu yağlar açısından zengindir ve flavonoidler temel bileşenleridir (Zhou vd., 2018).

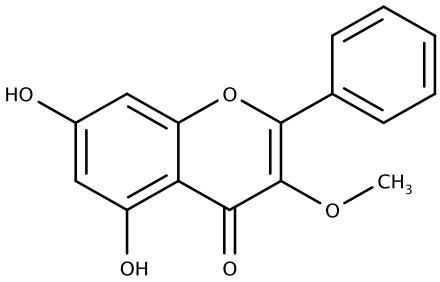
Yasukawa vd. (2008), *A. officinarum* rizomlarının metanol ekstraktının çeşitli fraksiyonlarında 7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-4-hepten-3-on, 5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon, 5-metoksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon, 5-metoksi-1,7-difenil-3-heptanon, 1,7-difenil-4-hepten-3-on ve 7-(4-hidroksifenil)-1-fenil-4-hepten-3-on bulunduğunu bildirmişlerdir (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). Matsuda vd. (2009), *A. officinarum* rizomlarının aseton ekstraktının çeşitli fraksiyonlarında galangin, kamferid, kamferol, pinobanksin, zingeron, 3-fenilpropanoik asit, 3,5-dihidroksi-1,7-difenilheptan, 7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-hept-4-en-3-on, 5-hidroksi-1,7-difenil-3-heptanon, 5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon bileşiklerini izole etmişlerdir (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4).

Köse vd. (2015), *A. officinarum* rizomlarının hidroetanolik ekstraktında kaemferol, *p*-kumarik asit, apigenin, luteolin, kuersetin ve isoramnetin, bunlara ek olarak etanol ekstraktında *p*-hidroksibenzoik asit, su ekstraktında ise kamferol, *p*-kumarik asit, apigenin ve isoramnetin bulunduğunu bildirmişlerdir. Zhang vd. (2015), *A. officinarum* rizomları ve toprak üstü kısımlarını kullanarak elde ettikleri metanol ekstraktında krisin, pinocembrin, tektokrisin, apigenin, galangin, 3-hidroksimetil galangin, asasetin, kaempferol, kaemferid, kuersetin, isoramnetin, luteolin, izalpinin, rutin, heksahidroksikurkumin, hannokinol bileşiklerini tespit etmişlerdir.

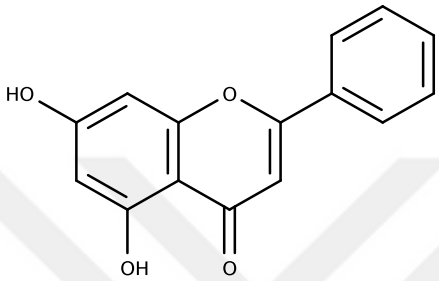
Li vd. (2021), *A. officinarum* rizomlarının etanol ekstraktında kuersetin, kaemferol, kurkumin ve galangin, Zhang vd. (2014), *A. officinarum* rizomlarının etanol ekstraktında pinocembrin, galangin, 3-O-metilgalangin, kamferid ve pinobanksin, Song vd. (2021), *A. officinarum* rizomlarının su ekstraktında protokatekuik asit, epikateşin ve galangin tespit ederken, Pirzadeh vd. (2021), *A. officinarum* rizomlarının hidroalkolik ekstraktında kuersetin, kaemferol ve galangin tespit etmiştir.



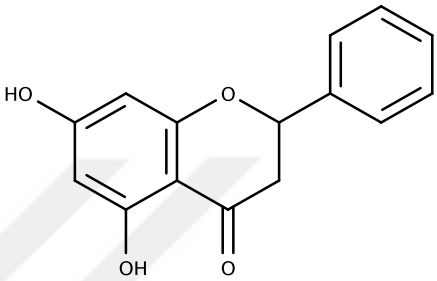
Galangin



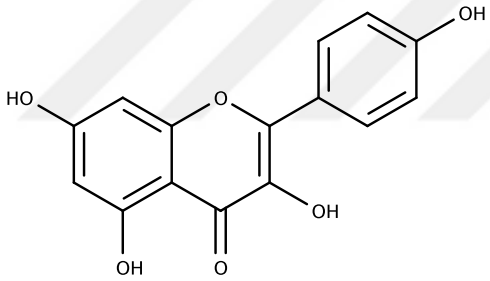
3-*O*-metil galangin



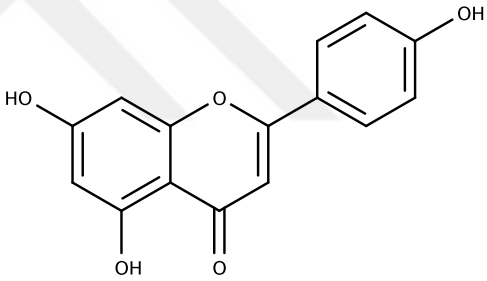
Krisin



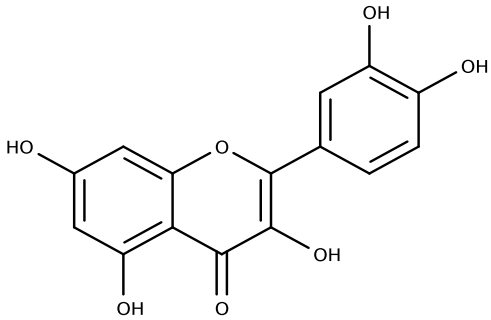
Pinocembrin



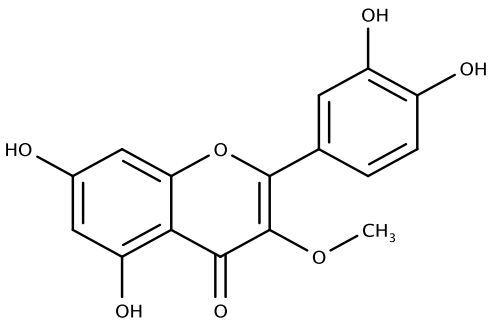
Kampferol



Apigenin

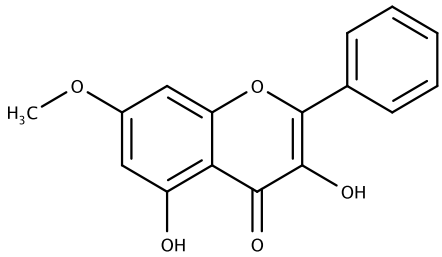


Kuersetin

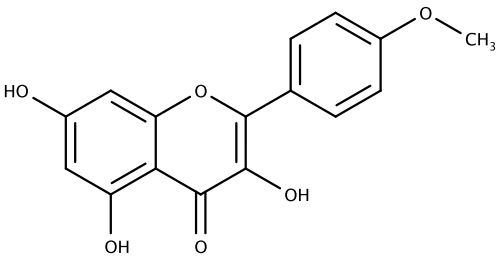


3-*O*-metil kuersetin

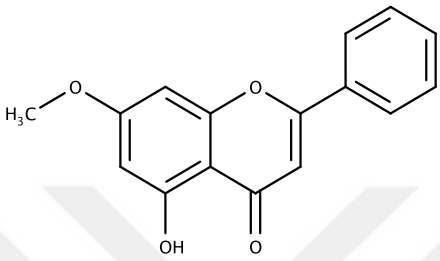
Şekil 2.3. *A. officinarum* fenolik bileşikleri



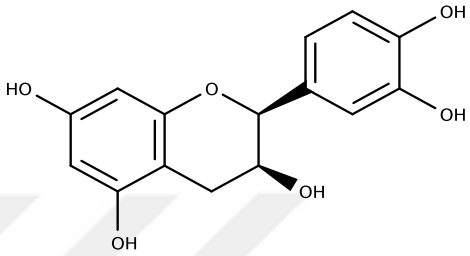
İzalpinin



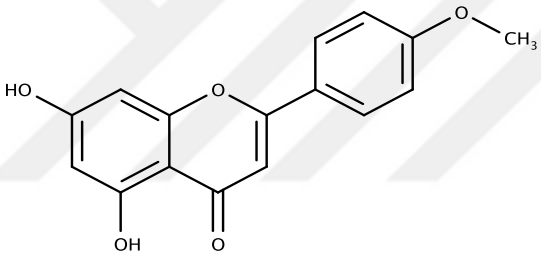
Kamferid



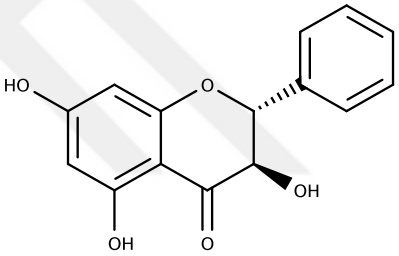
Tektokrisin



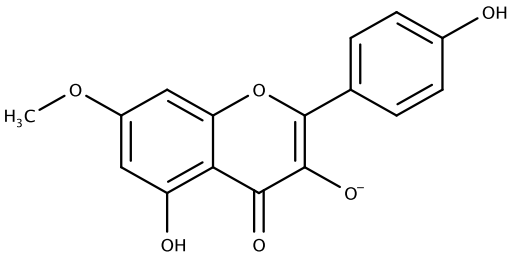
Epikateşin



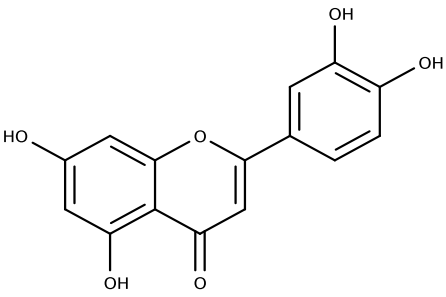
Asasetin



Pinobanksin

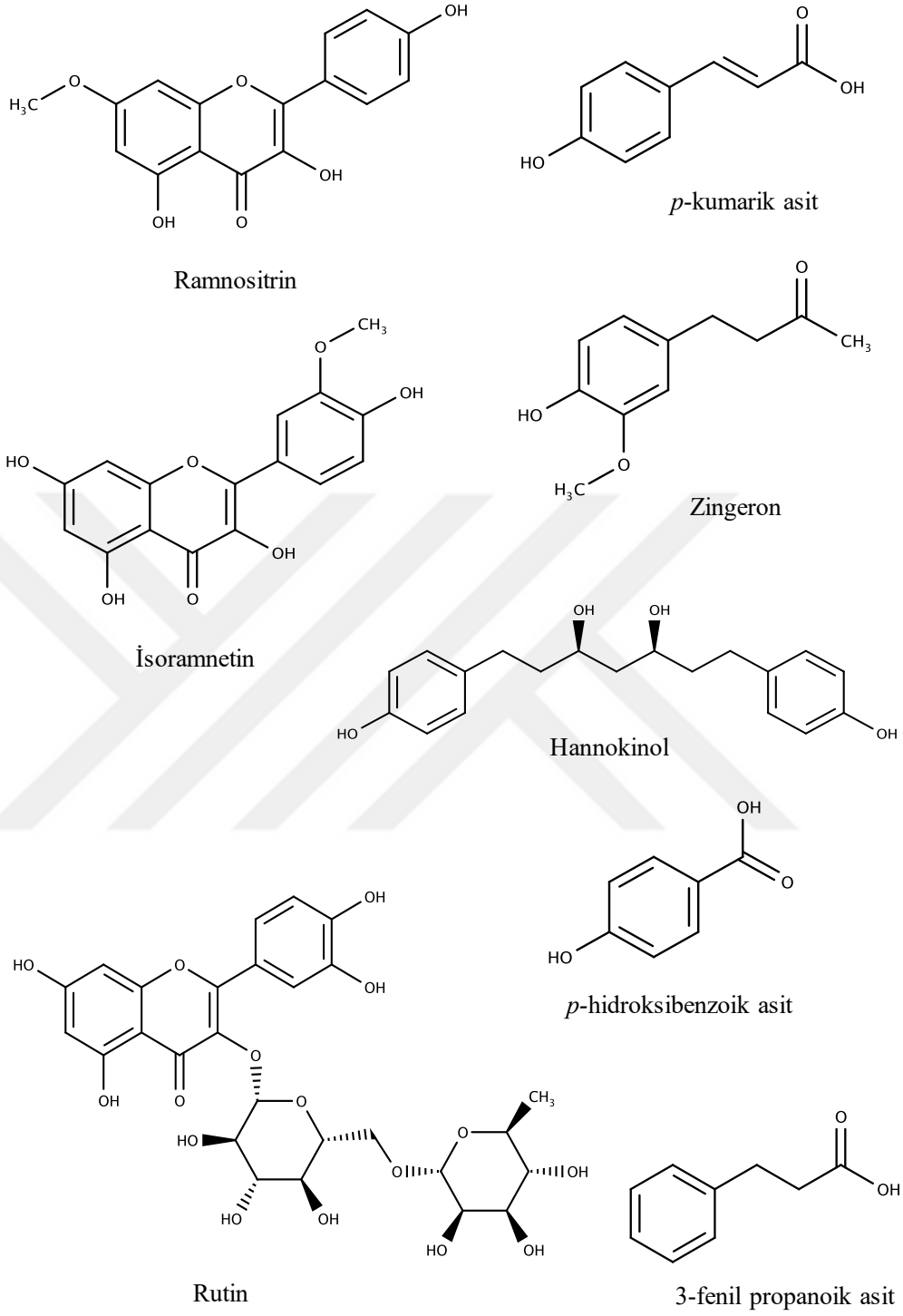


Kuersetin-7-metil eter

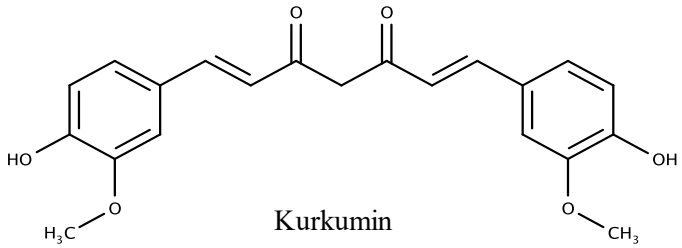


Luteolin

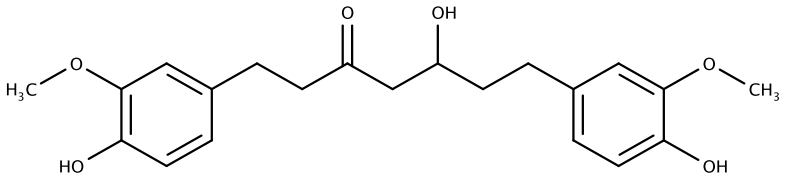
Şekil 2.3. *A. officinarum* fenolik bileşikleri (Devam)



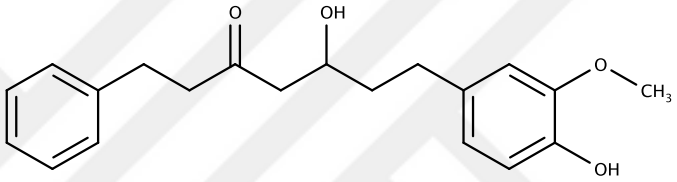
Şekil 2.3. *A. officinarum* fenolik bileşikleri (Devam)



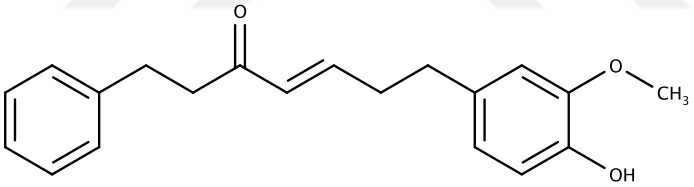
Kurkumin



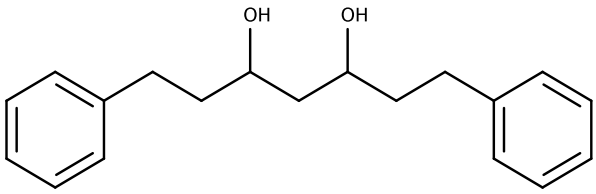
Heksahidroksikurkumin



5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon



7-(4-hidroksifenil)-1-fenil-4-hepten-3-on



3,5-dihidroksi-1,7-difenilheptan

Şekil 2.3. *A. officinarum* fenolik bileşikleri (Devam)

A. officinarum' un yüksek biyoaktif bileşen içeriği sayesinde antioksidan, antibakteriyel, anti-inflamatuar, antikanser, anti-genotoksik, antifungal ve anti-tümör gibi çeşitli tıbbi aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.2) (Awad vd., 2020).

Çizelge 2.2. *A. officinarum* aktiviteleri

Biyoaktif fraksiyon / Bileşik	**Aktivite**	**Kaynak**
Su ekstraktı	Anti-atopik dermatit	Song vd., 2021
Metanol ekstraktı	Anti-bakteriyel	Fu vd., 2022
Etanol ekstraktı		Xavier ve Agatheeswaran, 2010
Diarilheptanoidleri		Zhang vd., 2010
5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon		Subramanian vd., 2009
Kloroform ekstraktı	Anti-emetik	Shin vd., 2002
Metanol ekstraktı	Anti-enflamatuvar	Yasukawa vd., 2008
Etanol ekstraktı		Lee vd., 2009
Diterpenleri		Wen vd., 2016
5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon		Subramanian vd., 2009
Su ekstraktı	Anti-fotoyaşlanma	Jung vd., 2022
Esansiyel yağı	Anti-fungal	Tongchure ve Chanprapai, 2022
Diarilheptanoidleri	Anti-kanser	An vd., 2008
Kloroform, su, etanol, petrol eteri ekstraktı		Suja ve Chinnaswamy, 2008
Galangin		Heo vd., 2001
Su, etanol, su/etanol ekstraktı	Anti-kolinerjik	Köse vd., 2015

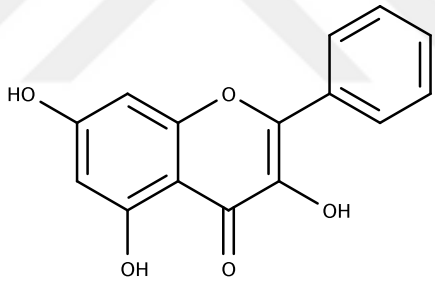
Çizelge 2.2. *A. officinarum* aktiviteleri (Devam)

Biyoaktif fraksiyon / Bileşik	**Aktivite**	**Kaynak**
Su, etanol, su/etanol ekstraktı	Anti-melanom	Matsuda vd., 2009
Su, etanol ekstraktı	Anti-mikrobiyal	Avci vd., 2020
Etanol ekstraktı		Srividya vd., 2010, Huang vd., 2008
Metanol ekstraktı	Anti-oksidan	Dou vd., 2010 Ly vd., 2003
Su, etanol ekstraktı		Avci vd., 2020
Etanol ekstraktı		Srividya vd., 2010
Esansiyel yağı		Nguyen vd., 2019
Su, etanol, su/etanol ekstraktı		Köse vd., 2015
Metanol ekstraktı	Anti-proliferatif	Omoregie vd., 2013 Ghil, 2013
Etanol ekstraktı		Samarghandian vd., 2014
Galangin	Anti-tümör	Yakufu vd., 2021
Aseton/su ekstraktı		Matsuda vd., 2009
Diarilheptanoidleri	Anti-viral	Konno vd., 2011
7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-4*E*-hepten-3-on, (5S)-5-hidroksi-7-(4-hidroksifenil)-1-fenil-3-heptanon		Sawamura vd., 2010
Etanol ekstraktı	Gastroprotektif	Gong vd., 2020
Galangin, kamferid, 3-metoksigalangin		Lin vd., 2020
Galangin	Anti-genotoksik	Heo vd., 2001

2.2. Galangin

Galangin, *A. officinarum*, *Alpinia galanga, Plantago major* L., *Alnus pendula* Matsum ve *Scutellaria galericulata* L., *Helichrysum aureonitens* bitkilerinde bulunan flavonoidlerin flavonol sınıfına ait doğal bir polifenoldür (Chen vd., 2022; Tuli vd., 2022; Wang vd., 2021). Galangin diğer bitkilerin yanı sıra özellikle *A. officinarum* rizomlarında çok yüksek oranda bulunur ve *A. officinarum*'un ana aktif bileşenidir (Lu vd., 2021). *A. officinarum* rizomlarında 2,63-11,1 mg/g arasında değişen konsantrasyonda galangin bulunmaktadır (Mak vd., 2018). Galangin'in önemli fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Galangin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

Ad	Galangin
Sinonim	Norizalpinin, 4H-1-benzopiran-4-on, 3,5,7-trihidroksi-2-fenil, 3,5,7-trihidroksiflavon
Yapı	
Molekül formülü	$C_{15}H_{10}O_5$
Molekül ağırlığı	270,24 g/mol
Kütle	270,05282342 g
Erime noktası	214-215°C
Renk	Soluk-koyu sarı
Çözünürlük	Kloroform, diklorometan, etil asetat, dimetilsülfoksit, aseton ve etanolde çok iyi çözünür, suda az çözünür.
Fiziksel hal	Katı
pKa	6,28 (en güçlü asidik), -3,9 (en güçlü bazik)
λ_{max}	360 nm

Çizelge 2.3'te verilen galanginin yapısına bakıldığında A halkasının C5 ve C7 pozisyonunda, C halkasının C3 pozisyonunda olmak üzere üç hidroksil grubuna, C halkasının C4 pozisyonunda okso grubuna ve C halkasının C2 ve C3 pozisyonunda bir çift bağa sahiptir. Galanginin sahip olduğu hidroksil grupları ve 4-okso grubu ile konjuge haldeki C2-C3 çift bağı ile elektron delokalizasyonu yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Ami vd., 2007).

Yüksek antioksidan aktivitesinin yanı sıra galangin geniş biyolojik spektruma sahiptir. Galangin anti-kanser, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal, anti-iskemik, anti-hipertropik, anti-vitiligo, anti-obezite, anti-artirit, anti-diyabetik, nöroprotektif, hepatoprotektif aktiviteler göstermektedir (Mak vd., 2018). Çeşitli çalışmalar galanginin hepatoselüler karsinom, kolon kanseri, yumurtalık kanseri, insan meme kanseri, melanom ve prostat kanseri gibi farklı kanser hücreleri üzerinde antikanser etkiler gösterdiğini bildirmiştir (Chen vd., 2019; Rampogu vd., 2021). Bu çeşitli terapötik aktivitelere düşük sitotoksisite ve genotoksisite eşlik eder (Ye vd., 2019).

Alfwuaires (2022), galanginin sıçanlarda metotreksat kaynaklı karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkisini incelemiştir. Sıçanlara 10 gün boyunca galangin ve 7. günde tek doz metotreksat (20 mg/kg) uygulanmıştır. Metotreksat hepatik reaktif oksijen türlerini, nitrik oksidi, malondialdehiti ve pro-enflamatuvar sitokinleri arttırmış ve antioksidan enzimleri azaltmıştır. Galangin, metotreksat uygulanan sıçanlarda karaciğer hasarını hafifletmiş, karaciğer fonksiyonunu, oksidatif stresi ve inflamasyon belirteçlerini iyileştirmiş ve hücre içi antioksidanları arttırmıştır. Bu sonuçlar galanginin metotreksat kaynaklı karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Chen vd. (2022), galanginin Parkinson hastalığı üzerine aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre galangin, Parkinson hastalığının bir göstergesi olan dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu inhibe etmiştir ve reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltmıştır. Bu sonuçlar galanginin parkinson hastalığının tedavisinde etkili bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Lu vd. (2007), *A. officinarum* flavonoidlerinin B16 fare melanom hücrelerinde melanin biyosentezi, tirozinaz inhibisyonu ve UV absorpsiyonu üzerindeki beyazlatıcı etkileri araştırmışlardır. Galangin 1,632 mg /10^5 hücre melanini 1,161 mg /10^5 hücreye düşürürken, melanin üretimini 29 mg/mL (107,4 mM) konsantrasyonda %28,86 oranında inhibe ettiğini ve tirozinazı 21,23 µg/mL'den az konsantrasyonda rekabetçi inhibisyon göstererek inhibe ettiğini ayrıca galanginin UV-B bölgede 270-290 nm aralığında geniş bir absorpsiyon bandı gösterdiğini bildirmişlerdir. Bulgular galanginin beyazlatıcı ve antikanser bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Galangin çeşitli hastalıkların tedavisi için yüksek aktiviteler gösterse de kullanımı sınırlıdır. Çizelge 2.3'te verildiği üzere galanginin suda çözünürlüğünün düşük olması (Abbas vd., 2023; Prasad ve Kumari, 2022), sıcaklık, pH ve ışıktan kolaylıkla etkilenmesi (Lu vd., 2021), bunlara ek olarak oksidatif stabilitesinin yetersizliği ve bağırsak emiliminin zayıf olması sonucunda oldukça düşük biyoyararlanıma sahiptir (Hajipour vd., 2021; Jeong vd., 2016; Kim vd., 2014; Li vd., 2018; Sabry vd., 2021).

Ye vd. (2019) çalışmalarında galanginin sıçan plazma ve dokusundaki farmakokinetiğini incelemişlerdir. Farmakokinetik sonuçları galanginin hızlı emildiğini (t_{max} 0,25 sa) ve üç farklı dozajdan sonra hızlı elimine olduğunu ($t_{1/2}$ <1,1 sa) ortaya koymuştur. Doku dağılım analizi galanginin karaciğer, böbrek, dalak ve akciğerde bol miktarda, beyinde ise daha az miktarda bulunduğunu göstermiştir. Galanginin biyoyararlanımı ise yaklaşık %7,6'dır.

Chen vd. (2015), galangin çözeltisinin oral ve intravenöz uygulamasından sonra sıçan plazmasındaki galangin metabolitlerini tanımlayarak, galangin ve metabolitlerinin farmakokinetik davranışlarını araştırmışlardır. Çalışmaya göre sıçan plazmasındaki başlıca galangin metabolitleri glukuronidler ve sülfatlardır. Galangin'in sıçanlara oral uygulanmasından sonra galangin glukuronidasyona uğrarken, intravenöz uygulanmasından sonra sülfatlanmaya uğramıştır. Çalışma sonunda serbest galanginin yaklaşık %3,67 gibi çok düşük oral biyoyararlanım gösterterdiğini bildirmişlerdir.

Curti vd. (2019), kahverengi propolis ekstraktında en yüksek miktarda bulunan galangin ve krisinin biyoyararlılıklarını incelemek için sıçanlara akut ve uzun süreli oral uygulamanın ardından serum galangin ve krisin miktarlarını belirlemişlerdir. Hem akut

hem de uzun süreli uygulamanın ardından, fare plazmasında ne galangin ne de krisin tespit edilememiştir. Ancak akut uygulamadan 5 dk sonra galanginin glukuronid metaboliti tespit edilebilmiştir. Bu da galanginin oral uygulamadan sonra hızla glukuronidasyona uğradığını bunun da düşük biyoyararlanıma sebep olduğunu göstermektedir.

Galanginin sahip olduğu düşük biyoyararlanımdan kaynaklanan sınırlamaların üstesinden gelmek için çeşitli taşıyıcı sistemler önerilmiştir (Tuli vd., 2022). Literatürde galangin için kullanılan taşıyıcı sistemlerin bir kısmı Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Galangin için kullanılan taşıyıcı sistemler

Taşıyıcı sistem	**Aktivite**	**Kaynak**
Lipozom	Antioksidan	Landi-Librandi vd., 2011
Lipozom	Antioksidan	Landi-Librandi vd., 2012
Hidrojel	Antibakteriyel	Jeong vd., 2016
Lipozom	Hepatoprotektif	Zhu vd., 2018
Selenyum nanopartikül	Antikanser	Li vd., 2018
Polimerik misel	Hipoürisemik	Zhu, vd., 2018
Lipozom	Antitümör	Yao vd., 2019
Polimerik misel	Karaciğer	Patil vd., 2019
Niozom	Antikanser	Sabry vd., 2021
Mikro emülsiyon	Antioksidan	Lu vd., 2021
Nano lipit taşıyıcı	Antikanser	Hajipour vd., 2021
Nanopartikül	Karaciğer	Mohammadi vd., 2022
Nanopartikül	Hepatik fibrozis	Xiong vd., 2023
Altın nanopartikül	Antikanser	Qaddoori ve Al-Shmgani, 2023

Patil vd. (2019), karaciğer hedefli galangin yüklü galaktozillenmiş pluronik F68 polimerik miselleri hazırlamışlardır ve hazırlanan misellerin biyodağılımı değerlendirilmiştir. Galangin çözeltisine kıyasla galangin yüklü misellerin biyodağılım çalışmaları, karaciğerdeki galangin miktarında 15 dk sonra yaklaşık 2,6 kat ve 30 dk sonra yaklaşık 7,18 kat kadar önemli bir artış göstermiştir. Bu da galanginin misellere yüklenmesi ile galanginin metabolize olmasını ve eliminasyonunu yavaşlatmıştır.

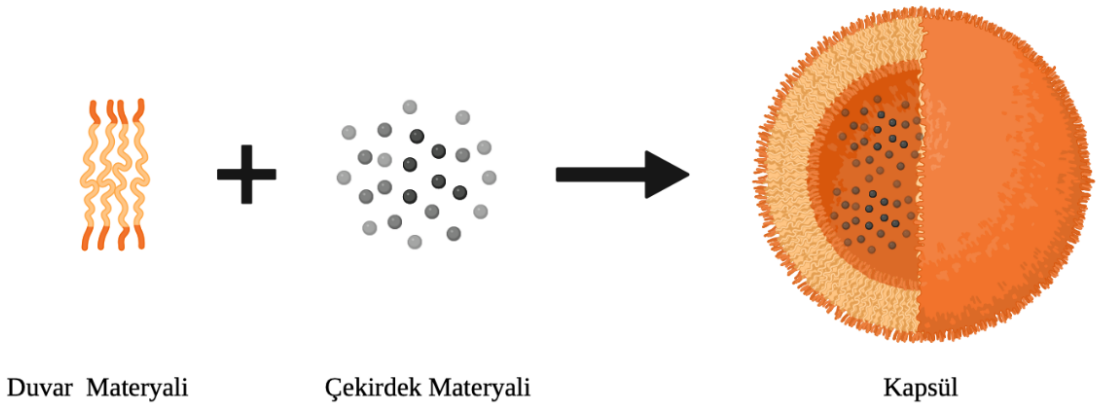
Abbas vd. (2022), meme kanseri tedavisinde etkili bir ajan olabilecek galangin/β-siklodekstrin kompleksi geliştirmişlerdir. Serbest galanginin MCF-7 hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi üzerine IC_{50} değeri 32,45 μg/mL iken galangin/β-siklodekstrin kompleksinin IC_{50} değeri 21,09 μg/mL'dir. 50 μg/mL serbest galanginin MCF-7 hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi %64,33 iken galangin/β-siklodekstrin kompleksinin %83,33'tür. Elde edilen sonuçlara göre serbest galangine kıyasla daha az konsantrasyonda galangin/β-siklodekstrin kompleksi kullanılarak daha yüksek biyoaktivite elde edilmiştir ve biyoyararlanım arttırılmıştır.

Qaddoori ve Al-Shmgani (2023), galangin yüklü altın nanopartiküller geliştirmişlerdir. Serbest galangin (100 μM) MCF-7 meme kanseri hücrelerini %60,14 inhibe ederken galangin yüklü altın nanopartiküller %66,34 inhibe etmiştir. Galangin yüklü altın nanopartiküller, serbest galanginden daha yüksek sitotoksik etkilere sahiptir ve bunun nedeni serbest galangine kıyasla hücrelere nüfuz etme, hücrelerde birikme ve hücrelere strese sokarak apoptoza yol açma yeteneğinin gelişmiş olmasıdır.

Xiong vd. (2023), hepatik fibrozis tedavisi için galangin yüklü nanopartiküller geliştirmişlerdir. Çalışmaya göre oral yolla uygulanan serbest galangin ve galangin-nanopartiküller karşılaştırıldığında, serbest galanginin yarılanma ömrü 3,64 ± 0,11 iken galangin yüklü nanopartiküllerin 7,09 ± 0,35'tir. Serbest galangin fare serumunda 12 sa tespit edilebilirken, galangin yüklü nanopartiküller 24 sa boyunca tespit edilebilmiştir. Fare serumundaki galangin konsantrasyonu ise serbest galangine göre 2,55 kat daha yüksektir. Bu sonuçlar kullanılan nanopartiküler sistemin galanginin biyoyararlanımda önemli bir artışa neden olduğunu ve galanginin hidrofobik özelliğinden kaynaklanan düşük biyoyararlanım sınırlamasının üstesinden gelindiğini göstermiştir.

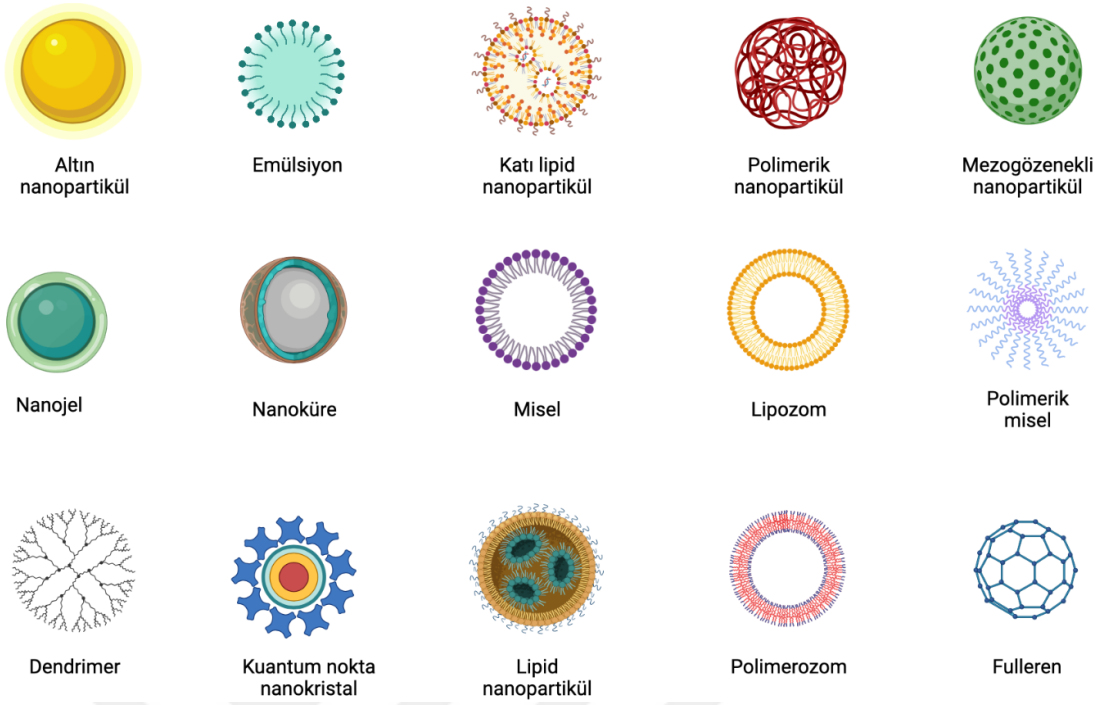
2.3. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, birçok alanda kullanıma uygun olan ancak biyoyararlanımı düşük olan polifenoller gibi biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımını, çözünürlüğünü, stabilitesini, çevresel etkenlerden korunmasını ve kontrollü ilaç salınımını arttırmaya odaklanan bir tekniktir (Subramani ve Ganapathyswamy, 2020). Enkapsülasyon tekniği ile polifenoller, pigmentler, probiyotikler, vitaminler, mineraller, peptitler ve ilaçlar (Khorasani vd., 2018; Zabot vd., 2022) kapsüllenebilir. Bu teknik, biyoaktif bileşiklerin karbonhidrat, lipit ve polimer gibi bir duvar malzemesi ile kaplanarak nano veya mikro boyutlu kapsüller üretilmesi işlemidir (Şekil 2.5) (Witika vd., 2021). Enkapsülasyon işlemi 1-1000 µm aralığında kapsüllerin oluşturulduğu mikroenkapsülasyon ve 1-1000 nm aralığında kapsüllerin oluşturulduğu nanoenkapsülasyon olmak üzere ikiye ayrılır (Saifullah vd., 2019).



Şekil 2.4. Enkapsülasyon işlemi

Nanoenkapsülasyon enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi, hedefleme, stabilite, biyoyararlanım ve kontrollü salım profilini önemli ölçüde geliştirdiği için uzun yıllardır birçok alanda ilgi görmektedir (Shishir vd., 2018). Bu teknikle partiküller, kapsüller, niozomlar, küreler, emülsiyonlar, miseller, dendrimerler, jeller, kristaller ve lipozomlar gibi nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler (Şekil 2.6) geliştirilmekte ve üretilmektedir (Witika vd., 2020).



Şekil 2.5. Enkapsülasyon ile elde edilen partikül sistemleri

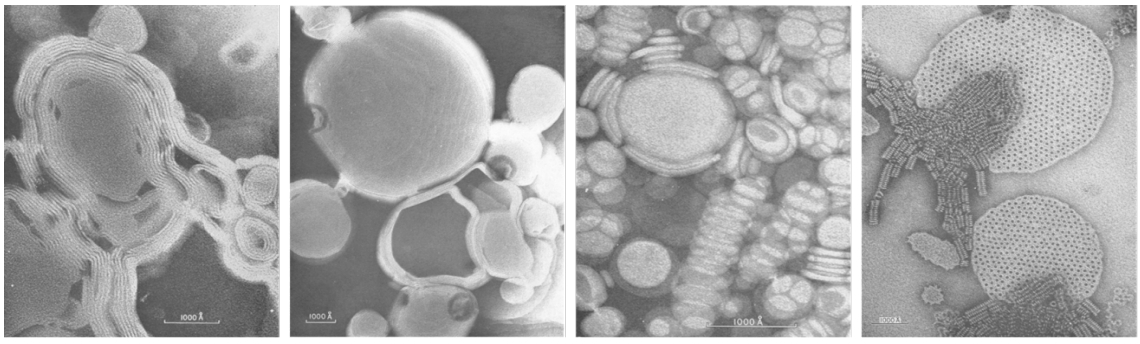
Nanoenkapsülasyonun avantajları şu şekilde sıralanabilir;

- Kapsüllenen biyoaktif bileşenin stabilitesini arttırır (Pateiro vd., 2021),
- Kapsüllenen biyoaktif bileşeni pH, sıcaklık gibi çevresel faktörlerden korur, kimyasal ve biyolojik parçalanmasını engeller (Bratovcic ve Suljagic, 2019; Pateiro vd., 2021),
- Kapsüllenen biyoaktif bileşenin istenmeyen reaksiyonlara girmesi engellenir (Zabot vd., 2022),
- Kapsüllenen biyoaktif bileşenin depolama süresini arttırır ve raf ömrünü uzatır (Zabot vd., 2022),
- Kapsüllenen biyoaktif bileşenin kontrollü olarak salınmasını sağlar (Bratovcic ve Suljagic, 2019),
- Kapsüllenen biyoaktif bileşenin biyoyararlanımını arttırır (Paolino vd., 2021),
- Kapsüllenen biyoaktif bileşenin çözünürlüğünü arttırır (Paolino vd., 2021),
- İstenmeyen tat ve kokuyu maskeler (Khorasani vd., 2018).

2.4. Lipozom

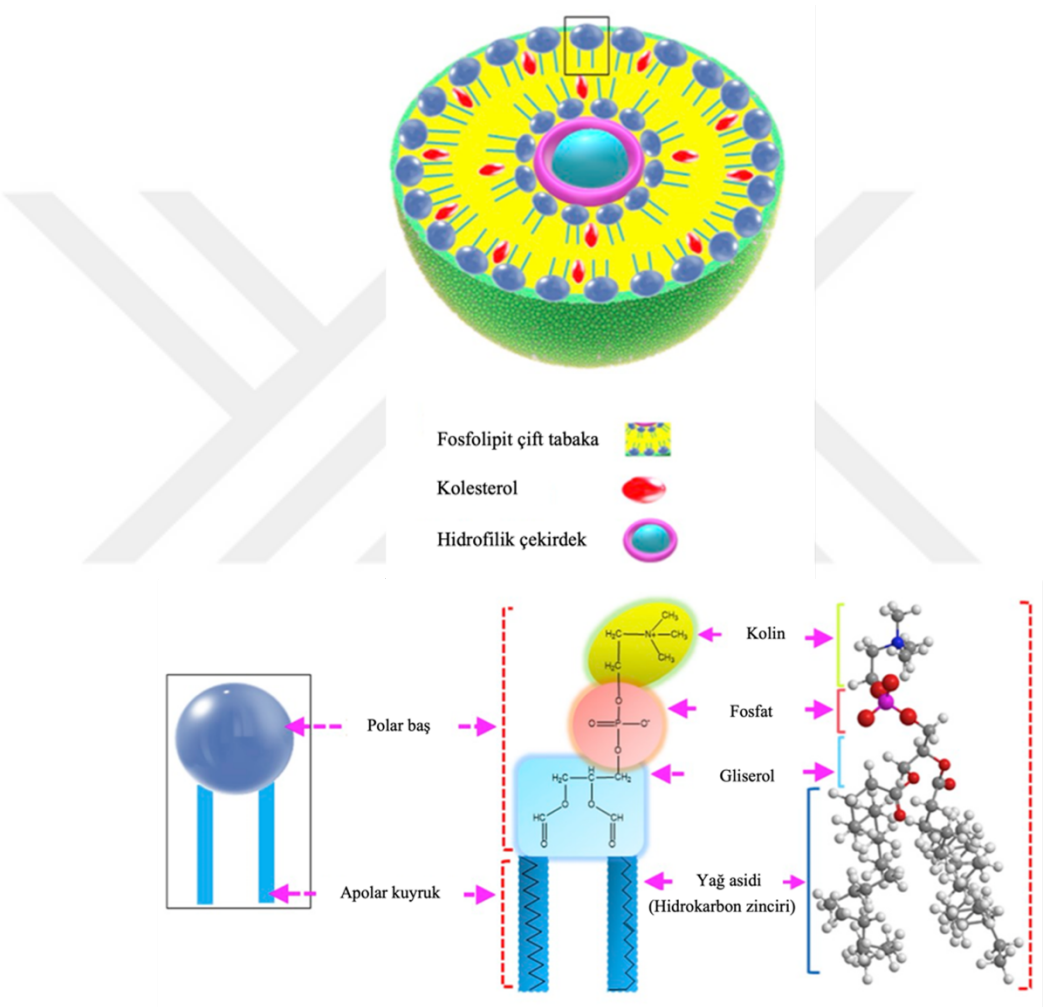
Lipozomlar, bir veya birkaç eşmerkezli kapalı lipit çift katmana sahip, amfifilik moleküllerden (ağırlıklı olarak fosfolipitler) oluşan küresel nano boyutlu veziküllerdir (Tomsen-Melero vd., 2022). Lipozomlar hücre zarını taklit eden yapay taşıyıcı sistemlerdir (Abuwatfa vd., 2022). 1960'lı yıllarda Cambridge Babraham Enstitüsü'nde lipitlerin, özellikle de fosfolipitlerin kanın pıhtılaşma süreci üzerindeki etkisini inceleyen Alec D. Bangham (1921-2010), tesadüfen ilk lipozomları gözlemlemiştir (Rommasi ve Esfandiari, 2021). Dr. Bangham, kurutulmuş lipitlerin yeterli miktarda suyla temas ettiğinde kendiliğinden yeniden düzenlendiğini fark etmiş ve lipitlerin kendiliğinden yeniden düzenlenmesinin lipitler ve su arasında itme etkisi yaratan etkileşimler tarafından yönlendirildiğini göstermiştir. Bu gerçek, amfifilik moleküllerin uzayda dağılımına katkıda bulunarak küresel bir şekil tanımlar ve moleküler etkileşimlerle sistemin Gibbs serbest enerjisini en aza indirir. Bu açıklamaya göre, ince bir lipit tabakası hidratlandığında ateş balonu şeklini alarak katlanmaya başlar. Sonunda, lipit tabakası kapanarak iç çekirdeğe su hapseder ve küresel bir şekil alır (Trucillo vd., 2020).

Dr. Bangham 1964 yılında yayınladığı bir araştırma makalesinde ilk lipozomları bildirilmiştir (Şekil 2.7) (Rommasi ve Esfandiari, 2021). Başlangıçta veziküller ‘‘Banghasomes’’ veya ‘‘çok katmanlı smektik mezofazlar’’ olarak adlandırılmış, daha sonra Gerald Weissmann tarafından yağ anlamına gelen ‘‘lipos’’ ve vücut anlamına gelen ‘‘soma’’ kelimelerinden türetilmiş ‘‘liposomes’’ kelimesi önerilmiştir (Riaz vd., 2018).



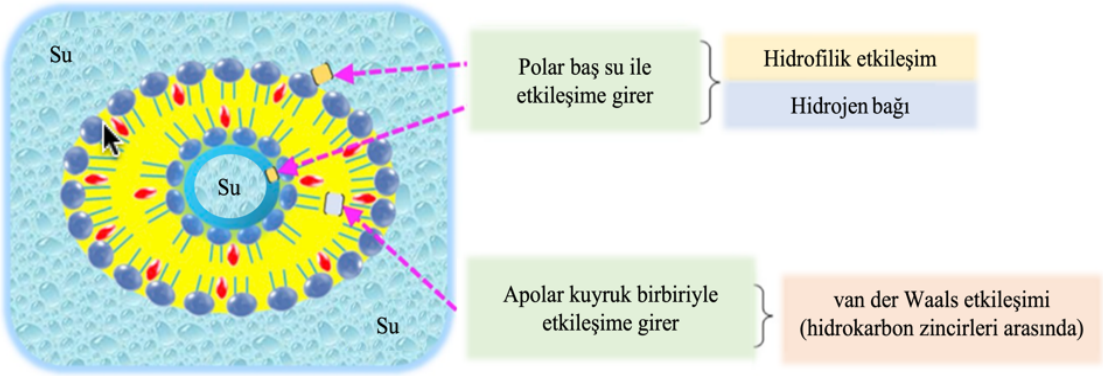
Şekil 2.6. İlk gözlemlenen lipozomlar

Lipozomların yapısal bileşeni fosfolipitler ve kolesteroldür (Juhairiyah ve de Lange, 2021). Fosfolipit molekülleri, sulu fazlara (iç ve dış) çekilen polar bir baş gruba ve su tarafından itilen uzun bir hidrokarbon zincirinden oluşan apolar bir kuyruk grubuna sahiptir. Polar baş kolin ($C_5H_{14}NO^+$), fosfat (PO_4^{3-}) ve gliserolden ($C_3H_8O_3$) oluşurken, polar olmayan kuyruk hidrokarbon zincirinden (yağ asidi) oluşur (Şekil 2.8) (Shishir vd., 2019).



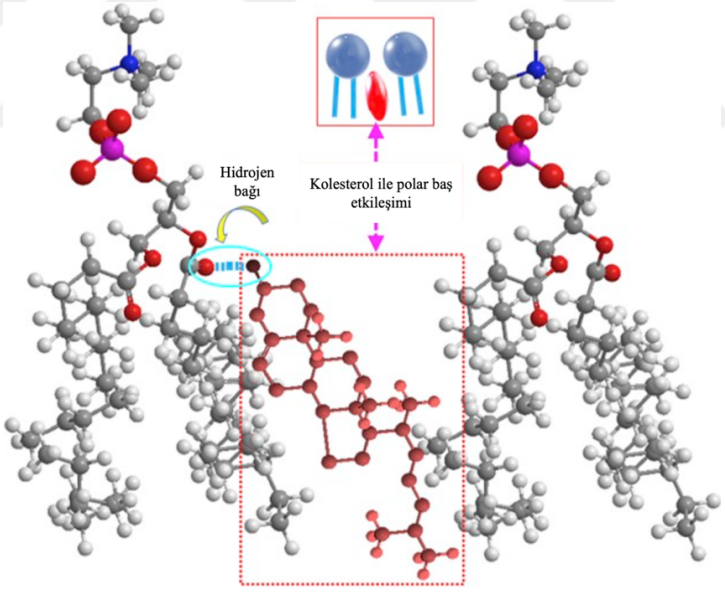
Şekil 2.7. Lipozom ve lipozomların yapısal bileşeni

Fosfolipitler suya maruz kaldığında, lipitler ve su molekülleri arasındaki hidrofilik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağı yoluyla kendiliğinden kapalı çift katmanlı tabakalar oluşturur (Şekil 2.9) (Shishir vd., 2019).



Şekil 2.8. Fosfolipitlerin etkileşimleri

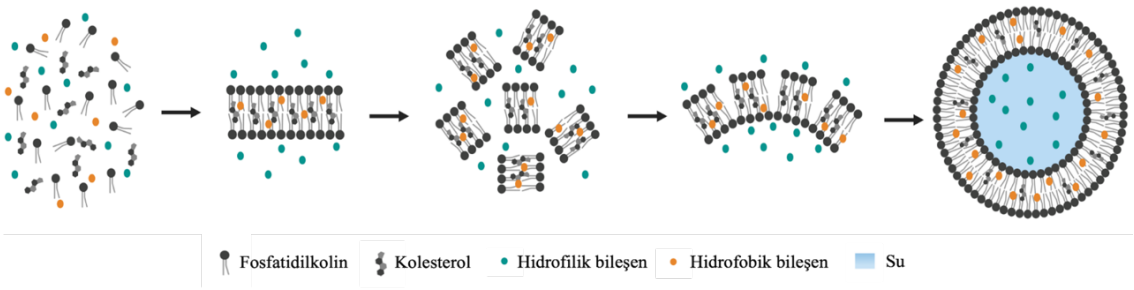
Kolesterol molekülleri ise baş bölgesindeki hidroksil grubu ile hidrojen bağı yoluyla fosfolipitlerin karbonil (C=O) grubuyla etkileşime girerken, alkil zinciri fosfolipitlerin lipofilik bölgesine yönelir (Şekil 2.10) (Shishir vd., 2019).



Şekil 2.9. Kolesterol ve fosfolipitlerin etkileşimi

Fosfolipit moleküllerinin apolar kuyruklarının çift katmanlı tabakanın iç kısmına yönlenerek oluşturdukları su içermeyen hidrofobik bölgeye hidrofobik bileşenler yerleşirken, polar baş gruplarının sulu faza yönlenerek merkezde oluşturduğu hidrofilik

bölgeye hidrofilik bileşenler yerleşir (Şekil 2.11). Böylece lipozomlar hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşenleri yapılarında enkapsüle ederler (Ajeeshkumar vd., 2021).



Şekil 2.10. Lipozomların oluşumu

Lipozomlar, nanometreden mikrometreye kadar değişen farklı partikül boyutuna sahip küresel bir şekle sahiptir (Ajeeshkumar vd., 2021). Lipozomlar antibiyotikler, proteinler, peptitler, boyalar, nükleik asitler, antioksidanlar ve enzimler gibi çok çeşitli molekülleri enkapsüle edebilir. Ayrıca kararsız bileşikleri de enkapsüle ederek fonksiyonel özelliklerini koruyabilir (Trucillo vd., 2020). Bir ilaç dağıtım sistemi olarak lipozomlar, terapötik bileşikleri stabilize ederek, hücresel ve doku alımının önündeki engelleri aşarak bileşiklerin *in vivo* hedef bölgelere biyo-dağılımını iyileştirir. Lipozom içine yüklenen ilaç, enzimatik bozulma, kimyasal ve immünolojik inaktivasyon ve hızlı plazma klirensi gibi fizyolojik olarak meydana gelen olaylara karşı korunur ve ilacın etkisinin iyileştirilmesine ve uzatılmasına katkıda bulunur. İlaç lipozomun içinde olduğundan, sağlıklı dokuya maruz kalması en aza indirilerek hastalıklı dokuya ulaşması sağlanır ve serbest ilaç formuna kıyasla istenmeyen yan etkiler azaltılır (Guimarães vd., 2021). Lipozom teknolojisi stabiliteyi korumak, salınımı kontrol etmek ve biyoyararlanımlarını arttırmak için hedef bileşiklerin enkapsüle edilmesinde gelişmiş ve etkilidir. (Ajeeshkumar vd., 2021). Lipozomlar biyolojik olarak parçalanabilirler ve aynı zamanda sistemik ve sistemik olmayan uygulamalar için düşük toksisiteye sahip olmaları ve immünojenik olmamaları ile karakterize edilirler. Ayrıca benzer yapıya sahip oldukları hücreler tarafından kolayca alındıkları için genellikle insan vücudu ile biyouyumlu olarak kabul edilmektedirler (Trucillo vd., 2020).

2.4.1. Lipozom bileşenleri

Lipitler

Fosfolipitler biyolojik membranların başlıca yapısal bileşenleridir (Bhupathyraaj, 2013). Lipozomlar hücre zarının yapay bir taklidi olduğu için lipit bileşimi çok önemlidir ve partikül boyutu, sertlik, akışkanlık, stabilite ve elektrik yükü gibi lipozom özelliklerini güçlü bir şekilde etkiler. Lipozomlar hem doğal hem de sentetik fosfolipitlerden elde edilebilirler (Nsairat vd., 2022).

Doğal fosfolipitler genellikle soya fasülyesi, yumurta sarısı gibi çeşitli doğal kaynaklardan elde edilir. Fosfolipitler polar baş gruplarına göre fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinositol, fosfatidilgliserol ve fosfatidik asit olarak sınıflandırılır (Magsoudi vd., 2022; Nsairat vd., 2022). Lesitin olarak da bilinen fosfatidilkolinler lipozom bileşeni olarak en sık kullanılan fosfolipitlerdir (Bhupathyraaj, 2013). Diğer amfipatik moleküllerden, misel yapılara kıyasla çift katmanlı tabakalar oluşturmaları bakımından farklılık gösterirler. Nispeten düşük maliyetleri, net yükten yoksun olmaları ve kimyasal inertlikleri nedeniyle tipik olarak lipozomların ana bileşeni olarak kullanılırlar (Singh vd., 2019).

Sentetik fosfolipitler, doğal fosfolipitlerin çeşitli bölgelerinde gerçekleştirilen spesifik kimyasal modifikasyonlarla elde edilir. Doğal fosfolipitlerin baş gruplarında, alifatik zincirlerinde ve alkollerinde yapılan değişiklikler, daha kararlı olduğu kanıtlanmış çeşitli sentetik fosfolipitleri oluşturur. Lipozom bileşinde sıklıkla kullanılan sentetik fosfolipitler Distearoil fosfatidilkolin, Dipalmitoil fosfatidilkolin, Dioleoil fosfatidilkolin, Distearoil fosfatidilgliserol, Dipalmitoil fosfatidilgliserol, Dioleoil fosfatidiletanolamin, Distearoil fosfatidiltanolamine, Dilauril fosfotidilkolin, Dimiristoil fosfatidilkolin, Dilauril fosfatidiletanolamin, Dimirenzoil fosfatidiletanolamin, Dilauril fosfatidilgliserol ve Distearoil fosfotidilserin ve türevleridir (Bhupathyraaj, 2013; Guimarães vd., 2021).

Kolesterol

Kolesterol çeşitli doğal membranlarda ve hücre zarında bulunan önemli bir bileşendir. Kolesterol, lipozomların hazırlanmasında ve kimyasal özelliklerinde önemli bir role sahiptir (Beltrán-Gracia vd., 2019). Çift tabaka kalınlığını arttırma, membran birleştirme ve membran geçirgenliğini azaltma özelliğine sahiptir (Shishir vd., 2019). Kolesterol kendi başına çift tabaka oluşturmaz, ancak yüksek konsantrasyonlarda fosfolipit membranlara dahil edilir (Singh vd., 2019). Kolesterol, büyük ölçüde lipozomların çift tabaka özelliklerini iyileştirmek için kullanılmıştır. Membran akışkanlığını, çift tabaka stabilitesini geliştirir ve suda çözünen moleküllerin membrandan geçirgenliğini azaltır (Laouini vd., 2012). Hidrofobik etkileşimler nedeniyle hidroksil grubu hidrofilik bölgeye yakın ve aromatik halkaları çift tabaka içindeki yağ asidi zincirine paralel olacak şekilde fosfolipit zincirine yerleşir. Yoğun halkaların neden olduğu mekanik sertlikteki artış nedeniyle akışkanlık, su ve fizyolojik sıvı geçirgenliği azalır, böylece lipozom çift tabakası stabilize olur (Beltrán-Gracia vd., 2019; Sforzi vd., 2020). Kolesterol, fosfolipitlerle güçlü hidrojen bağları oluşturduğundan ve lipitlerin genel yoğunlaşmasını arttırdığından, iki tabakanın suda çözünür moleküllere karşı geçirgenliğini azaltır (Juszkiewicz vd., 2020). Kolesterol yokluğunda lipozomlar genellikle albümin, transferrin, makroglobulin ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler dahil olmak üzere proteinlerle etkileşime girer. Bu etkileşim lipozomların yapısını bozar ve sonuç olarak ilaç dağıtım sistemleri olarak kapasitelerini azaltır. Kolesterol ayrıca lipozom membranlarının bağırsak ortamı stresine karşı yapısal stabilitesi için de çok önemlidir (Beltrán-Gracia vd., 2019). Kolesterolün varlığı ilaçların enkapsülasyon etkinliğini ve salım profilini de etkileyebilir (Juszkiewicz vd., 2020). İki tabakanın sertliğini arttırarak ve geçirgenliğini azaltarak hidrofilik ilaçların tutulmasını iyileştirir, ancak hidrofobik ilaçlar için, yalnızca ilaç girişi lipozomun enkapsülasyon kapasitesinden daha azsa enkapsülasyonu iyileştirir (Singh vd., 2019). Kinin gibi hidrofobik ilaçların salınımını engeller ve uzun lipit zincirlerinin yanında lokalize olarak sterik engel oluşturduğundan enkapsülasyon etkinliğini azaltır. Lipitlerin polar başlıkları ile etkileşime giren hidrofilik ilaçlar söz konusu olduğunda, kolesterol de kapsüllenen miktarlarını sınırlar, ancak aynı zamanda lipozomlardan salım hızlarını da arttırır (Juszkiewicz vd., 2020).

2.4.2. Lipozomların sınıflandırılması

Lipozomlar boyut ve lamellar yapılarına, yüklerine, bileşimlerine ve kullanım alanlarına göre üç kısıma ayrılabilir (Jash vd., 2021; Reshna vd., 2022; Wang, 2021).

Boyut ve lamellar yapılarına göre lipozomlar:

Boyutlarına göre lipozomlar multilamellar veziküller, multivesiküler veziküller, oligolamellar veziküller, ünilamellar veziküller olarak sınıflandırılırlar (Andra vd., 2022);

- Multilamellar veziküller (MLV): >500 nm (>5 lamel)
- Multivesiküler veziküller (MVV): >1000 nm (1 lamel)
- Oligolamellar veziküller (OLV): 100-1000 nm (2-5 lamel)
- Ünilamellar veziküller (ULV):
    - Küçük ünilamellar veziküller (SUV): 20-100 nm (1 lamel)
    - Büyük unilamellar veziküller (LUV): >100 nm (1 lamel)
    - Dev unilamellar veziküller (GUV): >1000 nm (1 lamel)

Eğer çok sayıda çift katman sulu çözeltiyi hapsediyorsa, bunlar multilamellar veziküller (MLV) olarak adlandırılır (Şekil 2.12). Az sayıda çift katman olması durumunda, MLV'ler oligolamellar veziküller (OLV) olarak adlandırılır (Şekil 2.12). Eğer tek bir çift katmanlı vezikül birçok eşmerkezli olmayan çift katmanlı vezikülü kapsıyorsa o zaman multiveziküler vezikül (MVV) olarak bilinir (Şekil 2.12). Eğer bir çift tabaka iç ve dış sulu fazı ayırıyorsa o zaman unilamellar veziküller (ULV) olarak bilinirler (Şekil 2.12). ULV'ler LUV, SUV ve GUV olmak üzere üç kısıma ayrılır. LUV'ler SUV ve MLV'lere göre nispeten daha büyük hacme sahip oldukları için yaygın olarak hidrofilik molekülleri enkapsüle etmek için kullanılırlar. Aksine, MLV'ler birkaç hidrofobik çift katmanlı bölgeye sahip olduklarından hidrofobik molekülleri enkapsüle etmek için kullanılırlar (Has ve Sunthar, 2020).

Yüklerine göre lipozomlar:

Yüklerine göre lipozomlar anyonik, katyonik ve nötral olmak üzere sınıflandırılırlar:

- Anyonik Lipozomlar: Karboksilik, fosforik veya sülfonik asit gibi negatif yüklü fonksiyonel ligandların lipitlere konjuge edilmesiyle oluşturulur. Yüzey yükleri negatiftir (Wang, 2021).

- Katyonik Lipozomlar: Amonyum, sülfonyum veya fosfonyum iyonları gibi katyonik ligandların lipitlere konjuge edilmesiyle oluşturulur. Yüzey yükleri pozitiftir (Wang, 2021).

- Nötral (Zwitteriyonik) Lipozomlar: Nötral lipozomlar ise izoelektrik noktalarına ve çevresel pH'a bağlı olarak negatif ve pozitif arasında tam yük değişimi gösterir (Wang, 2021).

Bileşimleri ve kullanım alanlarına göre lipozomlar:

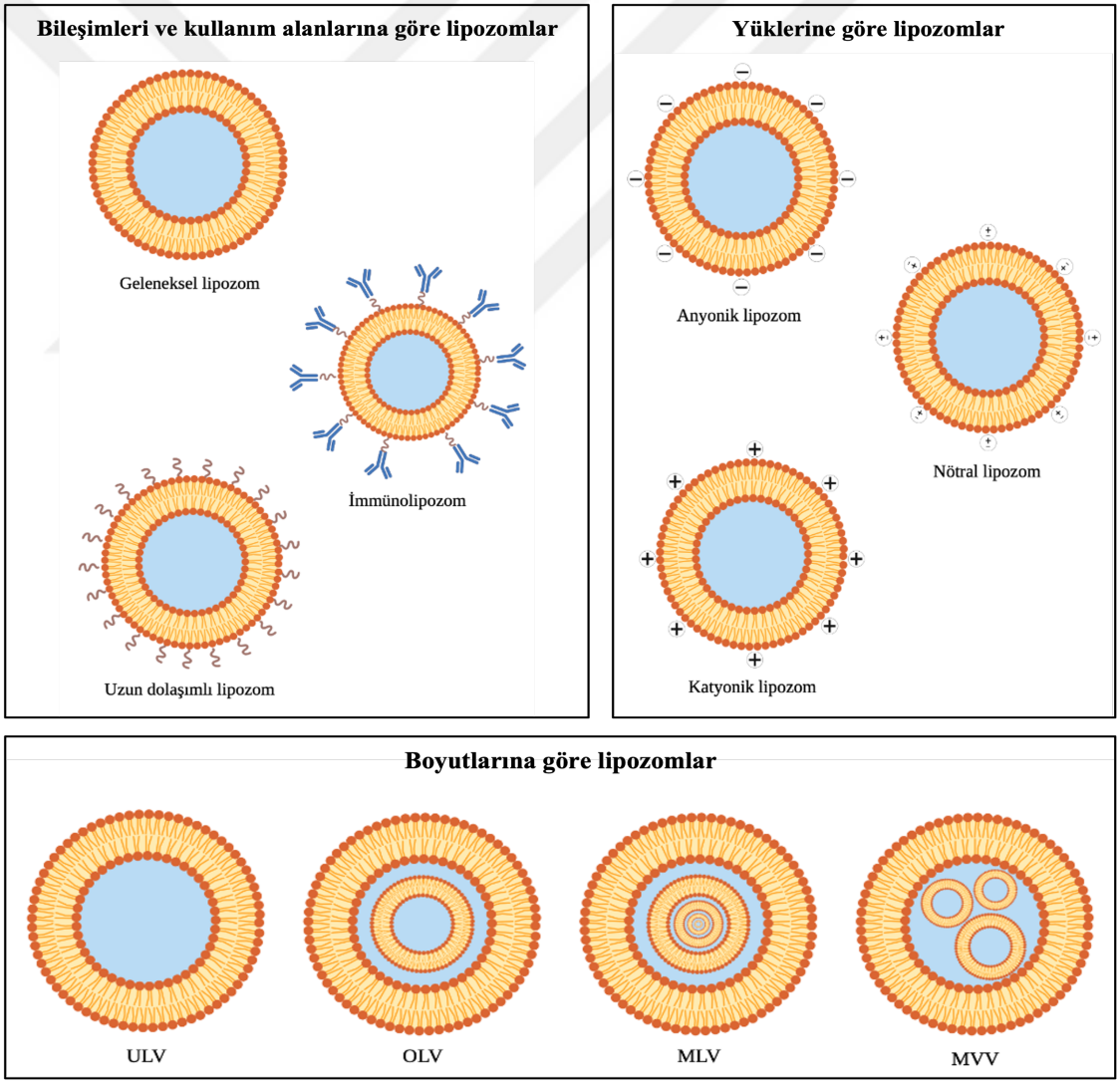
- Konvansiyonel lipozomlar: Farmasötik ilaç dağıtımı için kullanılan birinci nesil lipozomlar olarak bilinir. Esas olarak doğal fosfolipit veya lipitler ile birleştirilir ve lipit çift tabaka oluşturur.

- Katyonik lipozomlar: Pozitif yüklü lipitler içerir. Negatif yüklü DNA ile etkileşimi nedeniyle gen terapisi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

- pH'ya duyarlı lipozomlar: pH'a duyarlı lipitlere sahip lipozomlar, dış pH değiştiğinde dengesizleşir. Genellikle nötr/hafif alkali pH'dan asidik pH'ya doğru değişir. Lipit, 1/4 kat veya daha büyük pH duyarlı bileşen ile titre edilebilir bir grup içerir.

- Uzun sirkülasyonlu lipozomlar: Uzun süre dolaşımda kalan lipozomlar, ilacın spesifik bölgeye veya organa iletimini arttırır ve ayrıca sistemik dolaşımdaki dolaşım süresini uzatır. Lipozomların yüzeyi PEG-fosfolipitler, vinil bazlı lipopolimerler ve PEG'e bağlı ligand spesifik parçalı polimerler gibi polimerlerle modifiye edilir.

- İmmünolipozomlar: Lipozom yüzeyine bağlanan antikorlar içerir. Bu antikorlar, lipozoma enkapsüle edilmiş bileşenin istenilen bir bölgeye iletme kabiliyetini geliştirir. Antikorlar lipozomlara ya kovalent çapraz bağ ile ya da hidrofobikliği arttırarak bağlanır (Balakrishnan vd., 2022).



Şekil 2.11. Lipozomların sınıflandırılması

2.4.3. Lipozom hazırlama yöntemleri

Lipozomların hazırlanması için çeşitli yöntemler mevcuttur (Çizelge 2.5). Lipozom hazırlama yöntemleri geleneksel ve modern yöntemler olmak üzere iki kısma ayrılır. Her yöntemin kendi avantajları ve dezavantajları vardır, ayrıca farklı hazırlama yöntemleri lipozomların morfoloji, yükleme kapasitesi, boyut ve kapsülleme verimliliği gibi özelliklerini etkiler (Singh vd., 2019).

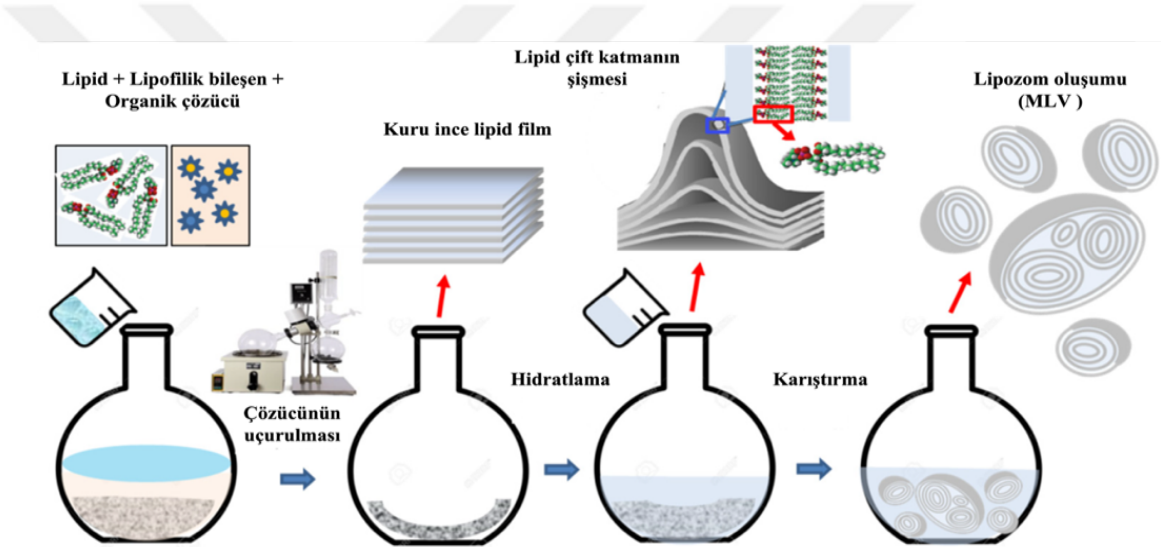
Çizelge 2.5. Lipozom hazırlama yöntemleri

Geleneksel Yöntemler	**Modern Yöntemler**
İnce-Film hidrasyonu (Bangham yöntemi)	Liyofilizasyon
Deterjan diyalizi	Süperkritik destekli lipozom oluşumu
Ters faz buharlaştırma	Mikroakışkan yöntemi
Solvent enjeksiyonu	Membran kontaktörü

Geleneksel lipozom hazırlama yöntemleri genellikle yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip lipozomların üretilmesi, hızlı ve basit prosedüre sahip olmaları, komleks donanım gerektirmemeleri nedeniyle ucuz olmalarından dolayı sıklıkla kullanılırlar. Ancak büyük kütleli üretim için kolayca ölçeklenebilir bir süreç elde etmenin zorluğu ve yüksek enkapsülasyon etkinliği elde etmenin zorlukları, deterjan ve organik çözücü kalıntılarına sahip lipozomların elde edilmesi geleneksel lipozom hazırlama tekniklerinin temel dezavantajları arasında yer almaktadır. Bu kritik sorunların üstesinden gelmek amacıyla, lipozomların hazırlanması için modern yöntemler geliştirilmiştir. Modern yöntemler düşük organik çözücü kalıntısı içeren lipozomların hazırlanması, büyük ölçekli üretim için uygun olmaları, boyut kontrolü sağlamaları gibi avantajlara sahiptir. Ancak modern yöntemlerin yüksek basınç, yüksek sıcaklık, sterilizasyon ihtiyaçları, uzun süreli prosesler ve yüksek donanım gerektirmesi nedeniyle çok maliyetli olması uygulanabilirliklerini kısıtlamaktadır (Lombardo ve Kiselev, 2022). Geleneksel lipozom hazırlama tekniklerinden en çok kullanılanları ince film hidrasyon yöntemi, ters faz buharlaştırma yöntemi, çözücü enjeksiyon yöntemi, deterjan diyalizi yöntemleridir (Liu vd., 2022).

İnce film hidrasyon yöntemi

İnce film hidrasyonu lipozomları hazırlamak için kullanılan en eski yöntemdir. Bu yöntem üç temel adımı içerir (Ahmed vd., 2019). İlk adımda fosfolipitler ve kolesterol organik bir çözücü (diklorometan, kloroform, etanol, kloroform-metanol karışımı) içinde çözülür. İkinci adımda çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır (45-60°C). Üçüncü adımda ise kurutulmuş lipit film bir tampon çözelti ile hidratlanır (Şekil 2.13). Elde edilen lipozomların boyutu ekstrüzyon, sonikasyon ya da homojenizasyon yöntemi ile ayarlanır. Saflaştırma işlemi için ultrafiltrasyon, ultrasantrifügasyon, diyaliz ya da kolon kromatografisi kullanılır (Liu vd., 2022).

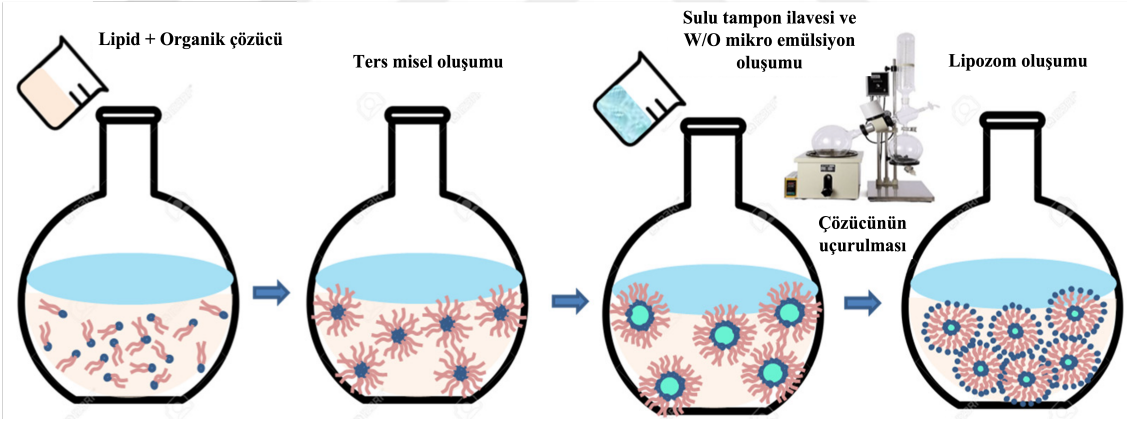


Şekil 2.12. İnce film hidrasyon yöntemi

İnce film hidrasyonu yöntemi ile MLV'ler meydana gelir. Yöntemin avantajları arasında basit bir prosedür olması nedeniyle kolay uygulanabilir olması ve yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlaması yer almaktadır. Yöntemin dezavantajları arasında büyük miktarda organik çözücü kullanımı, hidrofilik ilaçlar için daha düşük enkapsülasyon etkinliği, sterilizasyon ihtiyacı ve parçacık boyutu kontrolünün zor olması yer almaktadır (Lombardo ve Kiselev, 2022).

Ters faz buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemde lipitler organik bir çözücüde (dietil eter/kloroform, dietil eter/izopropil eter veya kloform/metanol karışımı) çözülür ve ters misel oluşumunu meydana gelir. Daha sonra çözeltiye belirli bir miktarda sulu faz (tampon) eklenir. Lipitler su ve yağ arasındaki arayüzde kendilerini yeniden düzenleyerek yağ içinde su (W/O) mikroemülsiyonu oluşturur. W/O mikroemülsiyonu, homojen bir dispersiyon oluşumunu kolaylaştırmak için mekanik veya sonikasyon yöntemleriyle emülsifiye edilebilir. Lipozomların enkapsülasyon etkinliğini arttırmak amacıyla, genellikle sulu faza bir fosfat tamponu eklenir. Sürekli bir döner buharlaştırmanın kullanılması, viskoz bir jel oluşana kadar organik çözücünün uzaklaştırılmasını sağlar. Organik çözücünün yavaş eliminasyonu ters misellerin bozulmasını destekler ve ardışık lipozom oluşumunu (LUV) sağlar. Belirli bir kritik noktada jel çökerken, çözelti ortamındaki fazla fosfolipitler ters misellerin etrafına dağılarak su damlacıklarının etrafında bir lipit çift tabakası oluşturur ve bu da lipozom oluşumuyla sonuçlanır (Lombardo ve Kiselev, 2022).

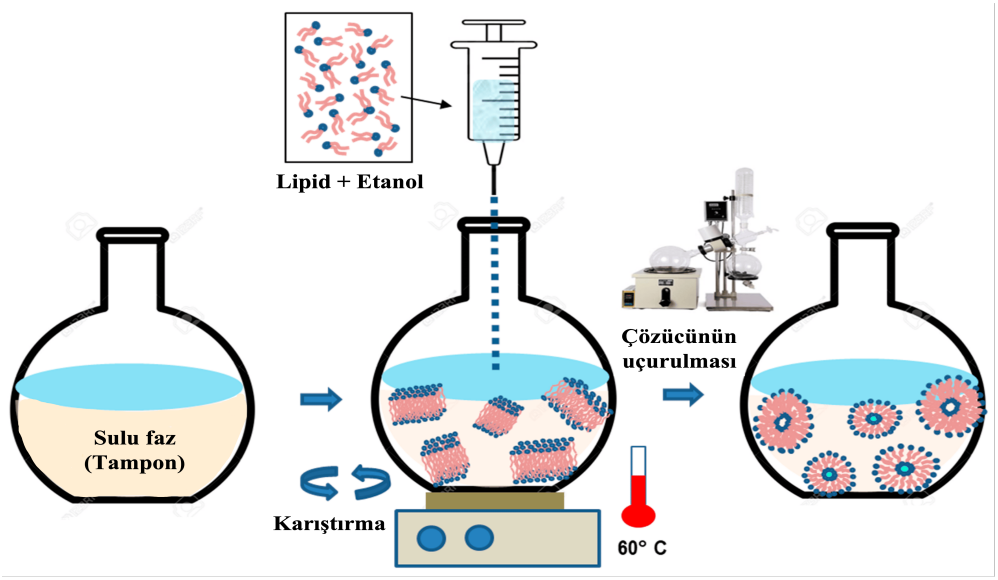


Şekil 2.13. Ters faz buharlaştırma yöntemi

Ters faz buharlaştırma yöntemi ile MLV ve LUV lipozomlar meydana gelir. Yöntemin en önemli avantajları prosesin kolay olması ve yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlamasıdır. Yöntemin dezavantajları arasında büyük miktarda organik çözücüye ve sterilizasyon işlemine ihtiyaç duyulması, hassas ilaçlar için uygun olmaması ve zaman alıcı olmasıdır (Liu vd., 2022; Lombardo ve Kiselev, 2022; Singh vd., 2019).

Solvent enjeksiyon yöntemi

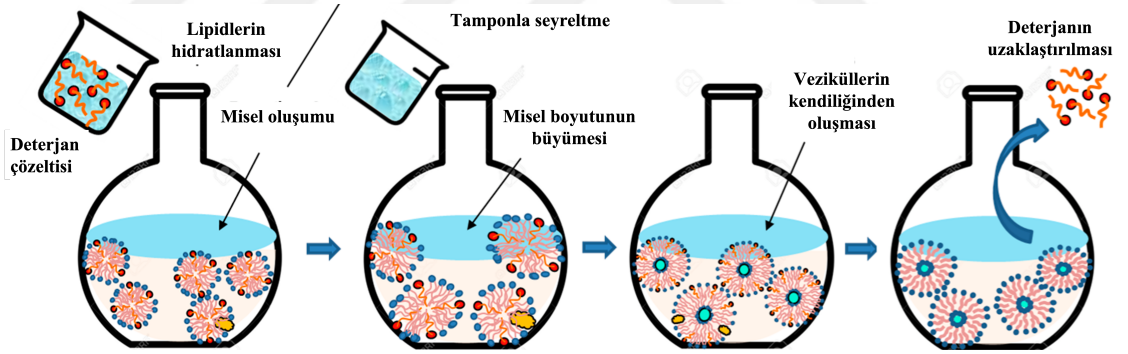
Solvent enjeksiyonu, lipitlerin organik faza çözülmesini ve ardından lipozomlar oluşturmak için lipit çözeltisinin su ortamına enjekte edilmesini içerir (Şekil 2.15). Bu yöntemin avantajı, dar partikül boyutu dağılımına sahip küçük lipozomların suya tek aşamalı etanol lipit solüsyonu enjeksiyonu ile elde edilebilmesi ve ekstrüzyon veya sonikasyon gibi işlemlere gerek duyulmamasıdır. Bu yöntemin dezavantajları, heterojen seyreltik lipozomlar, etanolden kurtulmanın zor olması ve biyoaktif makromolekülleri inaktive etme olasılığının yüksek olmasıdır. Etanol enjeksiyonundan farklı olarak, eter enjeksiyon yöntemindeki eter sulu faz ile karışmaz ve sulu faz, çözücünün nihai lipozomdan uzaklaştırılması için ısıtılır. Eter-lipit çözeltisinin, sıcaklığı eterin kaynama noktasının üzerinde olan sıcak bir sulu faza enjekte edilmesini içerir. Eter su ile temas ettiğinde buharlaşır ve dağılmış lipitler esas olarak tek lamelli veziküller oluşturur. Etanol enjeksiyonu ile karşılaştırıldığında, eter enjeksiyonu çözücüyü nihai lipozomdan uzaklaştırma avantajına sahiptir. Böylece bu işlem uzun süre çalışabilir ve yüksek kapsülleme oranına sahip konsantre lipozom ürünleri oluşturabilir. Yöntemin dezavantajları, heterojen popülasyon ve organik çözücüler içinde kapsüllenmiş maddelerin yüksek sıcaklıkta çözünmesidir (Liu vd., 2022; Lombardo ve Kiselev, 2022; Singh vd., 2019).



Şekil 2.14. Solvent enjeksiyon yöntemi

Deterjan diyalizi yöntemi

Deterjan diyalizi yöntemiyle lipitler bir deterjan çözeltisi kullanılarak çözünürleştirilir ve hidratlanır. Karıştırma ile deterjan fosfolipitlerle birleşir (hidrofobik kısımları sulu faz ile doğrudan etkileşimden korur) ve böylece karışık (deterjan/lipit) miseller oluşur. Deterjanın art arda (aşamalı olarak) uzaklaştırılmasıyla, karışık miseller lipitler açısından daha zengin hale gelir ve unilamellar veziküllerin oluşumuna yol açar (Şekil 2.16). Yaygın olarak kullanılan deterjanlar, sodyum kolat, Triton X-100, sodyum deoksikolat ve alkil glikozittir (Lombardo ve Kiselev, 2022). Deterjan diyalizi farklı yollarla gerçekleştirilebilir. Deterjan diyalizi için en basit yöntem, bir tampon aracılığıyla seyreltme yöntemidir (10 ila 100 kat). Karışık bir lipit-deterjan sisteminin sulu çözeltisinin bir tampon ile seyreltilmesi ile oluşan misellerin boyutu ve polidispersitesi artar. Son olarak, sistem karışık misel faz sınırının ötesinde seyreltildiği için polidispers misellerden veziküllere spontane bir geçiş meydana gelir (Lombardo ve Kiselev, 2022; Liu vd., 2022).



Şekil 2.15. Deterjan diyalizi yöntemi

Deterjan diyalizi yöntemi ile 40 ile 180 nm arasında değişen partikül boyutlarına sahip üniform tek lamelli lipozomlar meydana gelir. Bu yöntemin avantajı, oluşan lipozomların çok büyük enkapsülasyon hacmine ve iyi dağılmış boyuta sahip tek lamelli veziküller olmasıdır. Deterjan diyalizi yöntemi, nihai düşük lipozom konsantrasyonu ve hidrofobik bileşiklerin düşük hapsetme etkinliği gibi temel dezavantajlara sahiptir. Ayrıca ortamda kalan deterjanı uzaklaştırmak için diğer yöntemlerin kullanılmasının gerekliliği ekstra bir dezavantajdır.

2.4.4. Lipozomların karakterizasyonu

Lipozomlar;

- Ortalama boyut,
- Boyut dağılımı (polidispersite indeksi),
- Yüzey yükü (zeta potansiyeli),
- Şekil ve morfoloji,
- Lamellarite,
- Enkapsülasyon etkinliği,
- Faz davranışı (veya polimorfizm) ile karakterize edilirler. Lipozomların karakteristik özellikleri ve karakterizasyon teknikleri Çizelge 2.6'da verilmiştir (Nsairat vd., 2022).

Çizelge 2.6. Lipozom karakteristiği ve karakterizasyon teknikleri

Lipozom Karakteristiği	**Karakterizasyon Tekniği**
Ortalama boyut	Dinamik ışık saçılımı (DLS), Tarama ve Geçirimli elektron mikroskobu (SEM/TEM), Kriyojenik-TEM (Cryo-TEM) ve Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)
Boyut dağılımı	DLS
Yüzey yükü	DLS
Şekil ve morfoloji	SEM, TEM, cryo-TEM, AFM
Lamellarite	Cryo-TEM, NMR
Enkapsülasyon etkinliği	Kromatografik ve/veya spektroskopik yöntemler
Faz davranışı	X-ışını kırınımı (XRD), Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve Termogravimetrik analiz (TGA)

Lipozomların ortalama boyutu, ilaç yüklü lipozomların *in vivo* salınımını belirlemek için çok önemlidir ve lipozomların hazırlanma yöntemi ile fosfolipit bileşimine bağlıdır. Boyut ve boyut dağılımını değerlendirmek için çeşitli yöntemler kullanılır. SEM, TEM gibi yöntemler ile lipozomların boyutu, lipozomun çift tabaka kalınlığı ve tabakalar arası mesafe belirlenebilir. Lipozom boyutu, parenteral uygulamalar, topikal kullanım ve inhalasyon amaçlı kullanıma dayalı olarak farklı lipozom preparatları için izlenmelidir. Lipozomal boyutun kontrolü için sonikasyon, ekstrüzyon ve homojenizasyon gibi çok sayıda prosedür mevcuttur (Andra vd., 2022).

Polidispersite indeksi (PDI) değeri, lipozom boyutunun homojenlik ve dağılım derecesini göstermektedir ve 0 ile 1 arasında bir değere sahiptir. Lipozom örneğinin boyutunu ölçerken, PDI değerinin 0,3'ten küçük olması, lipozomların kabul edilebilir ve tek tip boyutta olduğunu gösterirken, yüksek PDI değeri, boyutun çok geniş bir şekilde dağıldığını göstermektedir. Çok daha yüksek PDI değeri ise lipozomların boyutunun kontrol edilemez hale geldiğini ve lipozomların topaklanabileceğini göstermektedir. PDI değerini belirlemek için TEM, SEM, AFM ve DLS en sık kullanılan yöntemlerdir. DLS yöntemi, kullanım kolaylığı ve güvenilir sonuçları nedeniyle partikül boyutunu ve PDI'yı ölçmek için en popüler yöntemdir. DLS teknolojisi, farklı doğal ortamlardaki lipozomların boyutunu değerlendirebilir ve birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar geniş bir ölçüm kapasitesine sahiptir (Wang vd., 2022).

Lipozomların genel net yükü genellikle yüzey veya zeta potansiyeli olarak ifade edilir. Lipozomların bu özelliği, süspansiyondaki partiküller arasındaki elektrostatik etkileşimlerin kontrolünde önemli bir fiziksel özellik olarak kabul edilir. Zeta potansiyel ölçümleri, lipozomlar gibi kolloidal sistemlerin çevrelerindeki ortamdaki kararlılığını tahmin etmek için kullanılır (Guimarães vd., 2021). Lipozom üzerindeki yük, lipozomun yapısına bağlı olarak pozitif, negatif ya da nötrdür. Bu zeta potansiyeli, lipozomal süspansiyonun agregasyonunu önleyerek stabil olmasını sağlar. Yük taşıyan parçacıklar birbirini iter, böylece zeta potansiyeli +30 mV'tan yüksek ve -30 mV'tan düşük olan lipozomlar kararlı kabul edilir. Zeta potansiyeli genellikle DLS ile belirlenir (Filipczak vd., 2020).

Lamellarite, lipozomların çift lipidik katman sayısını temsil eder (Trucillo vd., 2020). Lamellarite, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç salım profili üzerindeki etkileri nedeniyle daha ileri lipozomal uygulamalar üzerinde etkili olabilecek bir özelliktir (Guimarães vd., 2021). Lamellarite genellikle TEM analizi ile belirlenir. Bu analiz, lipozomların sınıflandırılmasına katkıda bulunmanın yanı sıra potansiyel uygulamalarını ve uygulama etkinliklerini belirler (Trucillo vd., 2020).

Enkapsülasyon etkinliği, lipozom içindeki enkapsüle madde miktarının toplam tartılan maddeye oranı olarak tanımlanır. Enkapsülasyon etkinliğini belirlemek için serbest ilaç diyaliz, jel filtrasyonu veya santrifüjleme yoluyla lipozomla enkapsüle edilmiş olandan ayrılır. Ancak, bu yöntemler lipozom yıkımına ve kapsüllenmiş ilacın salınmasına neden olabilir. Bunlar arasında diyaliz en nazik olanıdır, aynı zamanda da en çok zaman alan ve enstrümantal olarak en zorlayıcı yöntemdir. Bu nedenle jel filtrasyonu ve santrifüjleme daha sık kullanılmaktadır. Ayırma işleminden sonra lipozom yapısı bozulur ve kromatografik veya spektroskopik yöntemlerle madde miktarı belirlenir (Tomnikova vd., 2022).

Lipozomların faz davranışı ilaç salımı veya lipozomal bileşenlerin hedef hücrelerdeki işlevleri sırasındaki çeşitli faz geçişlerini gösterir. Faz geçişleri, fosfolipit membranların akışkanlığını anlamak, lipozom üretmek ve kullanmak için çok önemlidir, çünkü lipozomal membranın özellikleri, geçirgenlik, füzyon, agregasyon ve protein bağlanması lipozomların faz davranışlarına bağlıdır. Lipozomların faz davranışı X-ışını kırınımı (XRD), Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve Termogravimetrik analiz (TGA) ile değerlendirilir (Kumar vd., 2022).

Lipozom karakterizasyonundaki bir diğer parametre de şekil ve morfolojidir. SEM, TEM, AFM gibi çeşitli mikroskop yöntemleriyle lipozomların şekli ve morfolojisi görselleştirilmektir (Sopyan vd., 2020).

2.4.5. Lipozomların avantajları ve dezavantajları

Lipozomların avantajları arasında;

- Yüksek yüzey alanı-hacim oranı (Aguilar-Pérez vd., 2020),
- Yüzey modifikasyon kabiliyeti (Lee, 2020),
- Artan etkinlik ve terapötik indeks (Rao vd., 2019),
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesi (Magsoudi vd., 2022),
- Düşük toksisite (Honda vd., 2013),
- Yüksek biyoyararlanım (Balakrishnan vd., 2022),
- Yüksek geçirgenlik (Kumar vd., 2022),
- Yüksek biyouyumluluk (Sercombe vd., 2015),
- Sürekli ve kontrollü salım sistemi (Akbarzadeh vd., 2013),
- Hem hidrofilik hem hidrofobik bileşenleri enkapsülleme yeteneği (Nakhaei vd., 2021),
- Lipofilik ve amfifilik ilaçların çözünürlüğünün iyileştirilmesi (Akbarzadeh vd., 2013),
- Süspansiyon, aerosol, yarı katı ve toz gibi farklı formlarda bulunabilirliği (Magsoudi vd., 2022) yer almaktadır.

Lipozomların dezavantajları arasında;

- Yüksek üretim maliyeti (Nakhaei vd., 2021),
- Kısa yarılanma ömrü (Magsoudi vd., 2022),
- Fosfolipitlerin hidrolize (Wang, 2021) ve oksidasyona uğraması (Rao vd., 2019),
- Zayıf stabilite (Maja vd., 2020),
- Kapsüllenmiş ilaç/moleküllerin sızıntısı ve füzyon (Akbarzadeh vd., 2013),
- Gastrointestinal sistemde dayanıksızlık (Lee, 2020),
- Zayıf biyodağılım (Boehm, 2016),
- Sıvı halde fiziksel kararsızlık (Kumar vd., 2022) yer almaktadır.

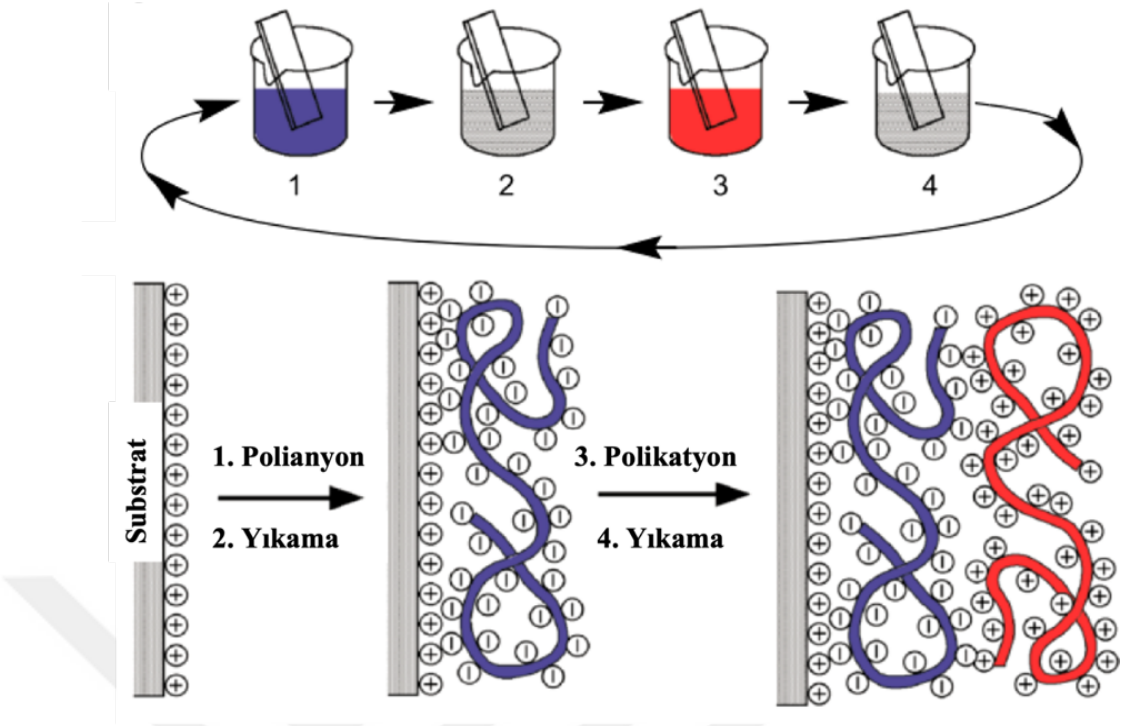
Geleneksel lipozom dispersiyonları uzun süreli depolama, ışık, sıcaklık değişimi, asidik ve bazik ortam gibi harici stres faktörlerinin bir sonucu olarak kararsız olabilir ve bu da potansiyel olarak kısa raf ömrü ile sonuçlanabilir. Lipozomlar topaklanabilir, çökelebilir, partikül boyutunda artış meydana gelebilir bu da kapsüllenmiş bileşiklerin sızmasına veya bozulmasına neden olabilir (Cui vd., 2021; Li vd., 2021). Buna ek olarak, lipozomlar genellikle oral preparatlarda kullanılır, ancak vücutta emilirken ve sindirilirken asitlerden ve enzimlerden kolayca etkilenebilir (Cui vd., 2021). Gastrointestinal sistemdeki pH, safra tuzları ve enzimler lipozom membranını destabilize edebilir. Midenin asidik pH'si ve lipazlar, lipozomları oluşturan fosfolipitlerin ester bağlarını hidrolize eder. Safra tuzları yüzey aktif maddeler gibi davranarak lipozom membranının çözünmesine yol açar (Sebaaly vd., 2021). Oral uygulama için belirgin avantajları olmasına rağmen, sindirim enzimlerine karşı dayanıksızlığı, düşük stabiliteye sahip olması, enzimatik bozunmaları, ilaçların hedef bölgelerine ulaşmadan önce meydana gelen hızlı sızıntı nedeniyle uygulamayı kısıtlamaktadır (Kumar vd., 2020; Sağıroğlu, 2021).

Geleneksel lipozomlar, kullanımlarıyla ilgili sorunların üstesinden gelmek için yüzey işlevselleştirme olanağı ve alanı sağlar. Bu amaçla lipozomların lipit bileşimini değiştirmek, gangliosidler veya sialik asit ile ya da polimerlerle yüzey modifikasyonu yoluyla lipozomların arayüzey özelliklerini ayarlamak, lipozomların dahil olduğu etkileşimleri (yani lipozom-lipozom, lipozom-serum proteinleri) değiştirmek için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardır. Lipozomların polimerlerle yüzey modifikasyonu lipozomların yüzeyine polimer aşılanması ve lipozom yüzeyinin fiziksel olarak polimerlerle kaplanması yolları ile gerçekleştirilir. Lipozomların dış yüzeyi, spesifik olmayan (elektrostatik, dipol-yük, hidrojen-bağı, Van der Waals) etkileşimler yoluyla polimerlerin adsorpsiyonuna izin verir. Tek bileşenli hidrofilik polimerlerin lipozom yüzeyine doğrudan adsorpsiyonu, modifiye edilmiş polimerlerin lipit çift katmanına dahil edilmesi**,** polimerlerin yüzeye çapraz bağlanması ve zıt yüklü polimerlerin katman katman (LbL) biriktirilmesi en yaygın kullanılan yaklaşımlar arasındadır (Cao vd., 2022).

2.5. Katman Katman (LbL) Biriktirme Yöntemi

Katman katman (LbL) biriktirme yöntemi, sulu çözeltiden yüklü polielektrolitleri bir araya getirmek için çok yönlü ve basit bir tekniktir. Decher tarafından 1921 yılında nanoyapılı filmler oluşturmak için LbL yöntemi kullanılarak polielektrolitlerin bir araya getirilmesine ilişkin yapılan ilk çalışmadan bu yana, konu ilaç dağıtımı da dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalar için geniş çapta araştırılmıştır. LbL yöntemi başlangıçta düz alt tabakalar üzerinde gösterilmiş ve daha sonra küresel alt tabakalara doğru genişletilmiştir (Kurapati vd., 2019). LbL yöntemi basitçe zıt yüklü malzemelerin çok katmanlarını sırayla biriktirerek ultra ince bir film üretimini ifade eder. Genel olarak, LbL işlemi, substrat yüzeyinde tamamlayıcı malzemelerin adsorpsiyonunu sağlamak için yüklü bir substratın polikatyon ve polianyon çözeltilerine sırasıyla maruz bırakılmasını içerir (Liu vd., 2019). LbL yönteminde elektrostatik çekim, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, yük transferi, Van der Waals kuvvetleri ve kovalent bağ etkileşimleri uygulansa da elektrostatik çekim, LbL yapılarının oluşturulmasında en yaygın kullanılan itici güçtür (Cao vd., 2022; Hermal vd., 2020).

Polielektrolitler, yüklü olabilen veya uygun koşullar altında yüklü hale gelebilen fonksiyonel gruplar taşıyan makromoleküllerdir (Anirudhan vd., 2017). LbL yönteminde sentetik polielektrolitler (poli (etilenimin), poli (akrilik asit), poli (metakrilik asit), poli (L-Lisin)), yarı sentetik polielektrolitler (ksantan, modifiye kitosan) ve doğal polielektrolitler (kitosan, aljinik asit, hyaluronik asit, kolajen, jelatin, kondroitin sülfat, pektin, dekstran, gamlar) kullanılır. İyonik yüklerine bağlı olarak, polielektrolitler polianyonlar, polikatyonlar ve poliamfolitler (amfoterik hem pozitif hem de negatif yüklü) olarak sınıflandırılabilir (Petrila vd., 2021, Criado-Gonzalez vd., 2021. Polielektrolit çoklu katmanlar, polielektrolitlerin LbL yöntemi kullanılarak diğer yüklü/yüksüz moleküllerle kendi kendine birleşmesiyle elde edilen ince organik filmlerdir. İlk katman, zıt yüklere sahip bir desteğin yüzeyinde bir polielektrolitin adsorpsiyonu ile oluşturulur. Daha sonra, polielektrolit katmanları adsorbe edilebilir ve substratın iyonik yükünün bir fonksiyonu olarak Substrat/ $(Polikatyon/Polianyon)_n$ veya Substrat/$(Polianyon/Polikatyon)_n$ yapısına sahip nanoyapılı bir film oluşturulabilir (Şekil 2.17) (Petrila vd., 2021 (Richardson vd., 2016)).

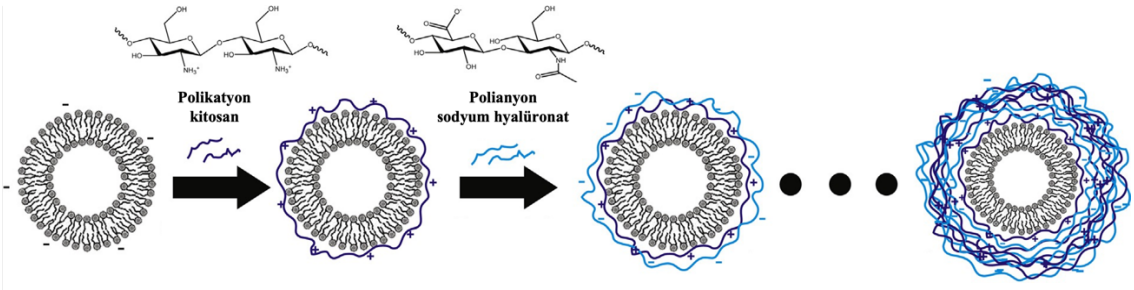


Şekil 2.16. LbL yöntemi ile film oluşumu

LbL yönteminde substrat olarak ilaçlar, peptitler, DNA, hormonlar ve enzimler, lipit veziküller, nanopartiküller lipozomlar da dahil olmak üzere birçok farklı taşıyıcı sistem kullanılabilir (Şekil 2.18) (Patil vd., 2022; Song vd., 2023). LbL substrat olarak veziküller veya lipozomlar kullanıldığında fazla bağlanmamış malzemenin uzaklaştırılması daha da karmaşık hale gelmekte ve bazı durumlarda her bir çift katman için üç farklı adımı içermektedir:

- İlk katmanlama çözeltisi, ilk katmanı oluşturmak için veziküller/lipozomlar içeren seyreltilmiş bir süspansiyona eklenir;
- İkinci katmanlama çözeltisi, polielektrolitle modifiye edilmiş veziküller/lipozomlar içeren dispersiyona eklenir ve ilk katmanın biriktirilmesinden sonra ortaya çıkan fazla bağlanmamış malzeme, ikinci katmanın ve interpolielektrolit komplekslerinin oluşumuna yol açar;

- İnterpolielektrolit kompleksleri santrifüjleme yoluyla çökeltilir ve polielektrolitle modifiye edilmiş veziküller/lipozomları içeren bir dispersiyon elde edilir (Jeon vd., 2015; Mateos-Maroto vd., 2022).



Şekil 2.17. LbL yönteminin lipozomlara uygulanması

LbL yöntemi lipozom lipit bileşimini değiştirmek karşılaştırıldığında, LbL lipozom stabilitesini iyileştirmek için ekonomik ve basitleştirilmiş bir yöntem olarak tanımlanmıştır. LbL'nin en önemli avantajlarından biri kaplama katmanlarının lipit hidrolizini önlemek, çevresel stabiliteyi arttırmak ve bileşiklerin salınımını kontrol etmek için bariyer görevi görebilmesidir (Chun vd., 2013; Song vd., 2023). LbL yöntemiyle lipozomların yüzeyinin modifiye edilmesi, aktif maddelerin taşınmasının ve salınmasının iyileştirilmesi, dolaşım süresinin uzatılması, kalın polimer tabakası nedeniyle oksijene maruz kalmanın ve dolaylı olarak lipit oksidasyonunun azalması ve yüklü bileşenlerin sızıntısının azalması gibi olumlu etkilere sahiptir (Pasarin vd., 2023). Böylece pH ve iyonik güç dahil olmak üzere çevresel koşullar, gastrointestinal sistemde depolama ve sindirim açısından lipozomların stabilitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Liu vd., 2016). Ayrıca farmakokinetik profiller gibi özellikleri geliştirerek *in vivo* biyolojik performansı da arttırabilirler (Jeon vd., 2015). LbL, özellikle en dış katmanın çok yönlülüğü, ilaç dağıtım sistemlerine sterik stabilite, aktif hedefleme, çevresel duyarlılık ve bunlarla sınırlı olmamak üzere çok çeşitli özellikler ve işlevler sağlar (Patil vd., 2022). Sadece bileşim, nanometre aralığında kalınlık, yüzey yükü, geçirgenlik ve esneklik açısından ayarlanabilir özelliklere sahip katmanlı bir sistem oluşturma kabiliyetine sahiptir (Sakr vd., 2015).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Alpinia officinarum* rizomu

Tez kapsamında kullanılan *A. officinarum* Türkiye/Bursa/Nilüfer ilçesinde bulunan bir aktardan ticari olarak satın alınmıştır ve daha sonra analizler için kullanılmıştır.

3.1.2. Tez kapsamında kullanılan cihazlar

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz	**Marka ve Model**	**Kullanım Amacı**
Analitik terazi	Mettler Toledo, MS105DU	*A. officinarum* ve analizlerde kullanılacak kimyasalların tartımında kullanıldı.
Çoklu manyetik karıştırıcı	Wisd, MS-MP8	Galangin ekstraksiyonunda, lipozomların kaplanmasında ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanıldı.
Döner buharlaştırıcı	Bibby Scientific, RE100	Lipozomların hazırlanmasında kullanıldı.
FE-SEM (Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu)	Carl Zeiss, Gemini	Lipozomların yüzey morfolojisinin ve boyutunun belirlenmesinde kullanıldı.
FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)	Perkin Elmer, Spectrum 100	Lipozomların yapı analizlerinde kullanıldı.
Liyofilizatör	Labconco, FreeZone 2,5 Plus	Lipozom çözeltilerinin liyofilize edilmesi için kullanıldı.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (Devam)

Cihaz	**Marka ve Model**	**Kullanım Amacı**
pH metre	Hanna, HI 221	Lipozomların hazırlanmasında ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanıldı.
Saf su cihazı	Elga Purelab, Option Q DV25	Analizlerde kullanılan saf suyun ve ultra saf suyun temininde kullanıldı.
Santrifüj	Hettich, EBA 20	Lipozomların hazırlanmasında ve enkapsülasyon etkinliği analizinde kullanıldı.
Sıcaklık programlı çalkalayıcı	Mikrotest, MCI 55 D	*In vitro* ilaç salım ve gastrointestinal sindirim analizlerinde kullanıldı.
Ultrasonik banyo	ISOLAB, 621.06.003	Lipozomların ve örneklerin hazırlanmasında kullanıldı.
UV-GB Spektrofotometresi	Varian, Cary 50 Conc	*In vitro* ilaç salım, gastrointestinal sindirim ve stabilite analizlerinde kullanıldı.
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Diod serili dedektör (HPLC-DAD)	Agilent Technologies, 1200 Series	Havlıcanda bulunan galanginin kalitatif, kantitatif analizinde ve enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanıldı.
Zeta Potansiyel ölçüm cihazı	Malvern, Zetasizer Nano-ZS	Lipozomların hidrodinamik çap, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.1.3. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	**Firma**	**Katalog Numarası**
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888
Alüminyum klorür	Merck	101084
Asetik asit	Merck	100063
Asetonitril	Sigma-Aldrich	34851
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Sigma-Aldrich	209198
Disodyum hidrojen fosfat	ISOLAB	960066
Etanol	Merck	100983
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Etanol	Merck	100983
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Formik asit	Merck	100264
Galangin	Extrasynthese	1114 S
Gallik asit	Sigma-Aldrich	27645
Gam Arabik	Sigma-Aldrich	G9752
Hidroklorik asit	Merck	100314
Kitosan	Sigma-Aldrich	448877
Kolesterol	Biosynth	FC28806
Kuersetin	Sigma-Aldrich	Q4951

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar (Devam)

Kimyasal Adı	Firma	Katalog Numarası
Metanol	Merck	106007
Pankreatin	Sigma-Aldrich	P3292
Pepsin	Sigma-Aldrich	77160
Potasyum dihidrojen fosfat	ISOLAB	960066
Potasyum persülfat	Merck	105091
Safra tuzu	Edukim	F0499
Sodyum asetat trihidrat	Sigma-Aldrich	S8625
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	795429
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	791768
Sodyum klorür	TEKKİM	170540
Sodyum potasyum tartarat	Sigma-Aldrich	217255
Soya Fosfatidilkolin	Tito	E322
Troloks	Sigma-Aldrich	238813

3.1.4. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler

Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası	Özellikleri
Diyaliz torbası	Biobasic	TX0112	44 mm x 2 m
Mikropipet	Eppendorf	Z683825	100 – 1000 µL
Mikropipet	Eppendorf	Z683833	500 – 5000 µL

3.1.5. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler

Toplam fenolik madde analizinde kullanılan çözeltiler

- Folin-Ciocalteu çözeltisi (2 N): Folin-Ciocalteu reaktifinin 1:3 oranında saf su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.
- Gallik asit çözeltisi (1000 ppm): 0,1 g gallik asit az miktarda metanol ile çözülüp 100 mL'ye metanol ile tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Lowry A çözeltisi: 0,1 M NaOH içinde %2'lik Na_2CO_3 çözülerek hazırlanmıştır.
- Lowry B çözeltisi: %1'lik $NaKC_4H_4O_6$ içinde %5'lik $CuSO_4$ çözülmesiyle hazırlanmıştır.
- Lowry C çözeltisi: Lowry A ve Lowry B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

ABTS analizinde kullanılan çözeltiler

- ABTS radikal çözeltisi: 7 mM ABTS çözeltisi içinde 2,45 mM $K_2S_2O_8$ su ile çözülerek 24 sa boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. 24 sa sonra ABTS radikal çözeltisi su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Troloks çözeltisi (1000 ppm): 0,1 g troloks metanol ile çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Kromatografik analizlerde kullanılan çözeltiler

- Galangin çözeltisi (1000 ppm): 0,1 g galangin metanol ile çözülerek balon jojede 100 mL hacme tamamlanmıştır.
- Formik asit çözeltisi (%1): 10 mL derişik formik asit çözeltisi bir miktar ultra saf su içerisinde çözülürek son hacim ultra saf su ile 1 L'ye balon jojede tamamlanmıştır.

Galangin yüklü lipozomların hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

- Kolesterol çözeltisi (5 mg/mL): 500 mg kolesterol etanol ile çözülürek balon jojede 100 mL hacme tamamlanmıştır.
- Fosfatidilkolin çözeltisi (20 mg/mL): 2 g soya fosfatidilkolin etanol ile çözülürek balon jojede 100 mL hacme tamamlanmıştır.

Galangin yüklü lipozomların modifiye edilmesinde kullanılan çözeltiler

- Kitosan çözeltisi (%0,625): 0,6250 g kitosan 99,3750 g, %1 glasiyel asetik asit içeren ultra saf su ile çözülerek 12 sa 200 rpm karıştırma hızında karıştırılmıştır ve 0,45 µm PVDF filtreden süzülürek 1 N NaOH ile pH 5,5'e ayarlanmıştır.
- Gam arabik çözeltisi (%2): 2 g gam arabik 98 g ultra saf su ile çözülürek 12 sa 200 rpm karıştırma hızında karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0,45 µm PVDF filtreden süzülürek 1 N NaOH ile pH 5,5'e ayarlanmıştır.

In vitro ilaç salım analizinde kullanılan çözeltiler

- Standart galangin çözeltisi (1000 ppm): 100 mg galangin metanol ile çözülürek balon jojede 100 mL hacme tamamlanmıştır.
- Fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS): 7,6500 g NaCl, 0,7240 g Na_2HPO_4 ve 0,2100 g KH_2PO_4 ultra saf su ile çözülerek 1 L'ye tamamlanmış ve 1 N NaOH ile pH 7,4'e ayarlanmıştır.

In vitro gastrointestinal sindirim analizinde kullanılan çözeltiler

- Simüle mide sıvısı çözeltisi (SGF): 1 g NaCl ve 1,6 g pepsin saf su ile çözülerek toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır ve pH 2,0 ± 0,2 ayarlanmıştır.
- Simüle bağırsak sıvısı çözeltisi (SIF): 3,4 g KH_2PO_4 ve 38,5 mL 0,2 N NaOH saf su ile çözülmüştür. Hazırlanan çözeltiye 0,625 g pankreatin ve 1,5 g safra tuzu eklenerek çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır ve pH 7,0 ± 0,2'ye ayarlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *A. officinarum* rizomlarından galangin ekstraksiyonu

A. officinarum rizomlarından galangin ekstraksiyonu için 20 g öğütülmüş rizom tartılarak yuvarlak tabanlı cam şişelere koyulmuştur. Şişelere 100 mL etanol eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 4 sa karıştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt kullanılana kadar 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2. Kromatografik analiz

A. officinarum ekstraktında bulunan fenolik maddelerin analizi

A. officinarum ekstraktında bulunan fenolik maddelerin belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fotodiod serili dedektör cihazı (HPLC-DAD) kullanılmıştır. HPLC-DAD cihazı otomatik örnekleyici, degazer, ikili pompa ve fotodiyot serili dedektör içermektedir. Analiz için enjeksiyon hacmi 10 µL ve akış hızı 0,6 mL/dk'dır. Kullanılan analiz programı %1'lik formik asit ve asetonitrilden oluşan gradient hareketli faz programıdır (Çizelge 3.4). Analizler C18 (XBridge®, 3,5 µm, 4,6 x 250 mm) kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam analiz süresi 36 dk'dır (Şahin vd., 2016).

Çizelge 3.4. HPLC-DAD gradient hareketli faz programı

Süre (dk)	Hareketli faz bileşimi	
	%1'lik formik asit (%)	Asetonitril (%)
0	90,0	10,0
10	87,0	13,0
20	58,5	41,5
25	30,0	70,0
35	90,0	10,0
36	90,0	10,0

3.2.3. Spektroskopik analizler

A. officinarum ekstraktının toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı ve toplam antioksidan kapasite değeri aşağıdaki yöntemlerle belirlenmiştir.

Toplam fenolik madde analizi

A. officinarum ekstraktının toplam fenolik madde analizi Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir (Singleton vd., 1965). Bu yöntemde 100 µL ekstrakt üzerine 1900 µL saf su, 2500 µL Lowry C çözeltisi ve 0,25 mL seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklenip 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Örneklerin 750 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Folin-Ciocalteu yönteminde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için farklı derişimlerde gallik asit çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon verileri

Konsantrasyon aralığı (ppm)	Doğru denklemi	R^2
1-60	y= 0,0314x - 0,0015	0,9978

Her bir standardın 750 nm dalga boyunda absorbansı okunarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak toplam fenolik madde "mg gallik asit eş değeri (GAE)/g örnek" cinsinden belirlenmiştir (Karkar ve Şahin, 2022; Şahin vd., 2014).

Toplam antioksidan kapasite analizi

A. officinarum ekstraktının toplam antioksidan kapasite analizi ABTS yöntemi ile belirlenmiştir. 100 µL örnek, 3900 µL etanol ve 1 mL seyreltilmiş ABTS çözeltisi eklenerek 6 dk sonra 734 nm'de absorbansları ölçülmüştür ($A_{örnek}$). Ölçümler sonucunda örnekler için % inhibisyon değerleri Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{İnhibisyon} = \frac{A_{kör} - A_{örnek}}{A_{kör}} \times 100 \qquad (3.1)$$

ABTS antioksidan kapasite analizi çalışmalarında standart olarak troloks kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda troloks çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 3.6). Her bir standardın 734 nm dalga boyunda absorbansı okunarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır ve troloks miktarına (mg) göre grafiğe geçirilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak toplam antioksidan kapasite "mg troloks eşdeğeri (TE)/g örnek" cinsinden belirlenmiştir (Karkar vd., 2021; Re vd., 1999).

Çizelge 3.6. ABTS yöntemi için kalibrasyon verileri

Konsantrasyon aralığı (ppm)	Doğru denklemi	R^2
0,3-10	y = 8,8122x – 2,2937	0,9981

Toplam flavonoid analizi

A. officinarum ekstraktının toplam flavonoid analizi alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir (Formagio vd., 2014). 0,5 mL örnek, 1,5 mL %95'lik etanol, 0,1 mL %10'luk $AlCl_3.6H_2O$ çözeltisi, 0,1 mL 1 M $NaC_2H_3O_2.3H_2O$ çözeltisi ve 2,8 mL saf su ile karıştırılmıştır ve 30 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Örnek absorbansları 415 nm'de UV-GB spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Toplam flavonoid analizinde standart olarak kuersetin kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda kuersetin (QE) çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 3.7). Her bir standardın 415 nm dalga boyunda absorbansı grafiğe okunarak % inhibisyon değerleri hesaplanarak troloks miktarına (mg) göre grafiğe geçirilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak ekstraktların antioksidan kapasite değerleri "mg kuersetin eşdeğeri (QE)/g örnek" şeklinde hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7. Toplam flavonoid analizi için kalibrasyon verileri

Konsantrasyon aralığı (ppm)	Doğru denklemi	R^2
0,5-10	y = 0,1053x – 0,0061	0, 9996

3.2.4. Kemometrik analizler

Galangin yüklü lipozomların hazırlanması için ince film hidrasyon tekniği kullanılmıştır. Galangin yüklü lipozomların maksimum enkapsülasyon etkinliği ile üretilebilmesi için çeşitli parametreler Merkezi Kompozit Dizayn-Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM-CCD) ile optimize edilmiştir.

Birçok durumda, bazı kontrol edilebilir değişkenleri (faktörleri) bir yanıtla ilişkilendiren teorik model ya mevcut değildir ya da çok karmaşıktır. Bu durumda, faktörler ve yanıt arasındaki ilişki hakkındaki bilgilerin ampirik bir şekilde elde edilmesi gerekir. Box ve Wilson tarafından tanıtılan yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM), amacı ampirik bir modelle ortaya konan problemleri analiz etmek olan matematiksel ve istatistiksel teknikler bütünüdür (Sarabia ve Ortiz, 2009). RSM deneysel tasarımı ve buna eşlik eden doğrusal regresyon analizini kullanır (Fu, 2015). Deneysel tasarıma dayalı yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM), deneylerin tasarlanması ve etki süreci değişkenlerinin optimize edilmesi için kullanılır (Kumari ve Gupta, 2019). Daha basit bir tanımla RSM, ilgilenilen bir yanıt olan y ile x_1, x_2, …, x_k ile gösterilen bir dizi ilişkili kontrol (veya girdi) değişkeni arasında uygun bir fonksiyonel ilişkinin geliştirilmesinde kullanılır (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010). RSM'nin amaçları aşağıdaki gibidir (Sarabia ve Ortiz, 2009):

- Deneysel değişkenliği (saf hata) güvenilir bir şekilde tahmin etmek,
- Önerilen model ile deneysel veriler arasındaki uyumluluğu garanti etmek (uyum eksikliğini tespit etmeyi kolaylaştırmak),
- Gözlenen yanıtı, deneysel alan içinde deney yapılmayan noktalarda mümkün olduğunca tam ve kesin olarak tahmin etmek,
- Elde edilen sonuçlara göre deneylerin farklı alternatiflerle gerçekleştirilmesi için sıralı stratejiler önermek,
- Ekonomik maliyet, zaman ve diğer pratik sınırlamalar açısından yüksek verimliliği korumak,
- Belirsizlik koşulları altında karar vermeyi mümkün kılmak, belirsizliği azaltmak.

Bu doğrultuda lipozom üretimi için kullanılan dört faktörlü (PC: L-α-Fosfatidilkolin, CHOL: kolesterol, GA: galangin), beş seviyeli RSM-CCD kullanılmıştır. RSM-CCD için için kullanılan faktörler ve kodlanmış seviye değerleri Çizelge 3.8'de verilmektedir.

Çizelge 3.8. CCD için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri

Faktörler	**Seviye**				
	-2	**-1**	**0**	**1**	**2**
PC oranı (mg:mL)	1	3	5	7	9
CHOL oranı (mg:mL)	0,2	0,6	1	1,4	1,8
Ultrasonikasyon zamanı (dk)	15	25	35	45	55
GA oranı (mg:mL)	0,055	0,110	0,165	0,220	0,275

Merkezi kompozit dizaynda faktörler ve 5 seviye aralığı belirlendikten sonra deney sayısı (N), Eşitlik 3.2 ile belirlenir.

$$N = 2^k + 2k + 1 + x_0 \tag{3.2}$$

k, faktör sayısı ve x_0, tekrarlanan deney sayısını ifade etmektedir. Formüldeki 2^k full faktöriyel veya fraksiyonlu faktöriyel dizayndaki deney sayılarını, 2k star dizayn deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını göstermektedir. 2^k'daki seviyeler (-1) ve (+1), 2k'dakiler ±α, 1'deki ise (0) dır. Optimizasyon çalışmaları için 30 deney (2^4+2.4+6=30) yapılmıştır. Dairesel dizaynda α Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmaktadır (Şahin vd., 2016).

$$\alpha = \pm\sqrt[4]{2^k} \tag{3.3}$$

Merkezi kompozit dizayn çizelgesi Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. CCD çizelgesi

Deney	Faktörler			
	x_1	x_2	x_3	x_4
	PC oranı (mg:mL)	CHOL oranı (mg:mL)	Ultrasonikasyon zamanı (dk)	GA oranı (mg:mL)
1	3	0,6	25	0,2
2	7	0,6	25	0,2
3	3	1,4	25	0,2
4	7	1,4	25	0,2
5	3	0,6	45	0,2
6	7	0,6	45	0,2
7	3	1,4	45	0,2
8	7	1,4	45	0,2
9	3	0,6	25	0,4
10	7	0,6	25	0,4
11	3	1,4	25	0,4
12	7	1,4	25	0,4
13	3	0,6	45	0,4
14	7	0,6	45	0,4
15	3	1,4	45	0,4
16	7	1,4	45	0,4
17	1	1	35	0,3
18	9	1	35	0,3
19	5	0,2	35	0,3
20	5	1,8	35	0,3
21	5	1	15	0,3
22	5	1	55	0,3
23	5	1	35	0,1
24	5	1	35	0,5
25	5	1	35	0,3
26	5	1	35	0,3
27	5	1	35	0,3
28	5	1	35	0,3
29	5	1	35	0,3
30	5	1	35	0,3

RSM-CCD kapsamında yapılan 30 deney için enkapsülasyon etkinliği hesaplanarak yanıt değerleri için Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapılmıştır. ANOVA analizi yapılarak Eşitlik 3.4'te verilen ikinci dereceden denklem ile tahmini değerler ve dört faktör için optimum değerler hesaplanmıştır. Bulunan optimum faktör değerlerinde yapılmış 3 tekrarlı deneyler ile deneysel enkapsülasyon etkinliği hesaplanarak modelle bulunan tahmini değerler ile karşılaştırılmıştır.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{4} b_i x_i + \sum_{i=1}^{4} b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{3} \sum_{j=i+1}^{4} b_{ij} x_i x_j \qquad (3.4)$$

y: yanıt, b_0: sabit terim, b_i: doğrusal etkileşim sabiti, b_{ii}: parabolik etkileşim sabiti, b_{ij}: parametre etkileşim sabiti, x_i ve x_j*:* bağımsız değişkenler

Eşitlik 3.4'te verilen eşitlik ile tanımlanan model RSM'de yaygın olarak kullanılmaktadır. Böyle bir model üç yönlü olarak ele alınır ve amaçları şu şekildedir (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010):

1. y ile x_1, x_2, …, x_k arasında, kontrol değişkenlerinin belirli kombinasyonları için yanıt değerlerini tahmin etmek amacıyla kullanılabilecek, yaklaşık da olsa bir ilişki kurmak,

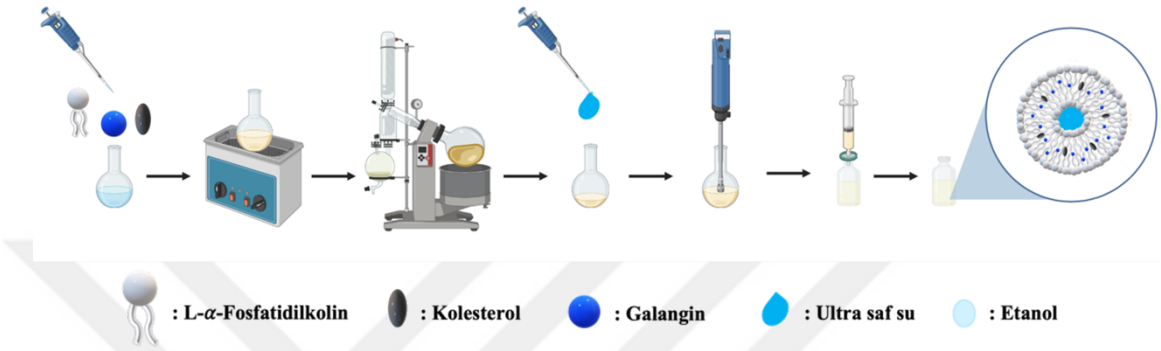
2. Hipotez testi yoluyla seviyeleri x_1, x_2, …, x_k ile temsil edilen faktörlerin anlamlılığını belirlemek,

3. Belirli bir ilgi bölgesi üzerinde maksimum (veya minimum) yanıtla sonuçlanan x_1, x_2, …, x_k optimum kombinasyonlarını belirlemek.

ANOVA analizi sonucunda maksimum enkapsülasyon etkinliğinin sağlanmasında etkili olan faktörler belirlenmiştir. RSM kullanılarak etkili faktörlerin ikili etkileşimlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisi yanıt yüzey grafikleri çizilerek incelenmiştir.

3.2.5. Galangin yüklü lipozomların hazırlanması

Galangin yüklü lipozomlar ince film hidrasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Galangin yüklü lipozomların hazırlanması için Çizelge 3.8'de verilen PC oranı, CHOL oranı, ultrasonikasyon zamanı ve GA oranı kullanılarak 30 deney yapılmıştır.



Şekil 3.1. Galangin yüklü lipozomların hazırlanması

PC (0,1-0,9 mg:mL), CHOL (0,2-0,8 mg:mL) ve GA, (0,1-0,5 mg:mL) cam balonlarda etanol ile (toplam hacim 25 mL) çözülmüştür ve 40°C'de ultrasonik banyoda (15-55 dk) bekletilmiştir. Daha sonra etanol döner buharlaştırıcı ile 55°C'de uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.1). Elde edilen ince lipit film, 55°C'de 10 mL ultra saf su ile hidratlanmıştır. Daha sonra elde edilen dispersiyon 0,45 µm PVDF filtreden süzülmüştür (Zhu vd., 2018).

3.2.6. Galangin yüklü lipozomların enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

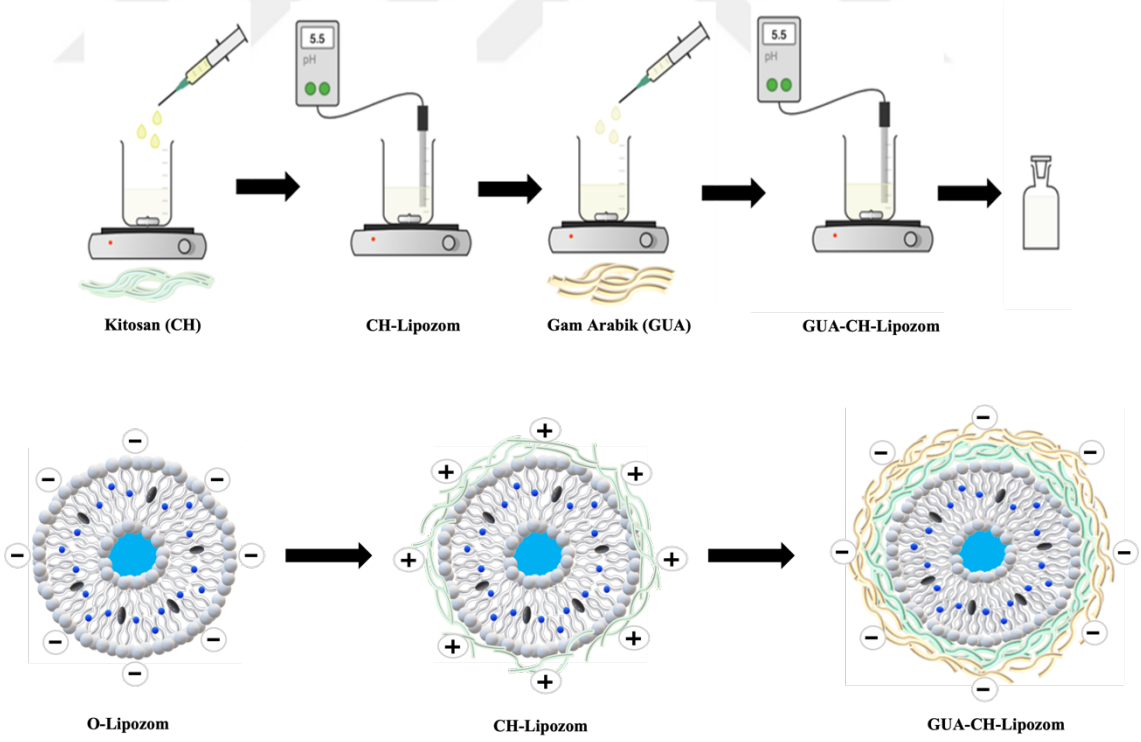
Galangin yüklü lipozomların enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için lipozomlar 6 sa boyunca 6000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve santrifügat HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Eşitlik 3.5'e göre enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır:

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği (\%)} = \frac{GA_{başlangıç} - GA_{supernatant}}{GA_{başlangıç}} \times 100 \qquad (3.5)$$

$GA_{başlangıç}$: başlangıç galangin konsantrasyonu, $GA_{supernatant}$: enkapsüle edilmeyen galangin konsantrasyonu

3.2.7. Galangin yüklü lipozomların kitosan-gam arabik ile modifiye edilmesi

Elde edilen optimum lipozomlar kitosan (polikatyon, CH) ve gam arabik (polianyon, GUA) ile katman katman biriktirme tekniği ile kaplanmıştır. Lipozomlar önce CH ile kaplanarak pozitif yüklenmiş, daha sonra GUA ile kaplanarak tekrar negatif yüklenmiştir. Optimum lipozomların (O-Lipozom) CH ile kaplanması için, 10 mL O-Lipozom, 10 mL CH çözeltisinin içerisine şırınga ile damla damla eklenmiş ve 1 sa boyunca 200 rpm'de çoklu manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 1 sa sonunda pH 5,5'e ayarlanarak 30 dk santrifüjlenerek 0,45 µm PVDF filtreden süzülmüştür. CH kaplı optimum lipozomların (CH-Lipozom) gam arabik ile kaplanması için, 20 mL kitosan kaplı optimum lipozom 20 mL GUA çözeltisine damla damla eklenmiştir ve 1 sa boyunca 200 rpm'de çoklu manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 1 sa sonunda pH 5,5'e ayarlanarak 30 dk santrifüjlenerek 0,45 µm PVDF filtreden süzülmüştür (Şekil 3.2). Elde edilen gam arabik-kitosan kaplı lipozomlar (GUA-CH-Lipozom) kullanılana kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Liu vd., 2013).



Şekil 3.2. Galangin yüklü lipozomların modifiye edilmesi

3.2.8. Lipozomların karakterizasyonu

Lipozomların karakterizasyonu morfoloji, boyut, hidrodinamik çap, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve FTIR analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

FTIR analizi

Lipozomların yapısal karakterizasyonu FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir. FTIR analizi ile lipozomlara galangin yüklenmesinin ve yüzey modifikasyonunun lipozomların yapısında meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Lipozomların FTIR analizi 400-4000 cm^{-1} frekans aralığında gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde örnekler liyofilize edilmiştir (-85°C, 0,1 mbar, LabConco Freezone). FTIR analizi Bursa Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü'nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Morfoloji ve boyut analizi

Lipozomların yüzey morfolojisi FE-SEM ile belirlenmiştir. Analiz öncesinde örnekler liyofilize edilmiştir (-85°C, 0,1 mbar, LabConco Freezone). Liyofilize örnekler karbon bantlar üzerine konularak numune tutuculara yerleştirilmiştir ve yüzeyleri palladyum-altın alaşımı ile kaplanmıştır. Görüntüleme 3,00 kV çözünürlük ve 20,00 KX büyütmede gerçekleştirilmiştir. Morfoloji ve boyut analizi Bursa Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Hidrodinamik çap, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli analizi

Lipozomların hidrodinamik çapı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli Dinamik Işık Saçılımı (DLS)'nı temel alan Malvern Zetasizer Nano-ZS kullanılarak belirlenmiştir. Lipozom numuneleri 30 dk homojenize edilmiş ve ardından 1:10 oranında ultra saf su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen numuler 10 dk sonike edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 25°C de üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hidrodinamik çap, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli analizleri Gazi Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. *In vitro* ilaç salım çalışması

Lipozomların *in vitro* ilaç salım çalışması diyaliz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diyaliz torbaları 40 x 90 mm boyutunda kesilmiş ve 1 gece ultra saf su içerisinde bekletilmiştir. 10 mL O-Lipozom, CH-Lipozom ve GUA-CH-Lipozom diyaliz torbalarına koyulmuştur. Diyaliz torbaları 90 mL pH 7,4 fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içeren balonlara koyulmuştur. Balonlar 37°C sıcaklığa ve 100 rpm çalkalama hızına ayarlanarak sıcaklık programlı çalkalayıcıya yerleştirilmiştir ve 5 sa boyunca her 30 dk da bir balonlardan örnek alınıp şişelere PBS çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin absorbansı 360 nm'de UV-GB spektrofotometresinde okunmuştur. Ortama salınan galangin miktarı, standart galangin çözeltisi kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Briuglia vd., 2015; Panwar vd., 2010).

3.2.10. İlaç salım kinetiği

Lipozomların galangin salım mekanizmasını belirlemek için *in vitro* salım çalışmasından elde edilen veriler çeşitli ilaç salım kinetik modelleri kullanılarak işlenmiştir. Salım verileri Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Higuchi, sıfırıncı dereceden ve birinci dereceden kinetik modellerine uydurulmuştur (Solanki vd., 2020).

Sıfırıncı derece kinetik model

Sıfırıncı dereceden salım kinetiği, salım hızının ilacın konsantrasyonundan bağımsız olduğu ve bir ilacın taşıyıcı sistemden sabit salımını tanımlar (Fr ve Venkatesham, 2023). Bu modele göre ilaç seviyesi dağıtım boyunca sabit kalır. Sıfırıncı dereceden ilaç salım kinetiği için model grafiği, kümülatif ilaç salımına (Q) karşı zaman (t) ile çizilir (Baishya, 2017; Lu ve Hagen, 2020). Sıfıncı derece kinetik model denklemi şu şekildedir:

$$Q = Q_0 + k \times t \tag{3.6}$$

Q: t anında salınan ilaç miktarı, Q_0: başlangıç ilaç miktarı, t: zaman, k: salım sabiti

Birinci derece kinetik model

Birinci dereceden salım kinetiği, salım hızının ilacın konsantrasyonuna bağlı olduğu bir taşıyıcı sistemden ilaç salımını tanımlar (Fr ve Venkatesham, 2023). Bu modele göre ilaç salım hızı ilacın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır, konsantrasyon arttıkça ilaç salım hızı artar. Birinci dereceden ilaç salım kinetiği için model grafiği kalan ilacın logaritmasına (%) karşı zaman (t) ile çizilir (Baishya, 2017; Lu ve Hagen, 2020). Birinci derece kinetik model denklemi şu şekildedir:

$$Q/Q_0 = 1 - e^{(-k \times t)} \tag{3.7}$$

Q: t anında salınan ilaç miktarı, Q_0: başlangıç ilaç miktarı, t: zaman, k: salım sabiti

Higuchi kinetik modeli

Higuchi salım kinetiği, ilaçların katı bir dozaj formundan salınımını zamana bağlı bir sürecin karekökü olarak tanımlar (Fr ve Venkatesham, 2023). Bu modele göre serbest bırakılan ilaç konsantrasyonu zamanın karekökü ile artar (Trucillo, 2022). İlaç difüzyon ve çözünme yoluyla salınabilir (Ekenna ve Abali, 2022). Higuchi modeli katı bir ilacın granüler bir matristen salınması, çevredeki sıvının eş zamanlı olarak nüfuz etmesini, ilacın çözünmesini ve ilacın interstisyel kanallar veya gözenekler yoluyla dışarı sızmasını içerir (Singhvi ve Singh, 2011). Higuchi ilaç salım kinetiği için model grafiği kümülatif ilaç salımına (Q) karşı zamanın karekökü (t) ile çizilir (Baishya, 2017; Lu ve Hagen, 2020). Higuchi kinetik model denklemi şu şekildedir:

$$Q = k \times t^{1/2} \tag{3.8}$$

Q: t anında salınan ilaç miktarı, Q_0: başlangıç ilaç miktarı, t: zaman, k: salım sabiti

Korsmeyer-Peppas kinetik modeli

Polimerik bir sistemden ilaç salımını zamanın bir fonksiyonu olarak, fraksiyonel ilaç salımı olarak tanımlar (Singhvi ve Singh, 2012; Trucillo, 2022). Korsmeyer-Peppas ilaç salım kinetiği için model grafiği log kümülatif % ilaç salımına karşı log zaman ile çizilir (Baishya, 2017; Lu ve Hagen, 2020). Grafiğin eğimi '*n*' ilaç salım mekanizmasını gösterir. *n* değeri 0,45 ise difüzyon salımı ya da Fickian salımıdır, zamanın kareköküne bağlıdır. 0,45 < *n* < 0,89 ise Fickian olmayan salımdır, difüzyon ve şişmedir, zamana bağlıdır, birinci derecedendir. *n* > 0,89 ise salım şişme kontrollüdür, zamandan bağımsızdır ve sıfırıncı dereceden Vaka II taşımasıdır (Ekenna ve Abali, 2022). Korsmeyer-Peppas kinetik model denklemi şu şekildedir:

$$Q/_{Q_0} = k \times t^n \tag{3.9}$$

Q: t anında salınan ilaç miktarı, Q_0: başlangıç ilaç miktarı, t: zaman, k: salım sabiti, n: difüzyonel salım üssü (ilaç salım mekanizmasını gösterir)

Hixson-Crowel kinetik modeli

Hixson ve Crowell salım kinetiği, katı bir dozaj formundan ilaç salım hızının, ilaç partiküllerinin yüzey alanı ve dozaj formunda kalan ilaç miktarının küp kökü ile ilişkili olması ile tanımlanır (Fr ve Venkatesham, 2023). Bu modele göre ilaç salım hızı difüzyon ile değil partikül çözünme hızı ile sınırlıdır. Hixon-Crowel salım kinetiği için model grafiği zamana karşı kalan ilaç yüzdesinin küp kökü ile çizilir (Ekenna ve Abali, 2022). Hixson-Crowel kinetik model denklemi şu şekildedir:

$$Q^{1/3} \Big/ Q_0^{1/3} = k \times t \tag{3.10}$$

Q: t anında salınan ilaç miktarı, Q_0: başlangıç ilaç miktarı, t: zaman, k: salım sabiti

3.2.11. *In vitro* gastro-intestinal sindirim çalışması

Lipozomların gastro-intestinal sindirim koşullarında galangin salım davranışını belirlemek için ardışık *in vitro* gastro-intestinal sindirim çalışması gerçekleştirilmiştir. Mide sindirimi için 20 mL O-Lipozom, CH-Lipozom, GUA-CH-Lipozom ve kontrol olarak 9,5 mg/mL galangin ekstraktı balonlara koyularak ve üzerlerine 20 mL SGF eklenmiştir. 37°C'de 100 rpm'de 2 sa boyunca sıcaklık programlı çalkalayıcıda karıştırılmıştır. 0-120 dk boyunca örnek alınıp, şişelere SGF eklenmiştir ve örnekler buz kasetleri içeren soğuk su banyosuna yerleştirilerek sindirim reaksiyonu durdurulmuştur. Daha sonra deney tüpleri 30 dk 6000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bağırsak sindirimi için mide sindirimi sonunda şişelere 40 mL SIF eklenerek bağırsak sindiriminde gerçekleştirilen işlemler gerçekleştirilmiştir. 240 dk boyunca 30 dk aralıklarla toplanan santrifügatların absorbansı 360 nm'de UV-GB spektrofotometresinde ölçülmüştür. Standart galangin çözeltisi kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği ile örneklerdeki galangin konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.12. Biyoerişilebilirlik çalışması

Simüle gastro-intestinal ortamda galanginin biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi için *in vitro* sindirim çalışmasından sonra toplanan örneklerler kullanılmıştır. Örnekler 30 dk boyunca 6000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Toplanan süpernatantın biyoaktif bileşiğin çözündüğü misel fraksiyonu olduğu varsayılmıştır. Süpernatantın absorbansı UV-GB spektrofotometresi ile 360 nm'de ölçülerek standart galangin kalibrasyon eğrisi ile misel fazındaki galangin miktarı belirlenmiştir. Galanginin biyoerişilebilirliği Eşitlik 3.11 ile hesaplanmıştır (Altin vd., 2018; Maria Leena vd., 2020; Tan vd., 2014).

$$\text{Biyoerişilebilirlik (\%)} = \frac{\text{GA}_{\text{misel}}}{\text{GA}_{\text{toplam}}} \times 100 \qquad (3.11)$$

GA_{misel}: misel fazındaki galangin miktarı (mg), GA_{toplam}: lipozomlarda (O-Lipozom, CH-Lipozom, GUA-CH-Lipozom) bulunan toplam galangin miktarı (mg)

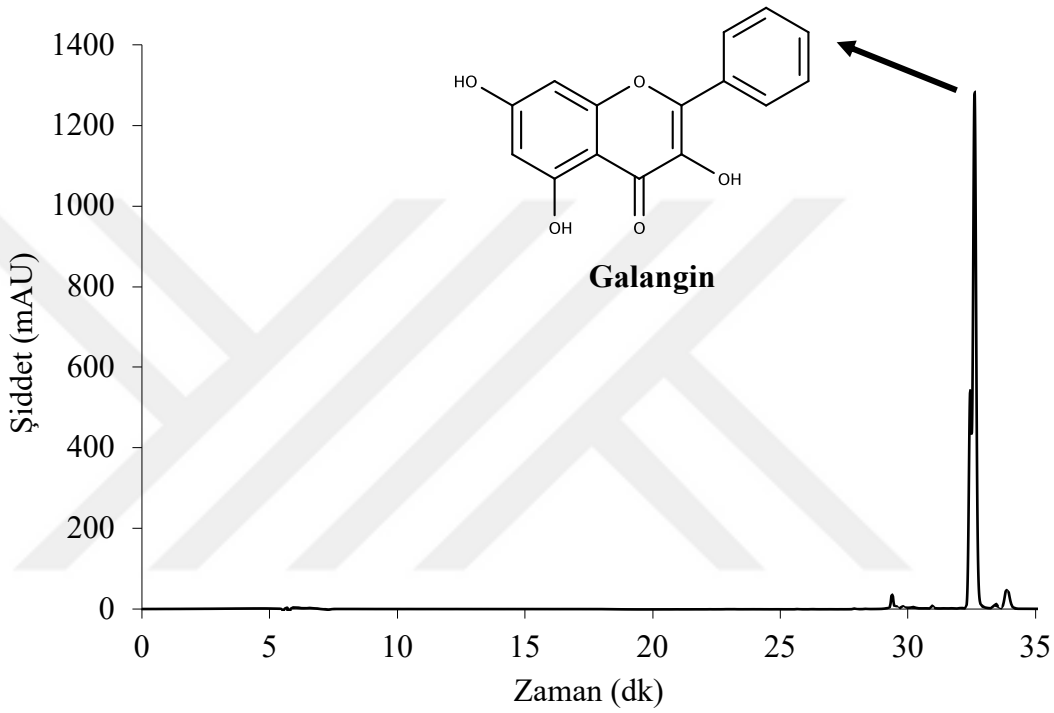
3.2.13. Depolama stabilitesi

Lipozomların stabilite çalışması 10 mL O-Lipozom, CH-Lipozom, GUA-CH-Lipozom 28 gün boyunca +4°C'de buzdolabında, -24°C'de buzdolabında ve oda sıcaklığında bekletilerek gerçekleştirilmiştir. 0.gün olarak kabul edilen başlangıç gününde, 1, 7, 14 ve 28. günlerde depolanan lipozomlardan örnekler alınarak, 6000 rpm'de 2 sa santrifüjlenmiş ve enkapsülasyon etkinliği UV-GB spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Standart galangin çözeltisi kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği ile örneklerdeki galangin konsantrasyonu belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *A. officinarum* Ekstraktında Bulunan Fenolik Maddelerin Analizi

A. officinarum ekstraktında bulunan fenolik maddelerin belirlenmesi için gerçekleştirilen HPLC-DAD analizi sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *A. officinarum* ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı

HPLC kromatogramına göre alıkonma zamanı 32,61 dk olan bileşenin galangin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Galangin miktarı standart galangin çözeltisiyle hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *A. officinarum* ekstraktının HPLC analizi verileri

Fenolik bileşen	Alıkonma zamanı (dk)	Kalibrasyon denklemi	R^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Miktar (mg/g)
Galangin	32,61	y= 52,487x - 3,4043	0,9994	0,0114	0,0380	11,5694

HPLC kromatogramına göre en şiddetli pik galangine aittir ve *A. officinarum* ekstraktının ana bileşeni galangindir. HPLC analizi sonucunda, *A. officinarum* ekstraktında bulunan galangin miktarı 11,5694 mg/g olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Tao vd. (2006), çalışmalarında on iki farklı bölgeden toplanan *A. officinarum* rizomlarının biyoaktif flavonoid içeriğini belirlemek için rizomlardan metanol ekstraktı hazırlayarak HPLC analizi gerçekleştirmişlerdir. *A. officinarum* rizomlarının metanol ekstraktının HPLC analizi sonucunda her ekstraktta galangin ve 3-O-metil galangin olmak üzere iki bileşen tespit edilmiştir. Galangin miktarı ekstrakttaki 3-O-metil galangin miktarından yaklaşık on kat fazla bulunmuştur; analiz edilen tüm örneklerde galangin içeriği 2,63-11,6 mg/g arasında değişirken, 3-O-metil galangin içeriği 0,240-1,13 mg/g arasında değişmiştir. Bu sonuçlara göre galangin *A. officinarum* rizomlarının metanol ekstraktının temel bileşenidir.

Fang vd. (2018) *A. officinarum* rizomlarının etil asetat ekstraktındaki antioksidan bileşiklerin görüntülenmesi için DPPH-HPLC analizi gerçekleştirmişlerdir. Buna göre ekstraktlara DDPH reaktifi eklenerek ve eklenmeden HPLC analizi yapılmıştır. Analiz sonunda HPLC kromatogramında iki temel bileşen piki vardır ve DPPH reaktifinin eklenmesiyle bu bileşenlerin pikleri neredeyse yok olmuştur. Buna göre bu pikler *A. officinarum* etil asetat ekstraktının antioksidan aktivitesinden sorumlu olan bileşiklerdir. HPLC kromatogramına göre iki bileşenden birinin piki diğerinden yaklaşık 2 kat daha şiddetlidir. Bu iki pik hedeflenerek yüksek hızlı karşı akım kromatografisi (HSCCC) ile ayrılmıştır. Sonuç olarak, sırasıyla %99,3 ve %98,5 saflıkta 107 mg bileşik I ve 29 mg bileşik II, 270 mg *A. officinarum* etil asetat ekstraktından HSCCC ile tek adımda ayrılmış ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılan iki bileşiğin yapısı ESI-MS, ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR ile aydınlatılmıştır. Buna göre bileşik I galangin, bileşik II kamferiddir, galangin *A. officinarum* etil asetat ekstraktının temel bileşenidir.

Jiao vd. (2019), çalışmalarında on beş farklı bölgeden toplanan *A. officinarum* rizomlarının etanol ekstraktının (%95) HPLC analizi sonucunda, ekstraktın galangin, galangin-3-metil eter, pinobaksin, kamferid-4-metil eter, 5-hidroksi-1-fenil-7-(4-hidroksifenil)-3-heptanon, 7-(4-hidroksifenil)-1-fenil-4-hepten-3-on, 5-hidroksi-7-(4-

hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon, 7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-4-hepten-3-on, 5-hidroksi-1,7-di fenil-3-heptanon içerdiğini belirlemişlerdir. HPLC kromatogramları incelendiğinde ise en şiddetli pikin galangine ait olduğu görülmektedir. Bu doğrultuda farklı bölgelerden toplanmış olsalar da *A. officinarum* etanolik ekstraktlarının ana bileşeni galangindir ve galangin miktarının 5,46 ile 13,14 mg/g aralığında değişmektedir.

Lin vd. (2020), *A. officinarum* etanol ekstraktının (%80) LC-MS/MS analizi sonucunda ekstraktın kamferid, 3-metil galangin ve galangin olmak üzere üç temel bileşen içerdiğini ve kromatogramda bu bileşenlerden en şiddetli pike ve dolayısıyla en yüksek konsantrasyona galanginin sahip olduğunu belirtmişlerdir. Pirzadeh vd. (2021), *A. officinarum* rizomlarının hidroalkolik (%40 etanol) ekstraktının HPLC analizi sonucunda ekstraktın kamferol, kuersetin ve galangin içerdiğini ve galangin miktarının 5,8 mg/g olduğunu belirlemişlerdir. Li vd. (2021), *A. officinarum*'nun %95 etanolik ekstraktının ana bileşeninin galangin olduğunu bildirmiştir. Lee vd. (2017), *A. officinarum* ekstraktının temel bileşenin galangin olduğunu ve miktarının 1,69 mg/g olduğunu bildirmişlerdir.

Wang vd. (2022), geliştirdikleri HPLC-DAD-CAD metodu ile *A. officinarum* metanol ekstraktında dört diarilheptanoid; 5-hidroksi-7-(4-hidroksifenil)-1-fenil-3-heptanon, 5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon, 5-metoksi-1,7-difenilheptan-3-on, 5-hidroksi-1,7-difenil-3-heptanon ve dört flavonoid; pinocembrin, galangin, kampferid-4′-metil eter, galangin-3-metil eter belirlemişlerdir.

Yukarıda verilen çalışmalar incelendiğinde, kullanılan çözücü ve ekstraksiyon tekniği değişse bile her *A. officinarum* ekstraktında galangin tespit edilmiştir. Buna ek olarak her ekstraktın temel bileşenin galangin olduğu ve en yüksek konsantrasyonda bulunduğu belirtilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlar literatürdeki pek çok benzer çalışma ile uyumludur.

4.2. Spektroskopik Analizler

A. officinarum ekstraktının spektroskopik analizleri sonucunda elde edilen verilen çizelge 4.2.'de verilmiştir. Buna göre *A. officinarum* ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 113, 6100 ± 3,2854 GAE/g, toplam antioksidan kapasitesi 28,8121 ± 0,0074 mg TE/g ve toplam flavonoid içeriği 5,7593 ± 0,0644 mg QE/g olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. *A. officinarum* ekstraktının spektroskopik analiz sonuçları

Folin-Ciocalteu (mg GAE/g örnek)	**ABTS (mg TE/g örnek)**	**Toplam Flavonoid (mg QE/g örnek)**
113,6100 ± 3,2854	28,8121 ± 0,0074	5,7593 ± 0,0644

Dou vd. (2010), *A. officinarum* metanol ekstraktının etil asetat, aseton-metanol ve metanol ile fraksiyonlarının toplam fenolik madde içeriğini belirlemişlerdir. Buna göre fenolik madde içeriği sırasıyla aseton-metanol fraksiyonu > etil asetat fraksiyonu > metanol fraksiyonu > ham metanol ekstraktı (221,36 ± 2,79 > 139,55 ± 0,58 > 128,94 ± 1,67 > 98,64 ± 1,35 mg GAE/g) şeklindedir. Xia vd. (2010), *A. officinarum* etanol ekstraktının (%70) 359,6 ± 6,1 mg GAE/g fenolik madde ve 289,9 ± 5,3 mg RE/g flavonoid içerdiğini belirtmiştir.

Lin vd. (2015), *A. officinarum* metanolik ekstraktının, 4927,8 ± 101,1 mg GAE/100 g fenolik madde ve 593,2 ± 22,2 mg QE/100 g toplam flavonoid içerdiğini, su ekstraktının ise 1354,3 ± 23,1 mg GAE/100 g toplam fenolik madde ve 59,1 ± 0,5 mg QE/100 g toplam flavonoid içerdiğini ve etil asetat ekstraktının 1834,7 ± 211,9 mg GAE/100 g toplam fenolik madde ve 221,4 ± 67,1 mg QE/100 g toplam flavonoid içerdiğini bildirmişlerdir.

Krishnaveni vd. (2017), *A. officinarum* rizomlarının toplam fenolik madde içeriğinin 33,0 ± 0,00 mg/g, flavonoid içeriğinin 2,00 ± 0,00 mg/g ve toplam antioksidan kapasitesinin 18,00 ± 2,12 mg/g olduğunu bildirmişlerdir. Zhang vd. (2017), *A. officinarum* su ekstraktının 5,20 ± 0,14 mg GAE/g fenolik bileşik, 14,38 ± 1,67 mg QE/g flavonoid içerdiğini bildirmişlerdir.

Antioksidan aktivite bitkinin yapısında bulunan çeşitli bileşenlerden kaynaklanır. Bu bileşenlerden en fazla katkıyı sağlayan ise fenolik bileşiklerdir (Muflihah vd., 2021). Bu katkının temel nedeni öncelikle fenolik hidroksil gruplarıdır (Carocho ve Ferreira, 2013). Fenolik hidroksil gruplarının çokluğu antioksidan aktiviteyi arttırır. Bunun yanı sıra flavonoid yapısının C halkasının 4 pozisyonunda okso grubunun varlığı, C halkasının 2-3 pozisyonunda bir çift bağın varlığı ve elektron delokalizasyonu antioksidan aktiviteye katkı sağlar (Bubols vd., 2013).

Galanginin flavonoid halkasında yer alan 3 (C halkası), 5 ve 7 pozisyonunda (A halkası), olmak üzere üç hidroksil grubu, 4 pozisyonunda okso grubu (C halkası) ve C halkasının 2 ve 3 pozisyonunda bir çift bağa ve elektron delokalizasyonuna sahip olması yüksek antioksidan aktivitesini yapısal olarak açıklamaktadır.

Literatürde sıklıkla antioksidan kapasite ile toplam fenolik madde ve toplam flavonoid ilişkisi ele alınmıştır. Muflihah vd. (2021), çalışmalarında antioksidan kapasite, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışma sonucuna göre antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde arasında daha güçlü bir korelasyon elde ederek, bitkilerin antioksidan kapasitesi ile toplam fenolik madde arasında toplam flavonoidden daha güçlü pozitif ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır.

Nur vd. (2019) da çalışmalarında toplam fenolik maddenin ve toplam flavonoidin antioksidan kapasite üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Antioksidan kapasite ile toplam fenolik madde arasında güçlü bir korelasyon bulunurken, toplam flavonoidle bulunamamıştır. Literatür incelendiğinde de toplam fenolik maddenin artışıyla antioksidan kapasitede artış gözlenmektedir (Olajire ve Azeez, 2011; Sant'Ana vd., 2014 Azieana vd., 2017; Osman vd., 2020).

Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumlu olmakla birlikte, bitkinin fenolik madde içeriği, flavonoid içeriği ve bunlarla bağıntılı olarak toplam antioksidan kapasitesi yetiştirilme bölgesi, ekstraksiyon prosedürü gibi faktörlerden etkilenmektedir.

4.3. Kemometrik Analizler

Lipozomların çeşitli amaçlara yönelik kullanımında verimliliğini etkileyen en önemli faktör enkapsülasyon etkinliğidir. Enkapsülasyon etkinliği lipozomlara yüklenmek istenen bileşenin yükleme başarısını gösterir. Enkapsülasyon etkinliğinin yüksek olması lipozomlara yüklenen bileşenin hedeflenen amaca yönelik işlevselliğini başarıyla yerine getireceğenin göstergesidir. Ancak enkapsülasyon etkinliği lipozom üretiminde kullanılan yapısal bileşenlerin miktarlarından ve hazırlama tekniğinin çeşitli adımlarından kolaylıkla etkilenebilir. Bu nedenle bu faktörlerin optimizasyonu yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlamak açısından büyük önem arz etmektedir.

Maksimum enkapsülasyon etkinliği ile lipozomların üretilmesi için lipozom üretim parametreleri RSM-CCD kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon için değişkenlerin seçilmesi sürecinde literatür incelenerek en önemli faktörler olarak lipozomların yapısal bileşenleri olan fosfatidilkolin, kolesterol, yapıya yüklenecek olan bileşen olan Galangin ve ince film hidrasyon yönteminde önemli bir basamak olan ultrasonikasyon süresi seçilmiştir.

Seçilen değişkenler için belirlenen seviyeler çeşitli ön denemeler sonucunda seçilmiştir. Buna göre PC oranı (1-9 mg:mL), CHOL oranı (0,2-1,8 mg:mL), Ultrasonikasyon zamanı (15-55 dk) ve GA oranı (0,1-0,5 mg:mL)'dır. Değişkenlerinin en uygun kombinasyonu lipozom üretimi için optimum koşulları belirlemek amacıyla araştırılmıştır. En yüksek enkapsülasyon etinliğine sahip lipozomları üretmek için 30 deney yapılmıştır.

Deneysel ve tahmini enkapsülasyon etkinliği yüzdeleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. 6'sı tekrar 30 deney arasında, deney 17 (PC oranı; 1 mg:mL, CHOL oranı; 1 mg:mL, Süre; 35 dk, GA oranı; 0,3 mg:mL) %93,19 ile en yüksek enkapsülasyon etkinliğine ve deney 23 (PC oranı; 5 mg:mL, CHOL oranı; 1 mg:mL, Süre; 35 dk, GA oranı; 0,1 mg:mL) %7,87 ile en düşük enkapsülasyon etkinliğine sahiptir.

Çizelge 4.3. Deneysel ve tahmini enkapsülasyon etkinliği yüzdeleri

Deney	Enkapsülasyon etkinliği (%)	
	Deneysel değer	**Tahmini değer**
1	34,43	34,04
2	21,38	23,64
3	40,52	40,63
4	20,83	17,22
5	30,14	29,91
6	21,30	21,83
7	32,88	35,38
8	12,34	14,31
9	53,87	53,43
10	32,08	28,51
11	71,02	69,42
12	29,75	31,50
13	41,48	44,02
14	20,02	21,44
15	59,64	58,91
16	24,00	23,32
17	93,19	92,55
18	46,37	46,56
19	19,43	18,60
20	26,70	27,07
21	26,93	29,91
22	21,02	17,59
23	7,87	6,54
24	34,06	34,94
25	19,29	18,96
26	14,64	18,96
27	16,56	18,96
28	22,24	18,96
29	17,73	18,96
30	23,32	18,96

Çizelge 4.3'te verilen tahmini ve deneysel enkapsülasyon etkinlikleri incelendiğinde deneysel ve tahmini değerler birbirine yakındır. Bu da oluşturulan deneysel dizayn sonucunda elde edilen modelin enkapsülasyon etkinliğini tahmin etmede başarılı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Lipozom üretimi için ANOVA analizi verileri

Kaynak	**Lipozom üretimi (R^2 = 0,9860)**				
	DF	SS	MS	*F* değeri	*p*-değeri
Model	14	9676,57	691,18	75,63	<00001
Lack of fit	10	81,20	8,12	0,73	0,6887
Pure error	5	55,89	11,18		

Çizelge 4.4'e göre, ikinci dereceden polinom modeli, ANOVA'dan elde edilen 0,0001'den küçük bir *p*-değeri, yanıt ile önemli parametreler arasındaki gerçek ilişkiyi gösterecek niteliktedir. Model F değerinin 75,63 olması, modelin %95 güven aralığında olduğunu göstermektedir.

ANOVA analizi enkapsülasyon etkinliği ile PC oranı, CHOL oranı, Ultrasonikasyon zamanı ve GA oranı gibi lipozom üretim parametreleri arasındaki ilişkinin ikinci dereceden olduğunu ve iyi bir regresyon katsayısına (R^2 = 0,9860) sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.4).

Enkapsülasyon etkinliği için ikinci dereceden denklem Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. İkinci derece polinom denklemi

Yanıt	**İkinci derece polinom denklemi**
Enkapsülasyon etkinliği (%)	$y = 44{,}26 - 22{,}38x_1 + 9{,}17x_2 - 7{,}03x_3 + 19{,}53x_4 - 3{,}25\,x_1x_2 - 7{,}26\,x_1x_4 - 4{,}70\,x_2x_4 + 12{,}65x_1^2$

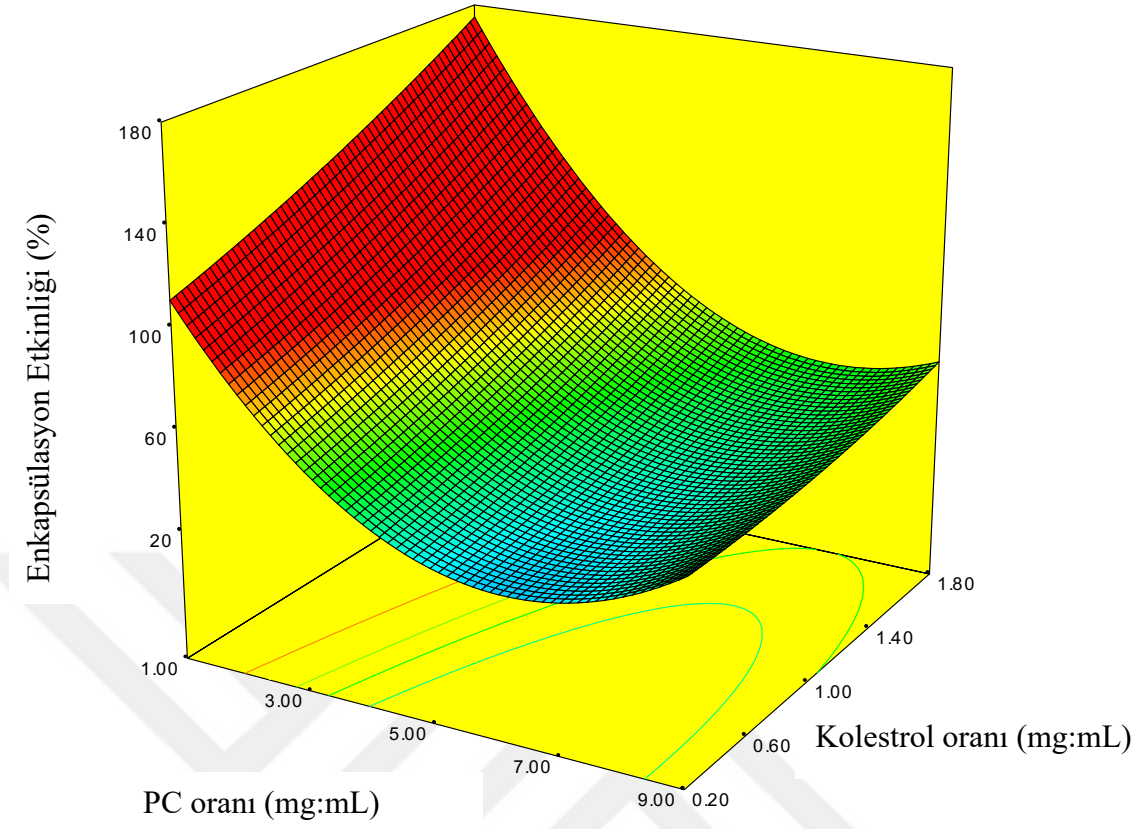
Enkapsülasyon etkinliği açısından, lipozom üretiminde önemli faktörler (p-değeri < 0,05) $x_1, x_2, x_3, x_4, x_1x_2, x_1x_4, x_2x_4, x_1^2$ ve en az etkili faktörler $x_1x_3, x_2x_3, x_3x_4, x_2^2, x_3^2, x_4^2$'dir.

PC oranı, x_1 (p-değeri < 0,0001) ve PC oranının karesi, x_1^2 (p-değeri < 0,0001) enkapsülasyon etkinliğini etkileyen en önemli faktörlerdir. PC'ler lipozomların ana bileşenleridir, bu nedenle lipozom üretimi için PC oranı CHOL, GA ve Ultrasonikasyon zamanından çok daha önemlidir. Maherani vd. (2012) lipozomların enkapsülasyon etkinliğini en çok etkileyen faktörün lipit bileşimi olduğunu belirterek, maksimum enkapsülasyon etkinliği için yalnızca lipit bileşimini optimize etmiştir.

Optimize edilen lipozom bileşiminde ana bileşenler galangin, fosfatidilkolin ve kolesteroldür. Lipozomlar sadece fosfatidilkolinlerin varlığıyla üretilebilir, ancak yapısal morfoloji, stabilite ve aktif maddeleri enkapsüle edebilmeleri için gerekli olan alanların oluşturulmasında en etkili değişken kolesterol olmadan maksimum aktivite ile üretilemezler. Bu nedenle enkapsülasyon etkinliği açısından etkili faktörlerin kolesterol, galangin ve fosfatidilkolin olması şaşırtıcı değildir.

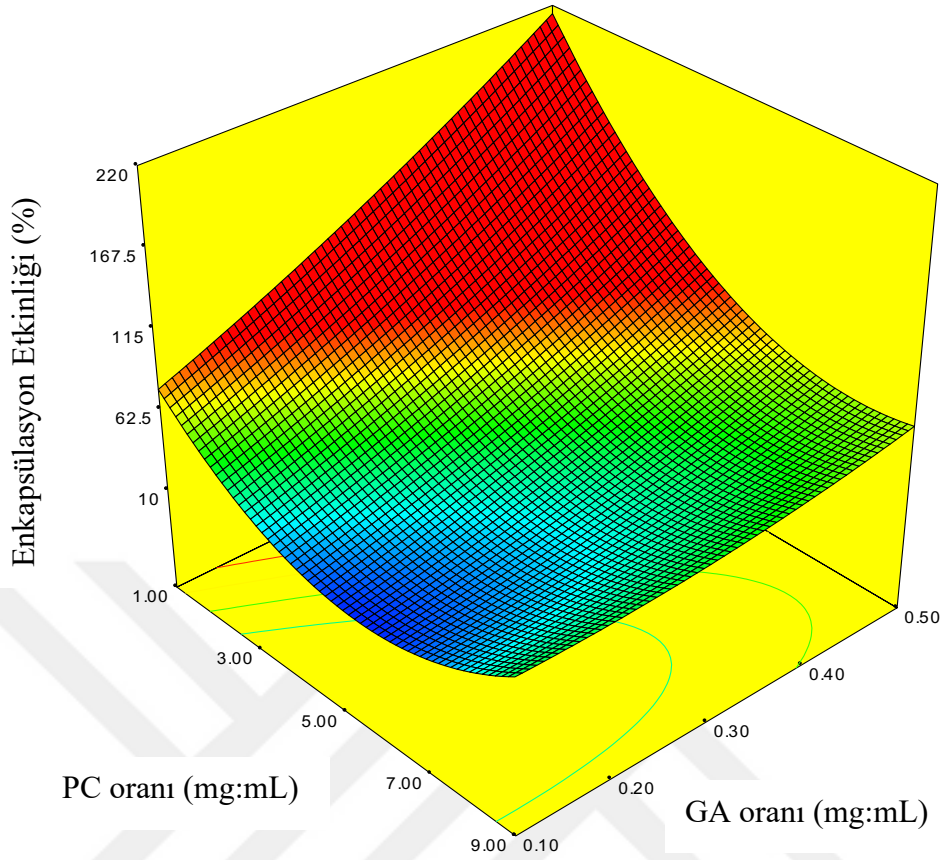
Yanıt yüzey analizi

Lipozom üretim parametreleri ile enkapsülasyon etkinliği arasındaki önemli etkileşimler yanıt yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Yanıt yüzey grafikleri yalnızca yanıt değer üzerinde etkili olan faktörlerin ikili etkileşimlerini göstermektedir. Buna göre yanıt yüzey grafikleri PC, CHOL ve GA oranlarının birbirleriyle etkileşimlerini ele almaktadır. Şekil 4.2'de PC oranı ve CHOL oranının, Şekil 4.3'te PC oranı ve GA oranının, Şekil 4.4'te CHOL oranı ve GA oranının enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkileri ve bunların birbirleriyle etkileşimleri gösterilmektedir.



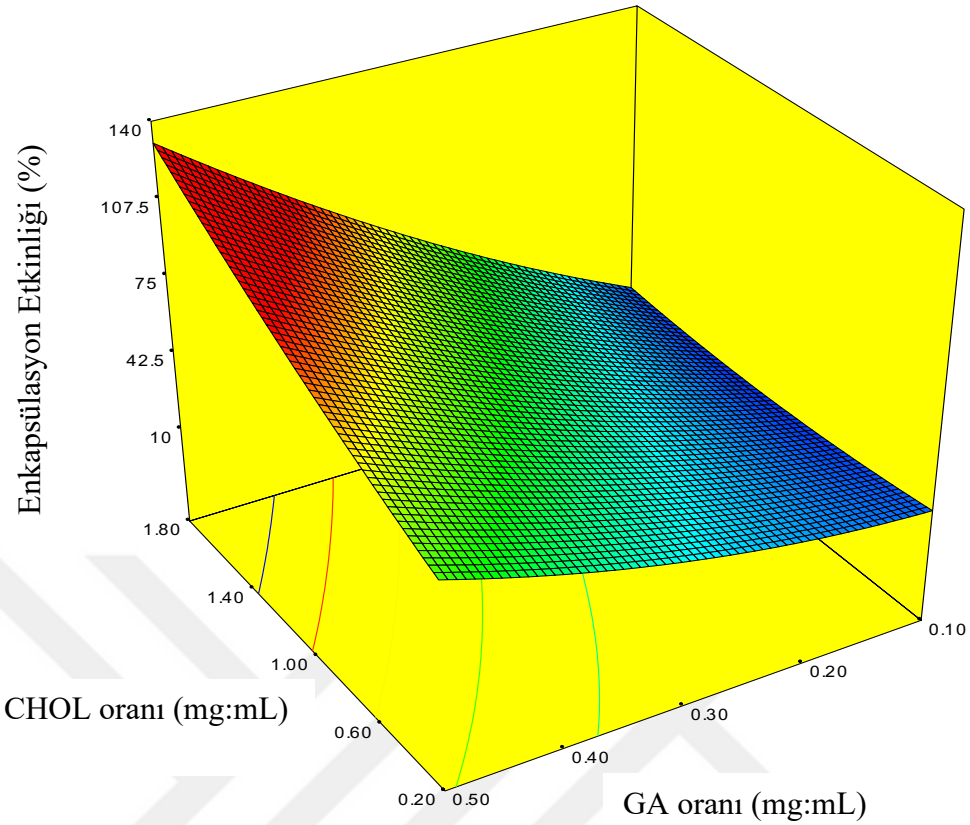
Şekil 4.2. Enkapsülasyon etkinliğine PC ve CHOL etkisi

Şekil 4.2'de verilen yanıt yüzey grafiğine göre hem CHOL oranı hem de PC oranı enkapsülasyon etkinliğini arttırmada etkilidir. Buna göre, CHOL oranı sabit tutulur ve PC oranı azaltılırsa, enkapsülasyon etkinliği azalır. Ancak PC oranı daha fazla azaltılırsa, enkapsülasyon etkinliği artmaya başlar. En yüksek enkapsülasyon etkinliği en düşük PC ve CHOL oranında gözlenmektedir. Enkapsülasyon etkinliğinin arttırılmasında PC oranı olumsuz, CHOL oranı ise olumlu bir etkiye sahiptir (Xiong vd., 2009). Lipozom oluşumu için PC miktarının çok yüksek olması istenmez çünkü PC miktarı arttıkça oluşacak lipozomu stabilize edecek CHOL miktarının da artması gerekir. CHOL molekülleri lipozom oluşumu için lipit moleküllerinin daha iyi paketlenmesini sağlayarak enkapsülasyon etkinliğini arttırır (Ahmed vd., 2019).



Şekil 4.3. Enkapsülasyon etkinliğine PC ve GA etkisi

Şekil 4.3'te, PC ve GA oranın enkapsülasyon etkinliği üzerindeki ikili etkileşimleri verilmektedir. Buna göre GA oranı sabit tutulduğunda ve PC oranı azaldığında enkapsülasyon etkinliği azalmakta, ancak PC oranı daha da azaldığında enkapsülasyon etkinliği artmaya başlamaktadır. En yüksek enkapsülasyon etkinliği en düşük PC oranı ve en yüksek GA oranında, en düşük enkapsülasyon etkinliği ise en düşük GA oranı ve en yüksek PC oranında gözlenmektedir. PC oranının artışı enkapsülasyon etkinliğini olumsuz etkilemektedir ve enkapsülasyon etkinliği arttırmak için yüksek bir PC oranı istenmemektedir (Xiong vd., 2009). Ayrıca, PC oranındaki artış, lipozom oluşumunda istenmeyen bir durum olan daha büyük boyutlu lipozomların oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Hashemi vd., 2018). Bu nedenle istenilen yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip lipozomların üretilmesi için düşük PC oranı ve yüksek GA oranı kullanılmalıdır.



Şekil 4.4. Enkapsülasyon etkinliğine CHOL ve GA etkisi

Şekil 4.4'te, CHOL ve GA oranın enkapsülasyon etkinliği üzerindeki ikili etkileşimleri verilmektedir. CHOL oranı ve GA oranı enkapsülasyon etkinliğini eşit oranda etkilemektedir ve birbirleri ile zıt etkiye sahiptirler. CHOL oranı sabit tutulup GA oranı arttırıldığında enkapsülasyon etkinliği düşmekte, ancak GA oranı sabit tutulup CHOL oranı arttırıldığında ise enkapsülasyon etkinliği artmaktadır. En yüksek enkapsülasyon etkinliği en yüksek CHOL oranı ve en yüksek GA oranında gözlenmektedir. Lipozomun bileşimindeki CHOL miktarındaki artış, yapının daha katı hale gelmesine neden olur (Refaat vd., 2021). Yüksek sertlik ile lipit çift tabakanın geçirgenliği azalır ve ilaç sızıntısı önlenir, bu da yüksek enkapsülasyon etkinliği ile sonuçlanır. CHOL molekülleri, lipozomların lipit çift tabakasının orta bölgesinde hidrofobikliği arttırarak lipit zincirleri arasında boşluklara neden olur. Bu da hidrofobik moleküllerin lipit çift tabakasındaki boşluklara hapsedilmesini kolaylaştırır ve enkapsülasyon etkinliğini arttırır (Deniz vd., 2010). GA hidrofobik bir moleküldür ve GA'nın enkapsülasyon etkinliği CHOL oranının artmasıyla artmıştır.

Lipozom üretim koşullarının optimizasyonu

Çizelge 4.6'da lipozom üretimi için optimum koşullar gösterilmektedir. Lipozom üretimi için optimum koşullar şu şekildedir; PC oranı 1,50 mg:mL, CHOL oranı 0,88 mg:mL, Ultrasonikasyon zamanı 24,73 dk ve GA oranı 0,19 mg:mL'dir.

Çizelge 4.6. Lipozom üretimi için optimum koşullar

Optimum lipozom üretim koşulları			
PC oranı (mg:mL)	CHOL oranı (mg:mL)	Ultrasonikasyon zamanı (dk)	GA oranı (mg:mL)
1,50	0,88	24,73	0,19

Çizelge 4.7'de lipozom üretimi için tahmini ve deneysel yanıt gösterilmektedir. Optimum koşullarda tahmini enkapsülasyon etkinliği %93,77, optimum koşullar altında elde edilen deneysel enkapsülasyon etkinliği yüzdesi ise %93,77 ± 0,05'tir. Bu sonuç, deneysel yanıt ile öngörülen yanıtın uyumlu olduğunu göstermektedir. Bu uyum, modelin geçerliliğini %95 güven aralığında doğrulamaktadır. Dolayısıyla, CCD modeli lipozom üretimi için maksimum enkapsülasyon etkinliğini tahmin etmede doğru ve güvenilirdir.

Çizelge 4.7. Lipozom üretimi için tahmini ve deneysel değerler

Yanıt	**Maksimum değerler**	
Enkapsülasyon etkinliği (%)	Tahmini	Deneysel
	93,77	93,77 ± 0,05

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen %93,77 ± 0,05 deneysel enkapsülasyon etkinliği, ince film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomlar için nispeten yüksek bir değerdir. Çünkü düşük enkapsülasyon etkinliği ince film hidrasyon yönteminin bir dezavantajı olarak görülmektedir. Ancak bu görüşün aksine, birçok yazar galangin gibi lipofilik bileşenler için durumun böyle olmadığını bildirmiştir. Zhu vd. (2018), ince film hidrasyon yöntemiyle %92,36 enkapsülasyon verimliliğine sahip galangin yüklü lipozomlar üretmişlerdir ve yüksek enkapsülasyon etkinliğinin, galanginin soya fosfatidilkolinin hidrofobik bölgeleri ile yüksek etkileşiminden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Landi-Librandi vd. (2012), çalışmalarında galangin, kuersetin, mirisetin ve kampferol gibi lipofilik bileşenleri soya fosfatidilkolin-kolesterol ve soya fosfatidilkolin-kolesterol etil eter içeren lipozomal sistemlere enkapsüle etmiştir. Galanginin enkapsülasyon etkinliği %60-80 ve %80-95 aralığında bulunmuştur. Galangin, bu bileşenler arasında en yüksek enkapsülasyon etkinliği ile lipozomlara yüklenmiştir. Landi-Librandi vd. (2011), yaptıkları bir başka çalışmada aynı bileşenleri kullanarak lipozomal sistemler üretmiş ve benzer bir sonuca ulaşarak galangin içeren lipozomların en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğunu, en hidrofilik bileşen olan mirisetinin ise en düşük enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda enkapsülasyon etkinliğinin sebebinin en lipofilik bileşen olan galanginin lipozomların hidrofobik bölgeleri ile etkileşiminin daha az lipofilik ve hidrofilik bileşenlere göre daha yüksek olması olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen yüksek enkapsülasyon etkinliği diğer çalışmalarla uyumlu olup, galanginin etkin kullanımında en büyük dezavantaj olan yüksek lipofilikliğin lipozomlara hapsedilmesi için bir avantaj olduğunu da göstermektedir. Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde de galangin miktarı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliğinin en yüksek galangin konsantrasyonunda elde edilmesi kolesterolün lipozomların hidrofobik bölgelerininin aktivitesini arttırması ile oldukça hidrofobik bir bileşen olan galanginin en yüksek aktivite ile bu bölgelere yerleşmesi ile sonuçlanmıştır.

4.4. Lipozomların Karakterizasyonu

Lipozom formülasyonlarının boyutları, hidrodinamik çapları, zeta potansiyelleri ve polidispersite indeksi Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Lipozomların hidrodinamik çap verileri

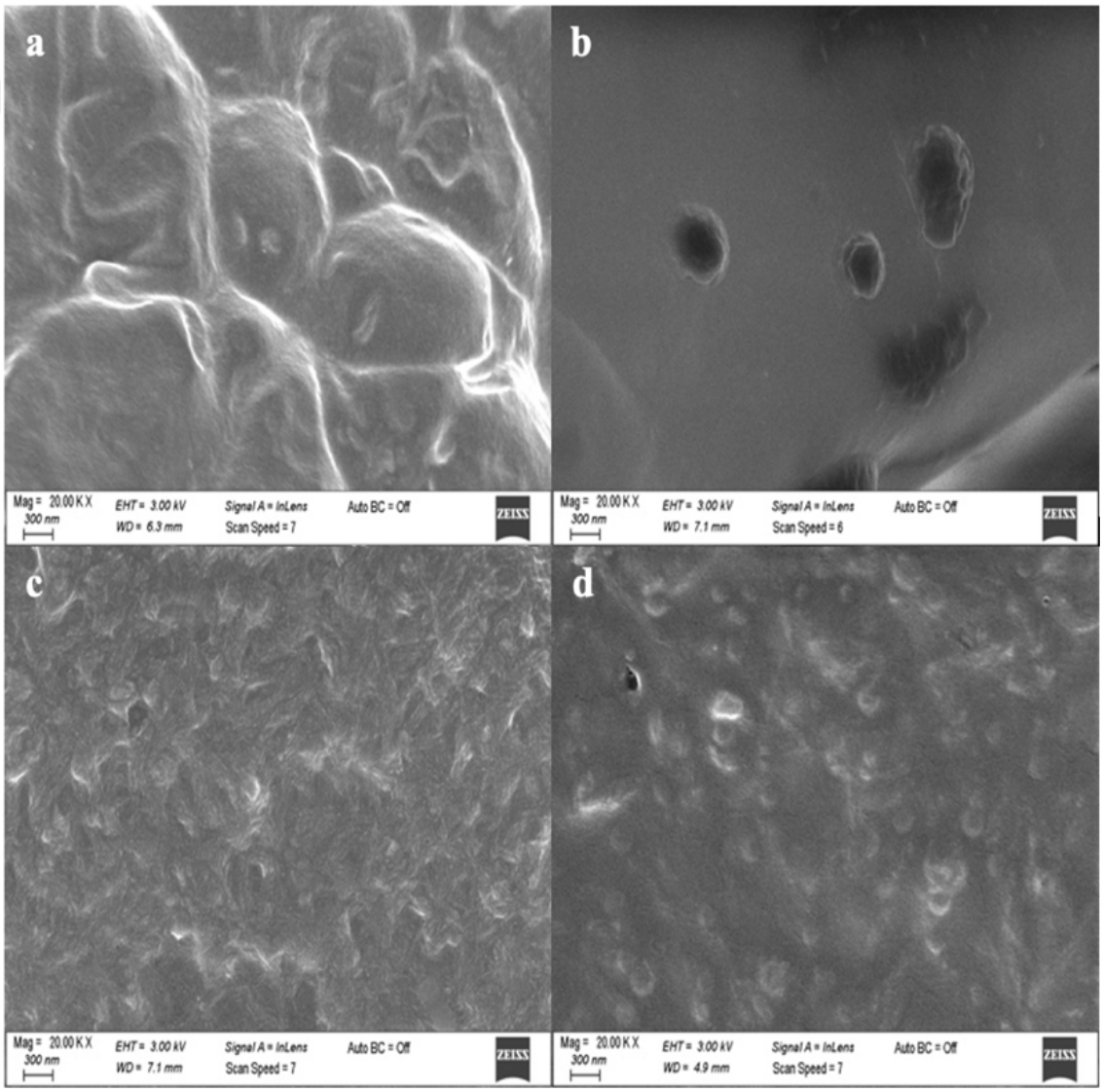
	O-Lipozom	**CH-Lipozom**	**GUA-CH-Lipozom**
Hidrodinamik çap (nm)	234,40 ± 113,4	245,70 ± 249,3	567,00 ± 113

O-Lipozomun hidrodinamik çapı 234,4 ± 113,4 nm, CH-Lipozomun 245,7 ± 249,3 nm ve GUA-CH-Lipozomun 567 ± 113 nm'dir. O-Lipozom, büyük unilamellar veziküldür (LUV). O-Lipozomun ilk katman olarak kitosan ile kaplanması ortalama hidrodinamik çapta küçük bir artışa neden olurken, ikinci katman olarak arap zamkı ile kaplanması büyük bir artışa neden olmuştur. Hidrodinamik çaptaki bu artış lipozomların kitosan ve gam arabik ile başarıyla kaplandığının göstergesidir. Benzer şekilde Bonechi vd. (2021), çalışmalarında kitosan ve hyalüronik asit ile kapladıkları lipozomlarının hidrodinamik çaplarında artış gözlemlemişlerdir ve bu artışın sebebinin lipozomların yüzeyindeki kitosan ve hyalüronik asidin varlığının kanıtı olarak nitelendirmişlerdir. Ayrıca kaplama ile hidrodinamik çaptaki bu artışın nedeni kitosan ve arap zamkının su içerisinde zamanla şişerek lipozom yapısını genişletmesi ve agregasyonun meydana gelmesidir. Agregasyon olgusunu Madrigal-Carballo vd. (2010) ellagik asit yüklü kitosan-dekstran sülfat kaplı lipozomlarında gözlemlemişlerdir. Ellagik asit yüklü lipozomları (300 nm) kitosan ile kaplarken 3000 nm'den büyük agregatları gözlemlemişlerdir. Lipozomlar kitosandan sonra dekstran sülfat tabakası ile kaplandığında tekrar agregat oluşumunu gözlemlemişlerdir. Buna göre iki yüzey temas ettiğinde, arayüzeyde çift elektrik yükü tabakası oluşur ve ardından elektriksel çift tabaka boyunca elektron transferinden kaynaklanan çekici kuvvet nedeniyle yapışma gelişir ve sonuçta partiküllerin toplanarak agregatların oluşmasına yol açar. Mevcut çalışmada çok yüksek oranda agregasyon gözlemlenmese de hidrodinamik çaptaki iki kattan fazla artış agregasyonun göstergesidir.

Çizelge 4.9. Lipozomların boyut verileri

	O-Lipozom	CH-Lipozom	GUA-CH-Lipozom
Boyut (nm)	485,50 ± 128,41	208,05 ± 73,04	266,60 ± 8,49

Lipozomların morfolojisi FE-SEM tekniği ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.5 lipozom formülasyonlarının FE-SEM görüntülerini göstermektedir.



Şekil 4.5. Lipozomların FE-SEM görüntüleri. A) Yüklenmemiş lipozom B) O-Lipozom C) CH-Lipozom D) GUA-CH-Lipozom

Lipozomların yüzey özelliği, homojenliği, dağılımı ve boyutu morfolojileri ile tanımlanır. Morfoloji, ilaç taşıyıcılarının uygulama alanları ve hedef bölgeleri olarak lipozomların çeşitli özelliklerinin geliştirilmesi ve modifikasyonu ile doğrudan ilişkilidir (Zhang vd., 2019). Lipozomların boyutu, lipozomların kullanım amacı, hedefleri ve çevresel davranışları gibi birçok açıdan önemli bir rol oynamaktadır. Lipozomların hazırlanmasında ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır ve bu yöntemin en büyük dezavantajlarından biri büyük boyutlu lipozomların oluşmasıdır (Maja vd., 2020).

Şekil 4.5 a' da gösterilen Kör lipozom neredeyse küresel bir şekle sahiptir ve gerçek boyutu 288,90 ± 78.91 nm olarak belirlenmiştir. Kör lipozom aglomere olmuş ve lipozomlar yüzeye gömülmüş gibi görünmektedir ve düzenli bir yapıya sahip değildir. Şekil 4.5 b'de gösterilen O-Lipozom küresel, düzenli bir yapıya sahiptir ve gerçek boyutu 485,5 ± 128,41 nm olarak belirlenmiştir. Şekil 4.5 c'de gösterilen CH-Lipozomu hafif küresel bir şekle sahiptir, aglomere olduğu ve homojen bir dağılıma sahip olmadığı için yapısı düzenli değildir ve gerçek boyutu 208,05 ± 73,04 nm olarak belirlenmiştir. O-Lipozomun CH ile kaplanması, düzensiz yapıda olmasına rağmen boyutta bir küçülme ile sonuçlanmıştır. Şekil 4.5 d'de gösterilen GUA-CH-Lipozom ise genel olarak düzenli bir yapıya ve küresel bir şekle sahiptir ve gerçek boyutu 266,60 ± 8,49 nm olarak belirlenmiştir. CH-Lipozomun GUA ile kaplanması yapıyı daha düzenli ve homojen hale getirmiştir.

Bunlara ek olarak, yukarıda bahsedilen boyut ölçümünde kullanılan DLS tekniği, boyut ölçümünü etkilemek için hidrodinamik çap ölçümünü ve sulu ortamı kullanır. FE-SEM ile belirlenen boyut ile DLS ile belirlenen boyut arasındaki farkın nedeni bu olsa da FE-SEM ile belirlenen boyut daha doğru sonuçlar vermektedir. Lipozom formülasyonları morfolojileri değerlendirilmeden önce liyofilize edilmiştir. Bununla birlikte liyofilizasyonun lipozomal formülasyonların şekillerinde bozulmalara neden olduğu da görülmektedir.

Çizelge 4.10. Lipozomların zeta potansiyel verileri

	O-Lipozom	CH-Lipozom	GUA-CH-Lipozom
Zeta potansiyeli (mV)	-48 ± 7	+40 ± 5	-6 ± 4

Zeta potansiyel değeri, lipozomların stabilitesinde ve hücre zarından adsorpsiyonunda önemli bir faktördür (Rasmussen vd., 2020). Lipozomların zeta potansiyeli -30 mV'den daha negatif ise anyonik, +30 mV'den daha pozitif ise katyonik ve -10 mV ile +10 mV arasında ise nötraldir (Wang vd., 2020).

O-Lipozomun zeta potansiyeli -48 ± 7 mV'dir ve anyonik lipozomdur. Negatif zeta potansiyeli, lipozomun duvar malzemesi olarak negatif yüklü L-α-Fosfatidilkolin kullanılması nedeniyle beklenildiği gibidir. CH-Lipozomun zeta potansiyeli +40 ± 5 mV'dir ve katyonik bir lipozomdur. Negatif yüklü lipozomun CH ile kaplanmasıyla zeta potansiyel değeri -48 ± 7 mV'den +40 ± 5 mV'ye kaymıştır. Bu zeta potansiyeli CH'nin pozitif yüklü doğasından kaynaklanmaktadır. GUA-CH-Lipozomun zeta potansiyeli -6 ± 4 mV'dir ve nötr bir lipozomdur. Pozitif yüklü CH-Lipozomun negatif yüklü GUA ile kaplanmasıyla zeta potansiyel değeri +40 ± 5 mV'den -6 ± 4 mV'ye değişmiştir. GUA'nın hidrofilik olmasına rağmen, amfifilik bir polisakkarit omurgaya sahip olması ile CH'nin yüksek pozitif zeta potansiyeli birleştiğinde nötral lipozomlar elde edilmiştir.

Negatif ve pozitif zeta potansiyeline sahip lipozomlar pH'a bağımlıdır ve çeşitli ortamlarda kullanımı kısıtlıdır, ancak nötr lipozomlar çevresel pH'ye bağlı olarak tam yük değişimi gösterir (Wang, 2021). Bu özellik nötr lipozomların çeşitli ortamlarda kullanımını arttırmaktadır. Örneğin yüklü nanopartiküllerin vücuttaki olumsuz farmakokinetiği göz önüne alındığında, klinik olarak onaylanmış nanopartikül-ilaç formülasyonlarının çoğu, dolaşım ömürlerini uzatmak ve vücuttaki hedef dokuların ilaca maruz kalmasını en üst düzeye çıkarmak için nötral yüzey yüküne sahiptir (Arias-Alpizar vd., 2020; Bobo vd., 2016).

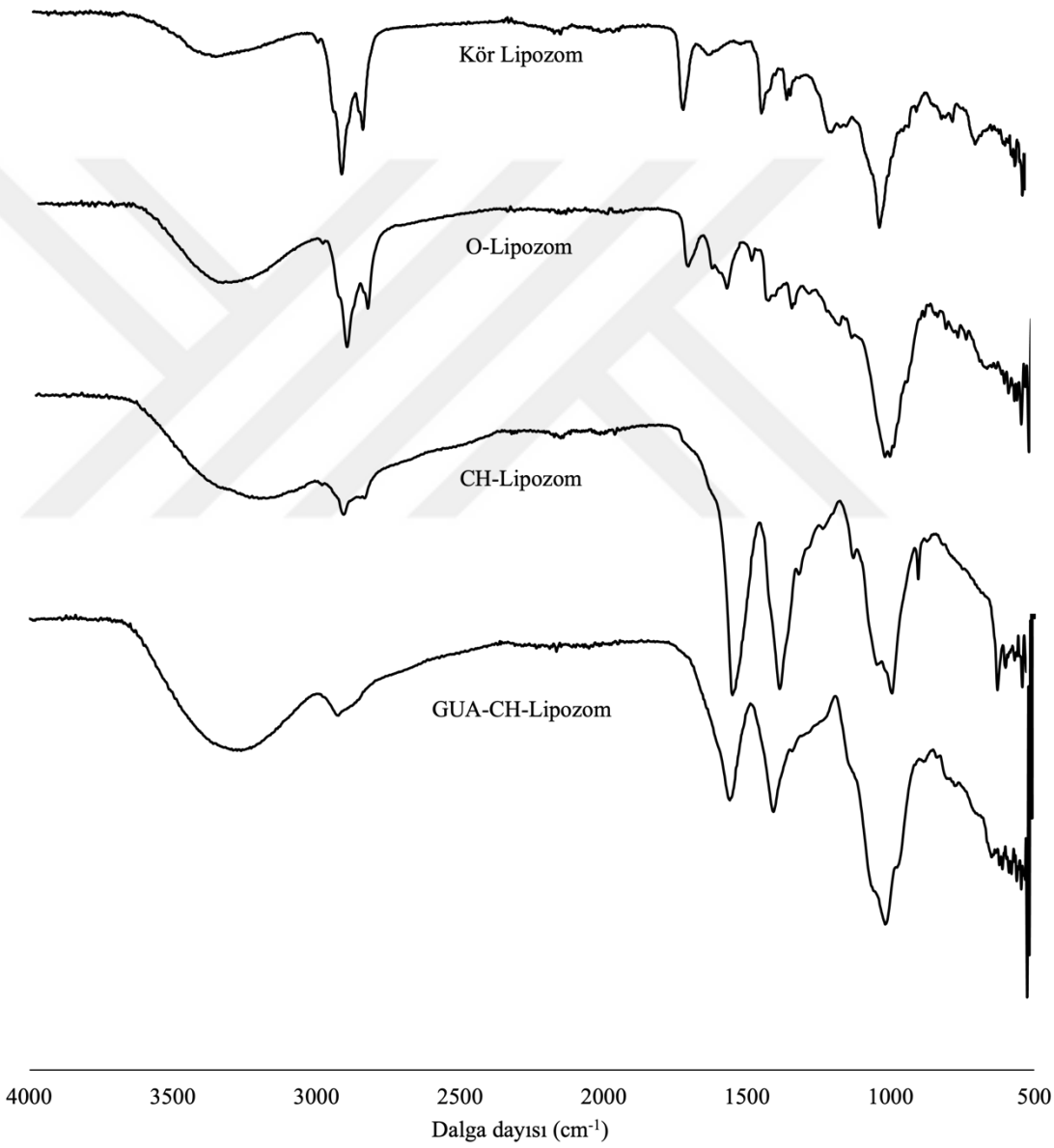
Çizelge 4.11. Lipozomların polidispersite indeksi verileri

	O-Lipozom	CH-Lipozom	GUA-CH-Lipozom
Polidispersite indeksi	0,373 ± 0,035	0,389 ± 0,115	0,749 ± 0,272

Polidispersite indeksi partiküllerin boyut dağılımını tanımlar (Danaei vd., 2018). Polidispersite indeksinin 0,05 ile 0,5 arasında olması veziküllerin monodispers ve homojen olduğunu, 0,5 ile 1 arasında olması ise veziküllerin polidispers ve heterojen olduğunu gösterir (Wen vd., 2014). O-Lipozomun polidispersite indeksi 0,373 ± 0,035 ve CH-Lipozomun 0,389 ± 0,115'tir, O-Lipozom ve CH-Lipozom monodispers olup tek boyutlu dağılım göstermektedir. GUA-CH-Lipozomun polidispersite indeksi ise 0,749 ± 0,272'dir, GUA-CH-Lipozom polidispersdir ve farklı boyutsal dağılıma sahiptir.

Lipozom formülasyonlarının kimyasal yapıları FTIR ile karakterize edilmiştir. FTIR analizi sonucunda elde edilen spektrum Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Kör Lipozom 3363,94 cm^{-1}'de O-H gerilme bandı göstermektedir. O-Lipozom 3357,36 cm^{-1}'de geniş bir O-H gerilme bandı göstermektedir (Perez-Ruiz vd., 2018). GA'nın kör lipozomlara yüklenmesiyle oluşan hidrojen bağları yoğunluğu arttırırken, 3363,94 cm^{-1}'deki düşük yoğunluklu O-H bandını 3357,36 cm^{-1}'e kaydırmıştır. GA'nın boş lipozoma yüklenmesi yapıyı bozmadan küçük değişikliklere neden olmuştur. CH-Lipozom, 3223,63 cm^{-1}'de N-H gerilme bandını maskeleyen geniş bir O-H gerilme bandı, 2927,28 cm^{-1}'de CH'nin karakteristik C-H gerilme bandı, 1571,10 cm^{-1}'de C-O ve C-N gerilme bantları, 1406,89 cm^{-1}'de O-H ve C-H titreşimleri ve 1014,95 cm^{-1}'de C-O gerilme bandı gösterir (Tavares ve Noreña, 2020). GUA-CH-Lipozom, 3262,53 cm^{-1}'deki N-H gerilme bandını maskeleyen güçlü bir O-H gerilme bandı, 2923,24 cm^{-1}'deki C-H gerilme bandı ve GUA'nın karakteristik bandı olan 1014,95 cm^{-1}'deki C-O gerilme bandını göstermektedir. CH'nin 1571,10 cm^{-1} ve 1406,89 cm^{-1}'deki karakteristik yüksek yoğunluklu C-N germe bantları 1560,19 cm^{-1} ve 1408,10 cm^{-1}'e kaymış ve yoğunlukları büyük ölçüde azalmıştır. CH'nin 1571,10 cm^{-1} ve 1406,89 cm^{-1}'deki karakteristik yüksek yoğunluklu C-N gerilme bantları 1560,19 cm^{-1} ve 1408,10 cm^{-1}'e kaymış ve yoğunlukları büyük ölçüde azalmıştır. Bu durum, GUA'nın $-COO^-$ grubu ile CH'nin $-NH_2$ grubu

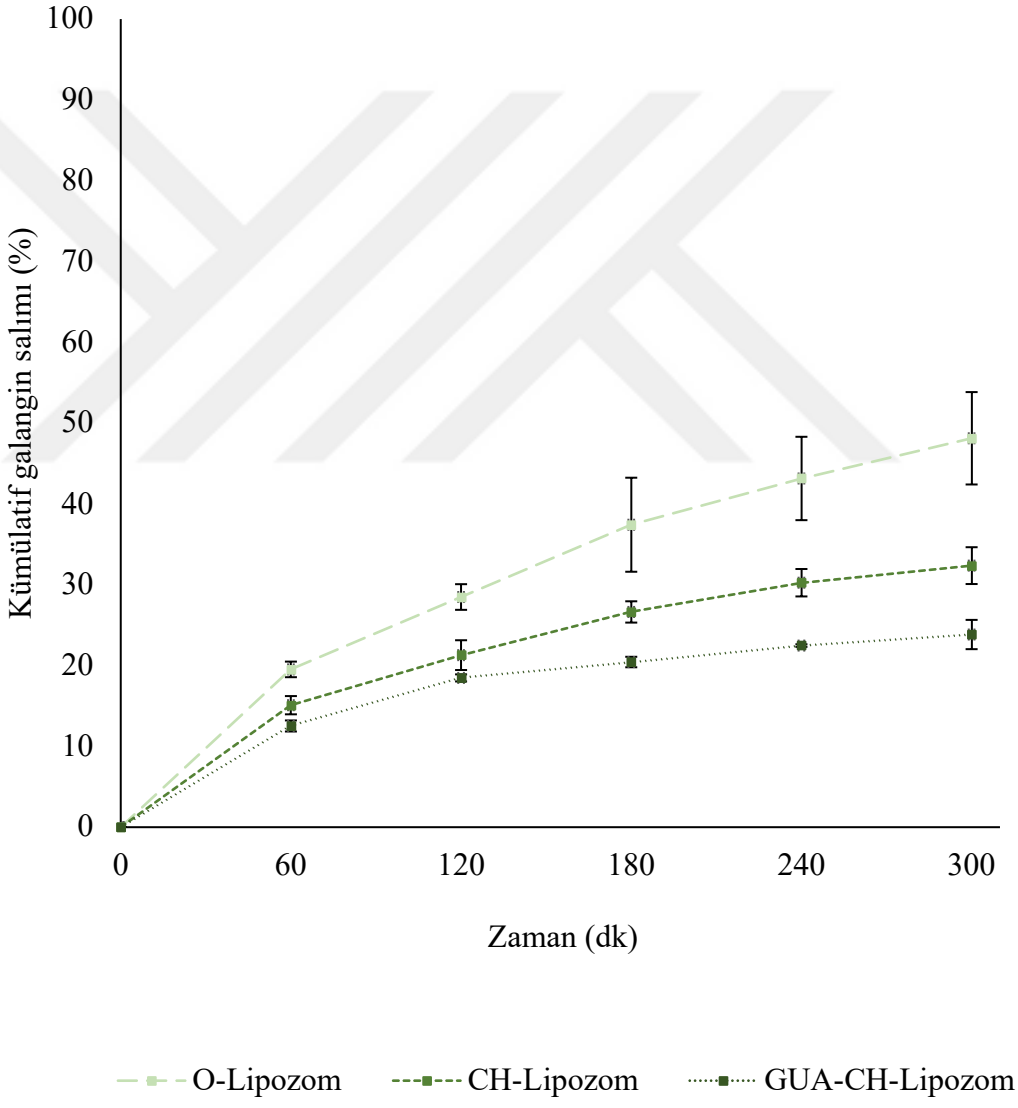
arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklanmaktadır (Hernández-Fernández vd., 2020). Elektrostatik etkileşim katman katman biriktirme metodunda en çok kullanılan itici kuvvetlerden biridir. Buna göre polikatyon CH ve polianyon GUA arasındaki elektrostatik etkileşimin başarıyla gerçekleştirildiği FTIR spektrumuna göre kanıtlanmıştır.



Şekil 4.6. Lipozomların FTIR spektrumu

4.5. *In vitro* İlaç Salım Çalışması

Lipozom formülasyonlarının ilaç salım profili Şekil 4.7'de verilmiştir. Buna göre 5 sa sonunda, O-Lipozomun GA salımı %48,13 ± 5,72, CH-Lipozomun %32,37 ± 2,28 ve GUA-CH-Lipozomun %23,84 ± 1,82 olarak bulunmuştur. O-Lipozomun kitosan ve ardından gam arabik ile kaplama işlemi GA salımını sırasıyla yaklaşık %33 ve %51'den fazla azaltmıştır.



Şekil 4.7. Lipozomların ilaç salım grafiği

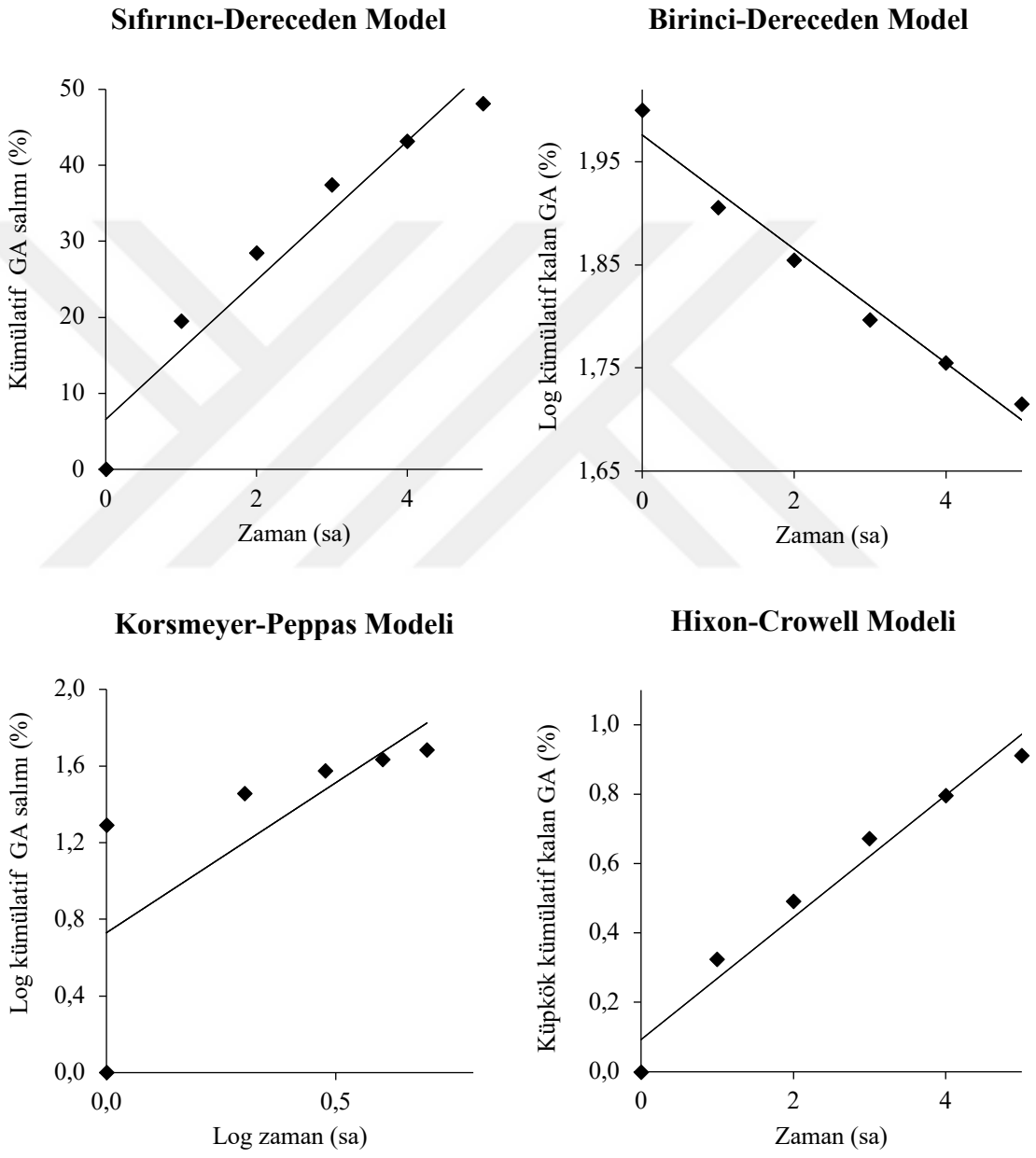
Jeon vd. (2015), kuersetin yüklü kitosan-sodyum hyalüronat (HA-CH) ile kaplanmış çok katmanlı lipozomlar geliştirmişlerdir. Kaplanmamış lipozom, CH-Lipozom, HA-CH-Lipozom, 3 katmanlı HA-CH-Lipozom ve 5 katmanlı HA-CH-Lipozom'un *in vitro* ilaç salım profillerini incelemişlerdir. Buna göre kaplanmamış lipozom, diğer formülasyonlara kıyasla 24 saat içinde pH 7,4'te %50 olmak üzere nispeten hızlı kuersetin salınımı sergilemiştir. CH-Lipozom'dan 24 saat sonra salınan kuersetin miktarı, HA-CH-Lipozom'dan salınan kuersetin miktarına benzerdir ve yaklaşık %40'tır. 3 katmanlı HA-CH-Lipozom ve 5 katmanlı HA-CH-Lipozom'dan salınan kuersetin miktarı ise %20'nin altındadır. Buna göre geliştirilen formülasyonlarda, lipozomal yüzeyde biriken çift tabaka sayısındaki artış ile kuersetinin hızlı salımını engellenerek kontrollü salım sağlanmıştır. Bu sonuçlara göre, elektrostatik etkileşimler kullanılarak lipozom yüzeyinin polimerle modifiye edilmesinin, bir ilacın sürekli salımının kontrolüne katkıda bulunabileceği ve farklı dış pH koşullarında kapsüllenmiş ilaçların sızmasına karşı koruma sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Lipozomların ilaç salım hızı, lipit çift tabakanın akışkanlığına, dolayısıyla membran geçirgenliğine bağlı olarak değişir (Li vd., 2009). Ayrıca polimerler fosfolipdlerden daha kararlıdır ve çeşitli blok yapılarının lipit ikincil katmanına interkalasyon sağlamaları, lipitlerin oksidatif bozulmaya yatkınlığını azaltmaları nedeniyle kullanılmaları avantajlıdır. Bununla birlikte, yüklü polimerlerle kaplanmış lipozomlar elektrostatik olarak iticidir ve kolloidal sistemlerde stabildir ayrıca kaplama aktif bileşiklerin salım hızını kontrol eden bir bariyer görevi görür (Pasarin vd., 2023).

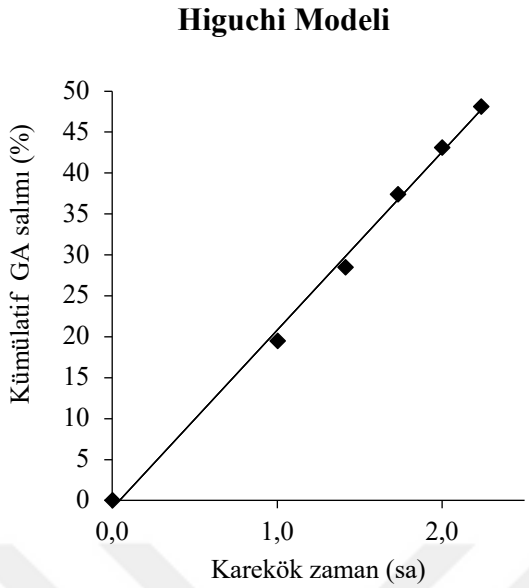
Lipozom yüzeyinin polielektrolit biyopolimer ile kaplanması yüzeyde gittikçe daha yoğun-kalın bir tabaka oluşturarak lipozomun akışkanlığını ve dolayısıyla lipit membranın geçirgenliğini azaltmış ve böylece ilaç salım hızını yavaşlatmıştır. Bu sonuçlar GA'nın lipozomlara enkapsülasyonunun ve LbL kaplamasının simüle edilmiş fizyolojik bir ortamda salımını azalttığını ve salımı kontrol ettiğini göstermektedir. GA gibi biyoaktif bileşenlerin salım profilinin iyileştirilmesi, biyoyararlanımlarının arttırılmasında önemli bir faktördür.

4.6. İlaç Salım Kinetiği

O-Lipozomun, CH-Lipozomun ve GUA-CH-Lipozomun ilaç salım kinetiği çalışmalarına göre elde edilen kinetik model grafikleri ve modellere göre elde edilen regresyon katsayıları şekil 4.8, şekil 4.9, ve şekil 4.10'de verilmiştir.



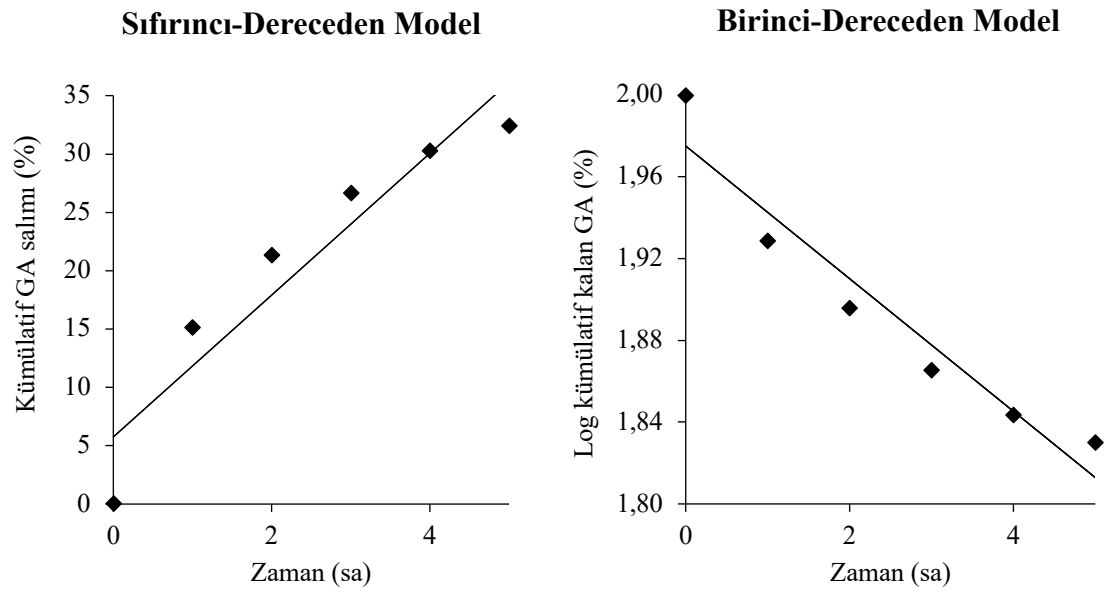
Şekil 4.8. O-Lipozom kinetik model grafikleri



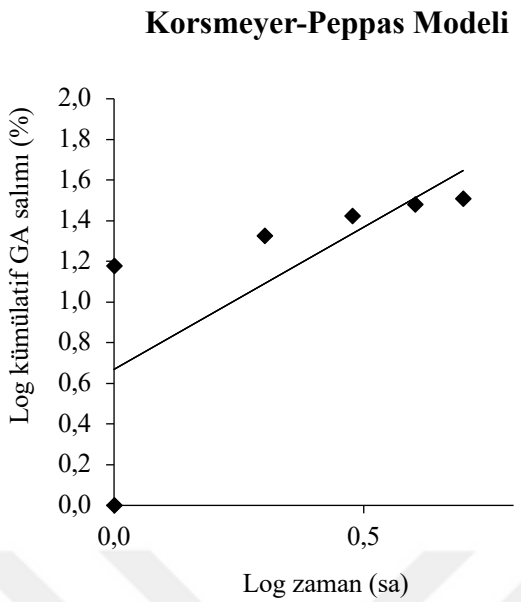
Model	R^2
Sıfırıncı derece	0,9362
Birinci derece	0,9754
Korsmeyer-Peppas	0,5387
Hixon-Crowell	0,9642
Higuchi	0,9966

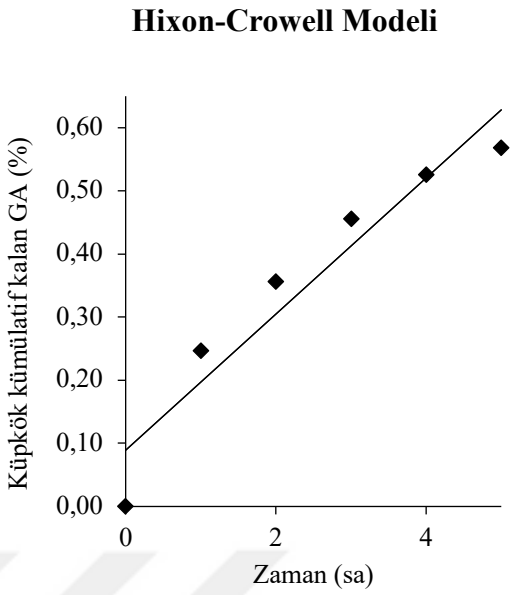
Şekil 4.8. O-Lipozom kinetik model grafikleri (Devam)

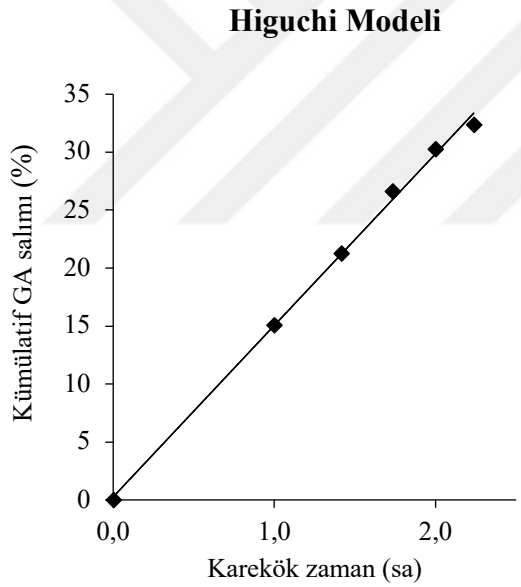
O-Lipozom'un ilaç salım modeli Higuchi Modeli'dir. Higuchi salım sabiti, *k*'nın değeri 21,788'dir.



Şekil 4.9. CH-Lipozom kinetik model grafikleri



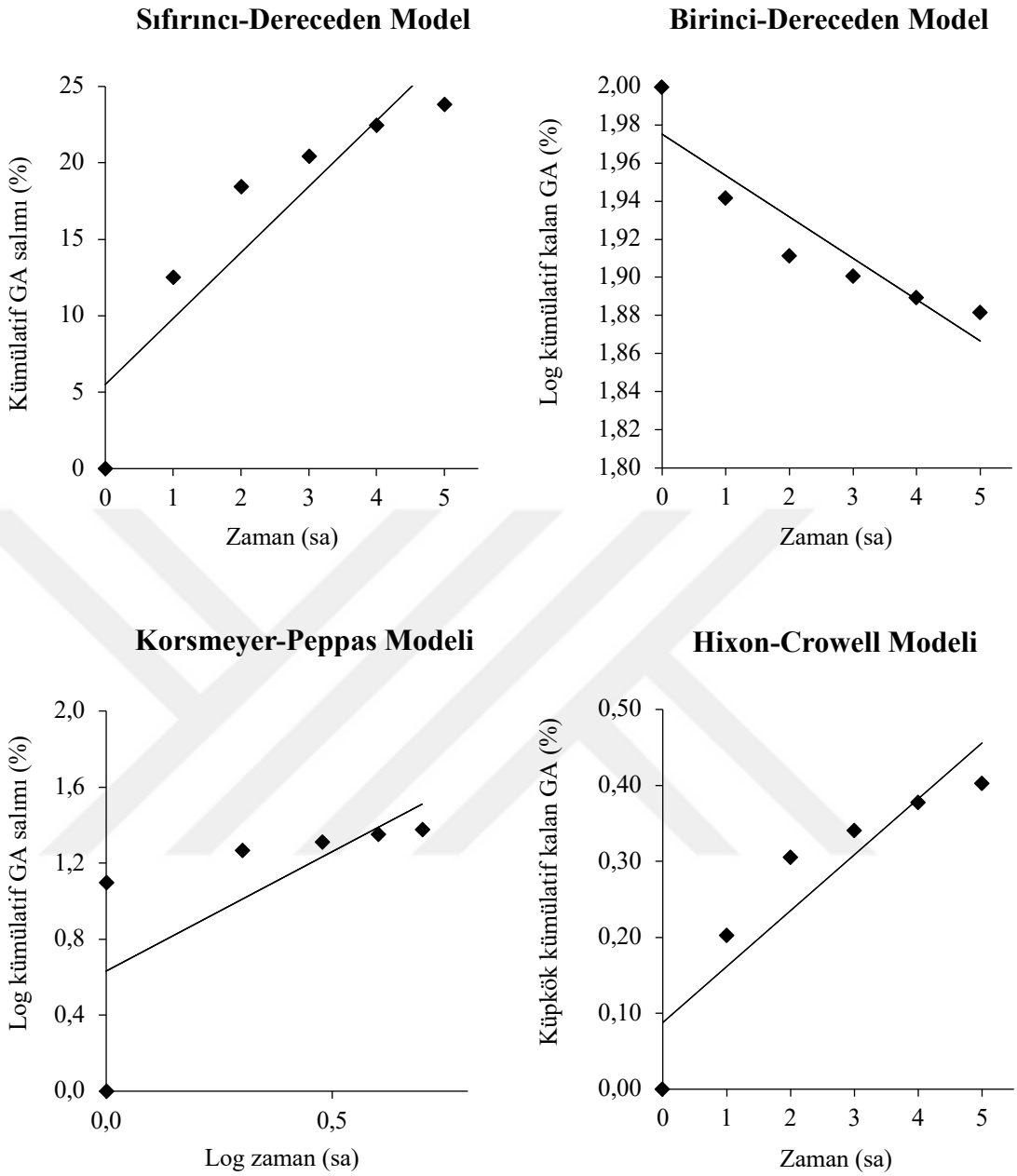




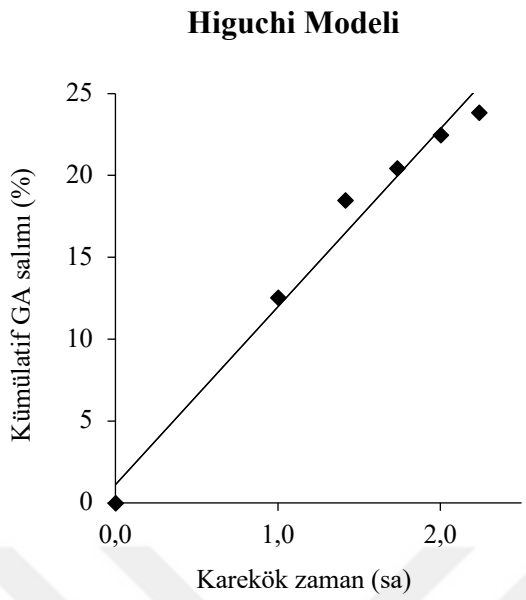
Model	R^2
Sıfırıncı derece	0,8941
Birinci derece	0,9265
Korsmeyer-Peppas	0,5259
Hixon-Crowell	0,9610
Higuchi	0,9976

Şekil 4.9. CH-Lipozom kinetik model grafikleri (Devam)

O-Lipozom'un ilaç salım modeli Higuchi Modeli'dir. Higuchi salım sabiti, *k*'nın değeri 14,803'tür.



Şekil 4.10. GUA-CH-Lipozom kinetik model grafikleri



Model	R^2
Sıfırıncı derece	0,8211
Birinci derece	0,8472
Korsmeyer-Peppas	0,5004
Hixon-Crowell	0,8383
Higuchi	0,9789

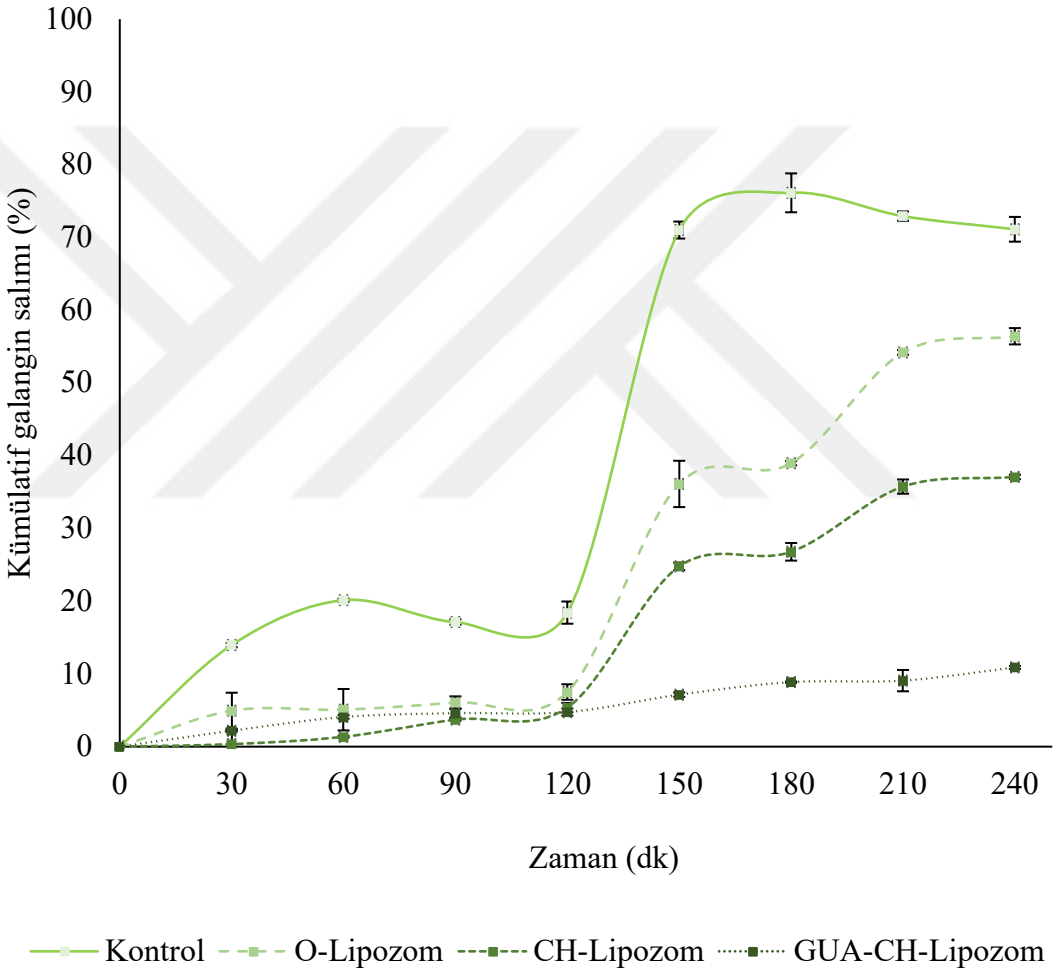
Şekil 4.10. GUA-CH-Lipozom kinetik model grafikleri (Devam)

Buna göre GUA-CH-Lipozomun salım modeli en yüksek regresyon katsayısına sahip olan Higuchi modelidir. Higuchi salım sabiti, *k*'nın değeri 10,866'dır.

Elde edilen sonuçlara göre O-Lipozom, CH-Lipozom ve GUA-CH-Lipozomun salım profili Higuchi modeli ile uyumludur. Salınan galangin miktarı ile zaman arasında doğrusal bir ilişki olduğu bulunmuştur. Higuchi modeline göre ilaç salımı difüzyon yoluyla gerçekleşmektedir (Gibis vd., 2016). Higuchi salım sabitleri incelendiğinde O-Lipozom için *k* 21,788, CH-Lipozom için *k* 14,803 ve GUA-CH-Lipozom için *k* 10,86'dır. Buna göre *k* sabiti O-Lipozomun CH ile kaplanması sonucunda yaklaşık 1,5 kat, CH-Lipozomun GUA ile kaplanması sonucunda ise 2 kat azalmışmıştır. Lipozom yüzeyine eklenen her bir katman Higuchi salım sabitinin değerini düşürmüştür, bu da difüzyon hızının azaldığına işaret etmektedir. Bu sonuç lipozomların CH ve GUA ile modifiye edilmesinin galangin difüzyon hızını yavaşlatarak salımın kontrol edilmesinde başarılı olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Othman vd., (2022)'nin geliştirdiği kurkumin yüklü polimer kaplı lipozomların salım davranışı ile benzerdir. Buna göre polimer kaplı lipozomlarının salım modeli Higuchi modelidir ve lipozomun yüzeyine eklenen her bir katman ile salım sabiti *k* 2 kat azalmıştır. Difüzyon hızındaki bu azalış yüzeye eklenen katmanların varlığına bağlanmıştır.

4.7. *In vitro* Gastrointestinal Sindirim Çalışması

Lipozomların gastrointestinal sistemdeki galangin salım davranışının ve stabilitesinin belirlenmesi için *in vitro* simüle gastrointestinal sindirim çalışması gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak *A. officinarum* ekstraktı kullanılmıştır. Lipozomların ve *A. officinarum* ekstraktının *in vitro* gastrointestinal sindirim sürecince kümülatif galangin salım yüzdesi Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Kümülatif galangin salım grafiği

Grafiğe göre mide sindirimi sonunda *A. officinarum* ekstraktı, O-Lipozom, CH-Lipozom ve GUA-CH-Lipozomun kümülatif galangin salım oranları sırasıyla %18,42 ± 1,53, %7,51 ± 1,06, %5,36 ± 0,63 ve %4,75 ± 0,01'dir. Bağırsak sindirimi sonunda ise galangin salım oranları havlıcan ekstraktı için %71,12 ± 1,70, O-Lipozom için %56,41 ± 1,12, CH-Lipozom için %37,07 ± 0,30 ve GUA-CH-Lipozom için %10,88 ± 0,20'dir. Bu sonuçlara göre O-Lipozom galangin salımını yaklaşık %21, CH-Lipozom yaklaşık %48 ve GUA-CH-Lipozom yaklaşık %85 azaltmıştır. Bu da geliştirilen GUA-CH-Lipozomun gastrointestinal sistemde galangini etkili bir şekilde koruduğunu göstermektedir. Polimerler, ilaçların gastrointestinal bariyerler boyunca yapışmasını ve penetrasyonunu arttırabilen gelişmiş mukoadezif özellikleri nedeniyle lipozom kaplamaları olarak tercih edilmektedir. Yüklü polimerlerle kaplanmış lipozomlar elektrostatik olarak iticidir ve kolloidal sistemlerde stabildir; kaplama aynı zamanda aktif bileşiklerin salım hızını kontrol eden bir bariyer görevi görür (Pasarin vd., 2023). Literatürde pek çok çalışma LbL yöntemi ile modifiye edilmiş lipozomların aktif bileşenleri gastrointestinal sindirim koşullarından başarıyla koruduğunu bildirmiştir.

Gomaa vd. (2017) çalışmalarında antimikrobiyal peptit (MccJ25) yüklü, pektin-süt protein izolatı (WPI), WPI-pektin, pektin ve WPI kaplı lipozomlar geliştirerek bunların gastrointestinal sistemdeki davranışlarını incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre tüm lipozomal formülasyonlar gastrointestinal sindirime direnç göstermiştir. Kaplanmamış lipozomlar gastrointestinal sistemde MccJ25'i korumuşlardır çünkü lipozomlardan salınan MccJ25 miktarı serbest MccJ25 miktarından oldukça düşük bulunmuştur. Anyonik lipozomlar, katyonik lipozomlara kıyasla daha az MccJ25 salımı göstermiştir. Tek katmanlı kaplanmış lipozomlar, kaplanmamış formülasyonlara kıyasla MccJ25'e geçici koruma sağlamıştır. WPI-pektin kaplı lipozomlar, *in vitro* sindirim sırasında MccJ25'e en iyi korumayı sunmuş ve sindirimin sonuna kadar MccJ25 salımı diğer formülasyonlardan önemli ölçüde daha düşük olmuştur. Pektin-WPI kaplı lipozomlar 2 saatlik sindirimden sonra tek kaplamalı lipozomlardan veya kaplamasız lipozomlardan önemli ölçüde daha düşük MccJ25 salımı göstermiştir. Dolayısıyla, çift kaplamanın MccJ25'e gastrointestinal sistem boyunca koruma sağladığı sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde Xian vd. (2021), çalışmalarında selastrol (Cel) yüklü lipozomlar (Cel/Lipo) ve pektin-trimetil kitosan kaplı lipozomlar (Cel/PT-LbL)

geliştirmişlerdir. Serbest Cel, Cel/Lipo ve Cel/PT-LbL karşılaştırıldığında hem Cel/Lipo hem de Cel/PT-LbL Lipo sürekli ilaç salım profilleri sergilemiştir. SGF'deki ilk 2 saat boyunca serbest Cel, Cel/Lipo ve Cel/PT-LbL Lipo'dan sırasıyla %5,01, %2,50 ve %2,14 oranında Cel salınmıştır. Benzer şekilde, SIF'de Cel/Lipo ve Cel/PT-LbL Lipo'dan az miktarda Cel salınmıştır; bu da polimer kaplamanın mide ya da ince bağırsaklarda ilaç salınım patlamasını etkili bir şekilde ortadan kaldırdığını göstermektedir. Bununla birlikte, polielektrolitlerin çift kaplaması nedeniyle, Cel/PT-LbL Lipo tüm deney süresi boyunca Cel/Lipo'dan daha yavaş ilaç salım profilleri sergilemiştir.

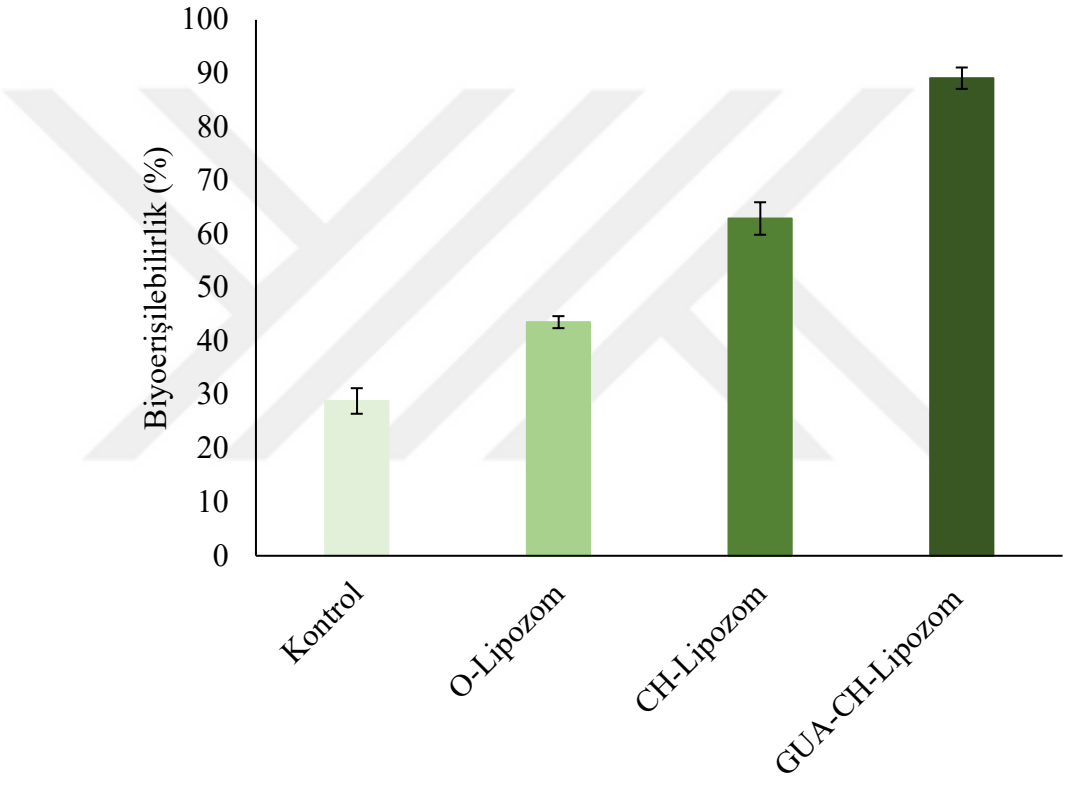
Cui vd. (2021), çalışmalarında kito-oligosakkaritleri ince film hidrasyonu yoluyla kaplanmamış lipozomlara, kitosan kaplı lipozomlara ve sodyum aljinat-kitosan kaplı lipozomlara enkapsüle etmişlerdir. Hazırlanan lipozomların *in vitro* simüle gastrointestinal sistemde kito-oligosakkarit salım hızı incelendiğinde gastrik sindirimde kito-oligosakkaritlerin salımı hızlıdan yavaşa doğru eğilim göstermiştir. 75 dakikalık gastrik sindirimden sonra, kaplanmamış lipozom %50,14, kitosan kaplı lipozom %14,92 ve sodyum aljinat-kitosan kaplı lipozom %8,22 kito-oligosakkarit salımı gerçekleştirmiştir. 175 dakikalık gastrik sindirim sonunda kaplanmamış lipozom %55,02, kitosan kaplı lipozom %31,21 ve sodyum aljinat-kitosan kaplı lipozom %21,13 kito-oligosakkarit salımı gerçekleştirmiştir. *In vitro* simüle bağırsak sindiriminde ise sindirim süresi 300 dakika olduğunda, salım oranı %82,81 ± %1,73'e ulaşmıştır. Sindirim süresi 150 dakikaya ulaştığında, kitosan kaplı lipozom ve sodyum aljinat-kitosan kaplı lipozom sırasıyla %25,44 ± 1,14 ve %17,18 ± 0,63 kito-oligosakkarit salım oranlarına ulaşmıştır. Daha sonra, bu iki lipozom arasında kito-oligosakkarit salım oranında önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuçlara göre lipozomların bağırsak sıvısındaki salım oranı mide sıvısındakinden önemli ölçüde daha yüksektir. Bunun nedeni, bağırsak sıvısındaki tripsinin fosfolipitlerin dış tabakası üzerindeki hidrolitik etkisinin lipozomların hidrolitik olarak parçalanmasına ve büyük miktarda aktif madde salınmasına yol açması olabilir. Bununla birlikte, lipozomların yüzeyindeki kitosan ve sodyum aljinat, bağırsak sıvısındaki tripsinin lipozomların dış katmanındaki fosfolipitlerle temas etmesini önleyebilir, böylece lipozomların bütünlüğünü korur. Böylelikle yüzey modifikasyonu ile gastrointestinal sisteme karşı direnç gösterilerek lipozomların stabilitesi sağlanır.

Song vd. (2023), keten tohumu yağını lipozomlara enkapsüle etmişler ve daha sonra lipozom yüzeyini kitosan ve bezelya proteini izolatı hidrolizatı ile LbL yöntemi ile modifiye etmişlerdir. Lipozomun ve modifiye lipozomun gastrointestinal sindirim davraşını ve keten tohumu yağı salım oranını incelemişlerdir. *In vitro* simüle mide sindirimi sonunda lipozomdan salınan keten tohumu yağı oranı %11,8 iken modifiye lipozomda %8,8'dir. *In vitro* simüle bağırsak sindirimi sonunda ise bu oran lipozom için %45,2 iken modifiye lipozom için %27,1'dir. Bu sonuçlara göre mide sindirimi sırasında lipozomların düşük asidik pH'dan modifiye lipozomlardan daha fazla etkilendiği, modifiye lipozomların yüzeyindeki polimer katmanının lipozomları koruyarak keten tohumu yağının salınmasının yavaşlatıldığını bildirmişlerdir. Bağırsak sindiriminde ise pankreatinin fosfolipitlerin hidrolizini ve safra tuzlarının lipozom membranının parçalanmasını hızlandırması nedeniyle yüksek salım oranlarına ulaşıldığını ancak modifiye lipozomların yüzeyindeki polimer katmanının sertliği nedeniyle enzimlerin ve tuzların geçirgenliği azaltılarak daha düşük oranda salım meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Lipozomların mide sıvısında kararlı olması bağırsak sindirimi için daha fazla aktif madde taşınması açısından çok önemlidir çünkü bağırsak sıvısının bileşimdeki pankreatik enzimler ve tuzlar nedeniyle lipozomal yapının hasar görerek aktif maddenin yüksek oranda salınması yaygın bir fenomendir. Lipozomların bağırsaktan emilerek vücut dolaşımına girmeleri ve hedeflenen bölgeye aktif maddeleri maksimum seviyede taşıyarak biyoerişilebilirlik seviyesini maksimuma çıkarılması için gastrointestinal sisteme direnç göstermeleri gerekmektedir. Bu nedenle polielektrolit lipozomlarla yüzey modifikasyonu başarıyla uygulanan tekniklerdendir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre GUA-CH-Lipozoma yüklenen galanginin %89,12'si, CH-Lipozoma yüklenen galanginin %62,93'ü ve O-Lipozoma yüklenen galanginin %43,59'u bağırsaktan emilerek dolaşıma karışacaktır. Bu sonuçlar LbL tekniğinin lipozomlara başarıyla uygulandığını ve elde edilen lipozom GUA-CH-Lipozomun gastrointestinal sindirim koşullarına karşı direnç göstererek galangini koruduğunu göstermektedir.

4.8. Biyoerişilebilirlik Çalışması

Simüle *in vitro* gastrointestinal sindirim çalışması ile kontrol olarak havlıcan ekstraktı kullanılarak geliştirilen lipozomların galanginin biyoerişilebilirliği üzerine etkisi incelenmiştir. Lipozomların ve havlıcan ekstraktının galangin içeriği *in vitro* gastrointestinal sindirim öncesi ve sonrası ölçülerek gastrointestinal sistemde galanginin biyoerişilebilirliği hesaplanmıştır. Şekil 4.12'de havlıcan ekstraktında (kontrol) ve lipozomlarda bulunan galanginin biyoerişilebilirlik yüzdesi verilmiştir.



Şekil 4.12. Kontrol ve lipozomlarda galanginin biyoerişilebilirlik yüzdesi

Şekil 4.12'ye göre *A. officinarum* ekstraktında galanginin biyoerişilebilirliği %28,88 ± 2,39, O-Lipozomda 43,59 ± 1,12, CH-Lipozomda 62,93 ± 3,03 ve GUA-CH-Lipozomda 89,11 ± 2,00'dır. Buna göre galanginin lipozomlara enkapsüle edilmesi biyoerişilebilirliğini yaklaşık 1,5 kat arttırırken, lipozomların yüzeyinin kitosan ile kaplanması yaklaşık 2 kat ve kitosanla kaplı lipozomun yüzeyinin gam arabik ile kaplanmasıyla 3 kattan fazla arttırmıştır.

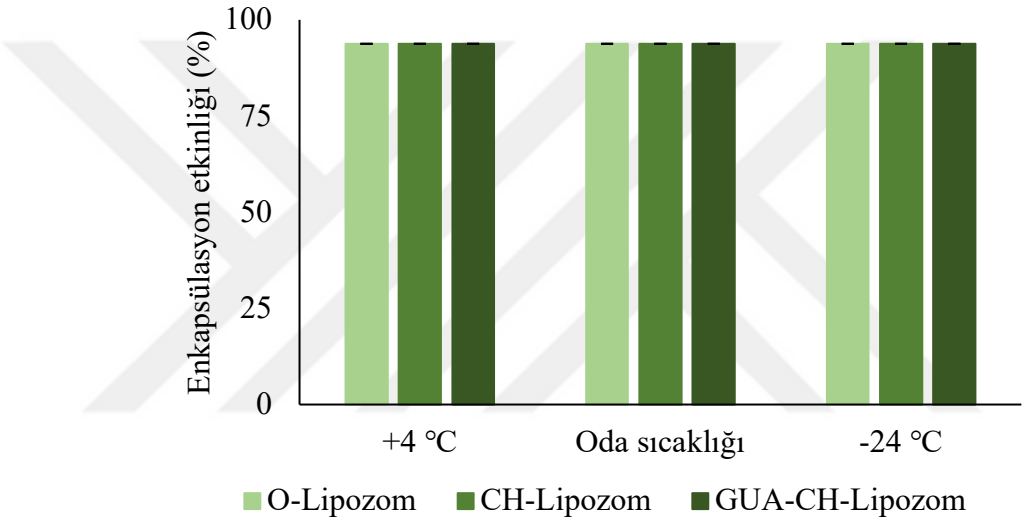
Gómez-Mascaraque vd. (2017) çalışmalarında kurkumin yüklü lipozomları çeşitli konsantrasyonlardaki süt proteini konsentratı (WPC) ile kaplamışlardır. Gastrointestinal sindirim çalışması sonunda serbest kurkuminin biyoerişilebilirliği %3,2 ± 0,5, WPC (%0,1) kaplı lipozomda %5,4 ± 0,5, WPC (%0,2) kaplı lipozomda %5,3 ± 0,5 ve WPC (%0,4) kaplı lipozomda %4,8 ± 0,3'tür. Elde edilen sonuçlara göre, saf kurkuminin biyoerişilebilirliğinin beklendiği gibi çok düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, WPC kaplı lipozomlar kurkumin içeriğinden bağımsız olarak biyoerişilebilirliğini önemli ölçüde arttırdığını (1,7 kat) belirtmişlerdir.

Chen vd. (2020), çözünürlüğü çok düşük olan 7,8-dihidroksiflavonu lipozomlara yükleyerek lipozom yüzeyini laktoferrin, çapraz bağlı galaktolize laktoferrin ile modifiye etmişlerdir. Gastrointestinal sindirim çalışması sonucunda serbest 7,8-dihidroksiflavonun biyoerişilebilirliği %20 civarında bulunmuştur. Lipozomlardaki 7,8-dihidroksiflavonun biyoerişilebilirliği %51,85 iken, laktoferrin modifiye lipozomlarda %69, çapraz bağlı galaktolize laktoferrin ile modifiye lipozomlarda ise %81,05 bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre galaktolize laktoferrin ve lipozomal membran arasındaki güçlü elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı, lipozomal membranın simüle edilmiş gastrointestinal sıvılardaki lipolitik enzimler tarafından parçalanmasını etkili bir şekilde önlediği ve 7,8-dihidroksiflavonun biyoerişilebilirliğinin dört kat arttırıldığı bildirilmiştir.

Rubaka vd. (2023), *Carissa spinarum* ekstraktı yüklü lipozomların ve kitosan kaplı lipozomlardaki *Carissa spinarum*'un biyoerişilebilirliğini incelemişlerdir. Serbest *Carissa spinarum*'un gastrik fazdaki biyoerişilebilirliği %39,65 ± 2,4 iken lipozomlarda %51,08 ± 3,2 ve kitosan kaplı lipozomlarda %74,11 ± 1,3'dir. İntestinal fazda ise *Carissa spinarum*'un biyoerişilebilirliği %31,4 ± 2,8'den lipozomlarda %63,32 ± 5,3'e ve kitosan kaplı lipozomlarda %43,71 ± 3,3'e yükselmiştir. *Carissa spinarum*'un biyoerişilebilirliğindeki artış, gastrointestinal ortamda sindirim enzimlerinin varlığında oksidatif bozulmadan korunmalarına bağlanmıştır.

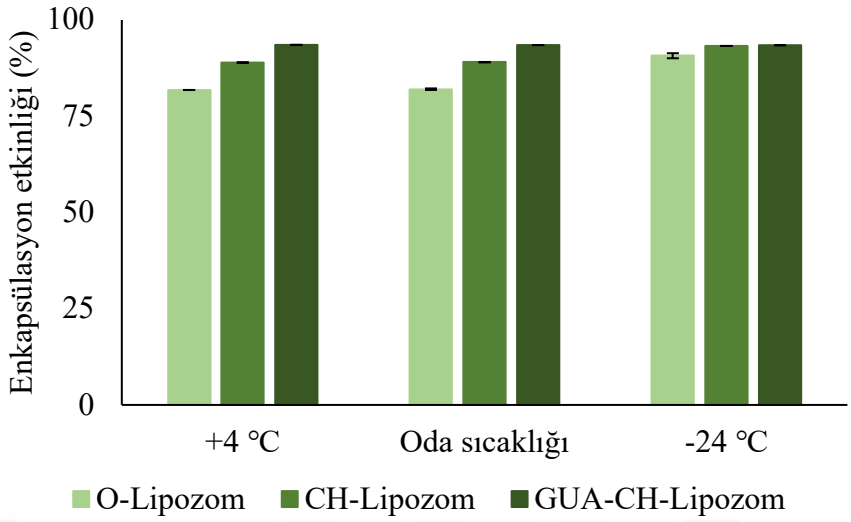
4.9. Stabilite Çalışması

Lipozom formülasyonlarının stabiliteleri üç farklı sıcaklık koşulunda (+4°C, oda sıcaklığı ve -24°C) 28 gün süreyle incelenmiştir. Stabilite çalışmasının yanıtı olarak enkapsülasyon etkinliği kabul edilmiştir. Şekil 4.13'te 0. gün stabilitesi olarak lipozomların enkapsülasyon etkinliği (%) verilmiştir ve bu değer başlangıç değeri olarak kabul edilmiştir. Lipozom formülasyonlarının başlangıç (0. gün) enkapsülasyon etkinliği her üç koşul için de %93,77 ± 0,05 olarak belirlenmiştir.



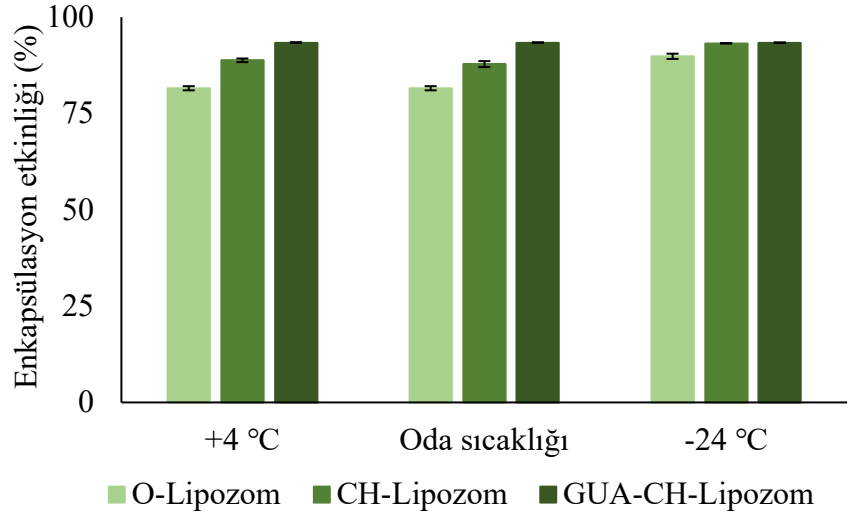
Şekil 4.13. Stabilite çalışması 0. gün

Şekil 4.14'te lipozomların 1. gün stabilite sonuçları verilmiştir. Buna göre O-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %81,80 ± 0,01, oda sıcaklığında %82,01 ± 0,20 ve -24°C'de %90,70 ± 0,66'dır. CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %88,92 ± 0,01, oda sıcaklığında %89,01 ± 0,05 ve -24°C'de %93,24 ± 0,01'dir. GUA-CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %93,52 ± 0,01, oda sıcaklığında %93,47 ± 0,01 ve -24°C'de %93,43 ± 0,01'dir. 1. günde enkapsülasyon etkinliğindeki en büyük değişim +4°C'de O-Lipozomda görülmüştür ve enkapsülasyon etkinliği yaklaşık %13 azalmıştır.



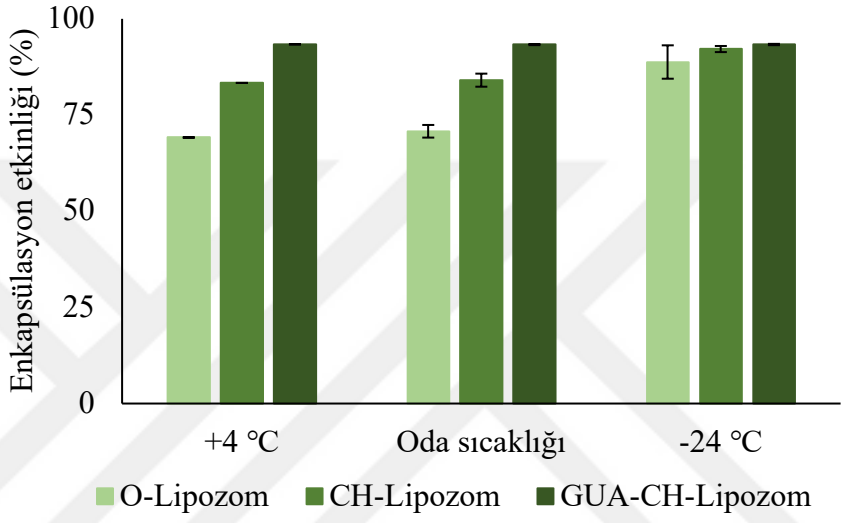
Şekil 4.14. Stabilite çalışması 1. gün

Şekil 4.15'te lipozomların 7 günlük stabilite sonuçları verilmiştir. Buna göre O-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %81,55 ± 0,54, oda sıcaklığında %81,53 ± 0, 15 ve -24°C'de %89,84 ± 0,68'dır. CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de 88,80 ± 0,47, oda sıcaklığında %87,82 ± 0,77 ve -24°C'de %93,21 ± 0,01'dir. GUA-CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %93,40 ± 0,01, oda sıcaklığında %93,40 ± 0,01 ve -24°C'de %93,38 ± 0,01'dir.



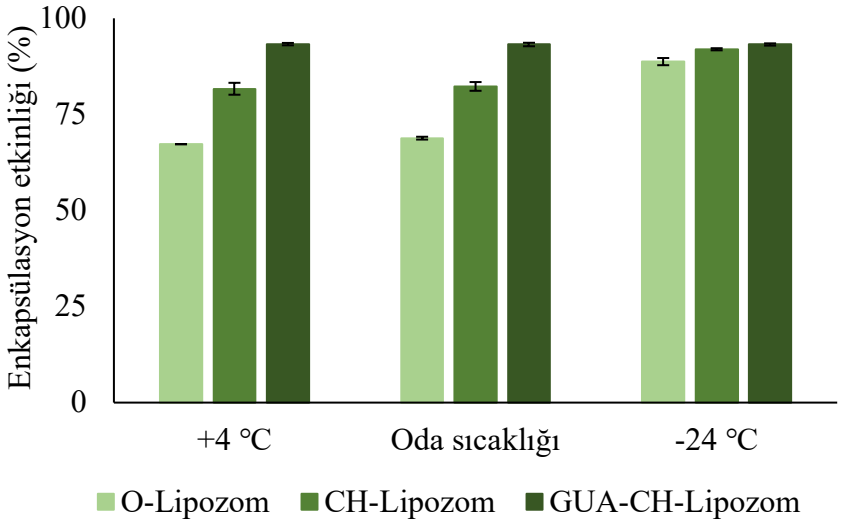
Şekil 4.15. Stabilite çalışması 7. gün

Şekil 4.16'de lipozomların 14 günlük stabilite sonuçları verilmiştir. Buna göre O-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %69,16 ± 0,1, oda sıcaklığında %70,77 ± 1,64 ve -24°C'de %88,77 ± 4,34'tür. CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %83,34 ± 0,01, oda sıcaklığında %84,06 ± 1,70 ve -24°C'de %92,15 ± 0,79'dur. GUA-CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %93,37 ± 0,01, oda sıcaklığında %93,31 ± 0,15 ve -24°C'de %93,32 ± 0,17'dir.



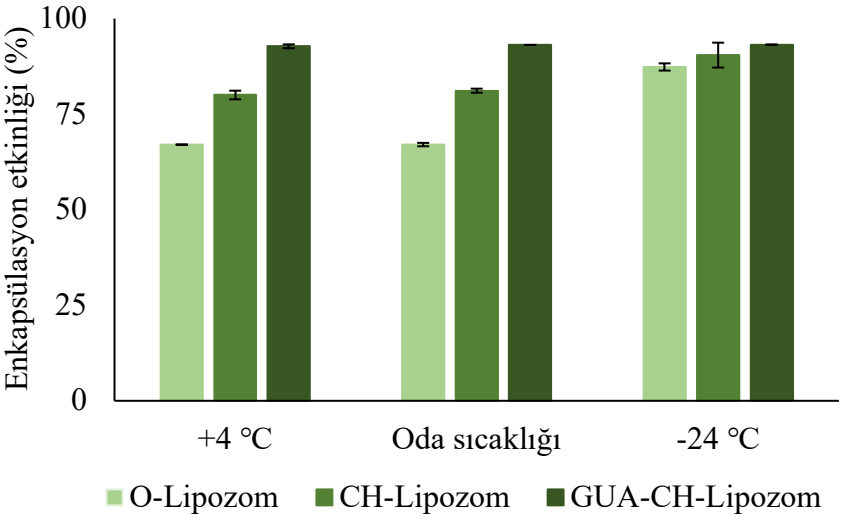
Şekil 4.16. Stabilite çalışması 14. gün

Şekil 4.17'de lipozomların 21 günlük stabilite sonuçları verilmiştir. Buna göre O-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %67,24 ± 0,01, oda sıcaklığında %68,81 ± 0,37 ve -24°C'de %88,73 ± 0,93'tür. CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %81,67 ± 1,55, oda sıcaklığında %82,28 ± 1,14 ve -24°C'de %91,94 ± 0,28'dir. GUA-CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %93,28 ± 0,31, oda sıcaklığında %93,18 ± 0,45 ve -24°C'de %93,19 ± 0,29'dur.



Şekil 4.17. Stabilite çalışması 21.gün

28 günlük stabilite çalışmasının sonunda (Şekil 4.18), O-Lipozom için enkapsülasyon etkinliği +4°C'de %67,01 ± 0,03, oda sıcaklığında %67,03 ± 0,44 ve -24°C'de %87,32 ± 0,94; CH-Lipozom için +4°C'de %79,99 ± 1,13, oda sıcaklığında %81,12 ± 0,53 ve -24°C'de %90,43 ± 3,26; GUA-CH-Lipozom için +4°C'de %92,73 ± 0,51, oda sıcaklığında %93,09 ± 0,01 ve -24°C'de %93,15 ± 0,01'dir.



Şekil 4.18. Stabilite çalışması 28.gün

Stabilite çalışmasının sonuçlarına göre, 28 gün sonunda O-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği +4°C'de ve oda sıcaklığında yaklaşık %29, -24°C'de yaklaşık %7 azalmıştır. CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği ise +4°C'de yaklaşık %15, oda sıcaklığında yaklaşık %14 ve -24°C'de yaklaşık %4 azalmıştır. Son olarak GUA-CH-Lipozomun enkapsülasyon etkinliği ise +4°C'de %1,1, oda sıcaklığında %0,72 ve -24°C'de %0,66 azalmıştır. Geleneksel lipozomlar genellikle düşük stabilite ve dayanıklılığa sahiptir. Lipozom yüzeyinin polielektrolit polimerler ile modifiye edilmesi, lipozomların bu olumsuz özelliklerinin üstesinden gelmek için bir çözüm olabilir (Hermal vd., 2020).

5. SONUÇ

Bu çalışmada yüksek antioksidan aktivitesi ve biyofonksiyonel özellikleri sebebiyle çeşitli kültürlerde yüzyıllardır çeşitli formlarda ilaç olarak kullanılan *Alpinia officinarum* Hance bitkisinin temel bileşeni olan galanginin biyoerişilebilirliğinin arttırılması için polielektrolit lipozomlar geliştirilmiştir.

Çalışmanın ilk bölümünde *Alpinia officinarum* Hance rizomlarından galangin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Galangin ekstraksiyonu için geliştilecek lipozomların üretim tekniğine uyumlu olması amacıyla etanol seçilmiştir. HPLC-DAD ile ekstraktın kromatografik analizi gerçekleştirilerek fenolik bileşik profili ve içeriği belirlenmiştir. Analiz sonucunda ekstraktın temel bileşeninin galangin olduğu ve galangin konsantrasyonunun 11,5694 mg/g örnek olduğu belirlenmiştir. Daha sonra spektroskopik analizler ile ekstraktın toplam fenolik madde içeriği, flavonoid içeriği ve toplam antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Spektroskopik çalışmalar sonucunda ekstraktın toplam fenolik madde içeriği 113, 61 ± 2,28 mg GAE/g örnek, flavonoid içeriği 5,76 ± 0,06 mg QE/g örnek ve toplam antioksidan kapasitesi 28,81 ± 0,00 mg TE/g örnek olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde galangin için lipozomal taşıyıcı sistem geliştirmek amacıyla kemometrik optimizasyon tekniklerinden RSM-CCD kullanılarak ultrasonikasyon zamanı, fosfatidilkolin, kolesterol ve galangin oranı optimize edilmiştir. Optimizasyon için 30 farklı deney gerçekleştirilerek maksimum enkapsülasyon etkinliğinde lipozomlar elde etmek için gerekli olan optimum koşullar belirlenmiştir. Buna göre lipozom üretimi için optimum koşullar şu şekildedir; ultrasonikasyon zamanı 24,73 dk, fosfatidilkolin oranı 1,50 mg:mL, kolesterol oranı 0,88 mg:mL ve galangin oranı 0,19 mg:mL'dir. Belirlenen optimum koşullar için tahmini enkapsülasyon etkinliği %93,77'dir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen deneysel enkapsülasyon etinliği ise %93,77 ± 0,05'dir. Bu sonuçlar lipozom üretimi için geliştirilen modelin enkapsülasyon etkinliğini tahmin etmede başarılı olduğunu göstermektedir. Bu bölümde son olarak yüksek stabiliteyi sağlayabilmek için elde edilen

optimum lipozomların yüzeyi kitosan ve gam arabik kullanılarak katman katman biriktirme tekniği ile modifiye edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü kısmında polielektrolit lipozomlar karakterize edilmiştir. Karakterizasyon için FTIR analizi, boyut, morfoloji, hidrodinamik çap, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi analizleri gerçekleştirilmiştir. FTIR analizi sonucunda galanginin yapısının bozulmadan lipozomlara enkapsüle edildiği ve yüzey modifikasyonunun elektrostatik etkileşim ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir. FE-SEM ile gerçekleştirilen boyut ve morfoloji analizi sonucunda lipozomların küresel yapıya, 266,60 ± 8,49 nm boyuta sahip olduğu tespit edilmiştir. DLS analizi ile hidrodinamik çapının 567 ± 113 nm, zeta potansiyelinin -6 ± 4 mV ve polidispersite indeksinin 0,749 ± 0,272 olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın dördüncü ve son kısmında ise elde edilen polielektrolit lipozomların *in vitro* simüle vücut sıvısında salım davranışı ve kinetik modeli, *in vitro* gastrointestinal sistemde salım davranışı, biyoerişilebilirliği ve stabilitesi incelenmiştir. *In vitro* simüle vücut sıvısında salım çalışmasına göre polielektrolit lipozomlar 5 saat sonunda %23,84 oranında galangin salımı gerçekleştirmiştir ve kinetik salım modeli Higuchi modeli ile uyumludur. Higuchi modeline göre salım difüzyon yolu ile gerçekleştirilmektedir. *In vitro* gastrointestinal sindirim çalışmasına göre mide sindirimi sonunda polielektrolit lipozomlar %4,75 galangin salımı ve bağırsak sindirimi sonunda %10,88 galangin salımı gerçekleştirmiştir. Biyoerişilebilirlik çalışması sonucunda ise *Alpinia officinarum* Hance ekstraktındaki galanginin biyoerişilebilirliği %28,88 ± 2,39 iken polielektrolit lipozomlarda bu oran %89,11 ± 2,00'dır. Stabilite çalışmalarına göre ise 28 gün boyunca polielektrolit lipozomların enkapsülasyon etkinliği %93,77'den +4°C'de %92,73 ± 0,51'e, oda sıcaklığında %93,09 ± 0,01'e ve -24°C'de %93,15 ± 0,01'e gerilemiştir.

Gerçekleştirilen çalışma sonunda geliştirilen polielektrolit lipozomlar galanginin biyoerişilebilirliğini 3 kattan fazla arttırmış, gastrointestinal koşullardan, simüle vücut sıvılarından ve farklı depolama koşullarından kaynaklanabilecek bozulmayı en aza indirerek stabil kalmasını sağlamıştır. Geliştirilen polielektrolit lipozom sistemi yalnızca

galangin için değil, galangin gibi yüksek hidrofobikliğe ve zayıf biyoyararlanıma sahip fenolik bileşikler için de uygulanabilir olduğu öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Abbas, Z. S., Sulaiman, G. M., Jabir, M. S., Mohammed, S. A. A., Khan, R. A., Mohammed, H. A. ve Al-Subaiyel, A. (2022). Galangin/β-Cyclodextrin inclusion complex as a drug-delivery system for improved solubility and biocompatibility in breast cancer treatment. *Molecules, 27*(14), 4521. https://doi.org/10.3390/molecules27144521

Abbas, Z., Sulaiman, G., Jabir, M., Mohammed, H. ve Mohammed, S. (2023). Antioxidant properties of galangin with β-cyclodextrin: an in vitro and in vivo. *Journal of Applied Sciences and Nanotechnology, 3*(1), 80-89. https://doi.org/10.53293/jasn.2022.4876.1157

Abubakar, I. B., Malami, I., Yahaya, Y. ve Sule, S. M. (2018). A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of Alpinia officinarum Hance. *Journal of Ethnopharmacology, 224*, 45-62. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.027

Abuwatfa, W. H., Awad, N. S., Pitt, W. G. ve Husseini, G. A. (2022). Thermosensitive polymers and thermo-responsive liposomal drug delivery systems. *Polymers, 14(*5), 925. https://doi.org/10.3390/polym14050925

Aguilar-Pérez, K. M., Avilés-Castrillo, J. I., Medina, D. I., Parra-Saldivar, R. ve Iqbal, H. M. N. (2020). Insight into nanoliposomes as smart nanocarriers for greening the twenty-first century biomedical settings. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8,* 579536. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.579536

Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q. ve Jinghua, C. (2019). Liposome: Composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting, 27*(7), 742-761. https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337

Ajeeshkumar, K. K., Aneesh, P. A., Raju, N., Suseela, M., Ravishankar, C. N. ve Benjakul, S. (2021). Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20*(2), 1280-1306. Blackwell Publishing Inc. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12725

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Woo Joo, S., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. ve Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters, 8*(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-102

Alfwuaires, M. A. (2022). Galangin mitigates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in a rat model of methotrexate hepatotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research, 29*(14), 20279-20288. https://doi.org/10.1007/s11356-021-16804-z

Altin, G., Gültekin-Özgüven, M. ve Ozcelik, B. (2018). Chitosan coated liposome dispersions loaded with cacao hull waste extract: Effect of spray drying on physico-chemical stability and in vitro bioaccessibility. *Journal of Food Engineering, 223*, 91-98. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.005

Amic, D., Davidovi-Amic, D., Belo, D., Rastija, V., Lui, B. ve Trinajsti, N. (2007). SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry, 14*(7), 827-845. https://doi.org/10.2174/092986707780090954

An, N., Zou, Z. Mei, Tian, Z., Luo, X. Zhen, Yang, S. L, ve Xu, L. Z. (2008). Diarylheptanoids from the rhizomes of Alpinia officinarum and their anticancer activity. *Fitoterapia, 79*(1), 27-31. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.07.001

Andra, V. V. S. N. L., Pammi, S. V. N., Bhatraju, L. V. K. P. ve Ruddaraju, L. K. (2022). A comprehensive review on novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents. *BioNanoScience 12*(1), 274-291. https://doi.org/10.1007/s12668-022-00941-x

Anirudhan, T. S., Vasantha, C. S. ve Sasidharan, A. V. (2017). Layer-by-layer assembly of hyaluronic acid/carboxymethylchitosan polyelectrolytes on the surface of aminated mesoporous silica for the oral delivery of 5-fluorouracil. *European Polymer Journal, 93,* 572-589. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.06.033

Arias-Alpizar, G., Kong, L., Vlieg, R. C., Rabe, A., Papadopoulou, P., Meijer, M. S., Bonnet, S., Vogel, S., van Noort, J., Kros, A. ve Campbell, F. (2020). Light-triggered switching of liposome surface charge directs delivery of membrane impermeable payloads in vivo. *Nature Communications, 11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-17360-9

Attokaran, M. (2017). Galangal: Lesser Alpinia officinarum Hance (Zingiberaceae). *Natural Food Flavors and Colorants,* Second Edition, 198-199. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119114796.ch54

Avci, A. G., Avci, E., Ozluk Cilak, G. ve Coskun Cevher, S. (2020). Antimicrobial and antioxidant activities of Zingiber officinale (Ginger) and Alpinia officinarum (Galangal). *Hittite Journal of Science ve Engineering, 7*(1), 45-49. https://doi.org/10.17350/HJSE19030000171

Awad, E., El-Fiqi, A., Austin, D. ve Lyndon, A. (2020). Possible effect of lesser galangal (Alpinia officinarum) extracts encapsulated into mesoporous silica nanoparticles on the immune status of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture Research, 51*(9), 3674-3684. https://doi.org/10.1111/are.14717

Baishya, H. (2017). Application of mathematical models in drug release kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. *Journal of Developing Drugs, 6*(2). https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000171

Beltrán-Gracia, E., López-Camacho, A., Higuera-Ciapara, I., Velázquez-Fernández, J. B. ve Vallejo-Cardona, A. A. (2019). Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnology, 10*(1), 1-40. https://doi.org/10.1186/s12645-019-0055-y

Bhupathyraaj, M. (2013). Liposomal drug delivery systems-A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 23*(1), 295-301. https://www.researchgate.net/publication/260640279

Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. ve Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research, 33*(10), 2373-2387. Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5

Boehm, F. J. (2016). Design challenges and considerations for nanomedical device signal acquisition and propagation. *Nanomedical Device and Systems Design: Challenges, Possibilities, Visions,* 259-302. https://doi.org/10.1201/b15626-15

Bonechi, C., Tamasi, G., Donati, A., Leone, G., Consumi, M., Cangeloni, L., Volpi, V., Magnani, A., Cappelli, A. ve Rossi, C. (2021). Physicochemical characterization of

hyaluronic acid and chitosan liposome coatings. *Applied Sciences*, *11*(24), 12071. https://doi.org/10.3390/app112412071

Borges Bubols, G., da Rocha Vianna, D., Medina-Remon, A., von Poser, G., Maria Lamuela-Raventos, R., Lucia Eifler-Lima, V. ve Cristina Garcia, S. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 13*(3), 318-334. https://doi.org/10.2174/1389557511313030002

Bratovcic, A. ve Suljagic, J. (2019). Micro- and nano-encapsulation in food industry. *Croatian Journal of Food Science and Technology, 11*(1), 113-121. https://doi.org/10.17508/cjfst.2019.11.1.17

Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A. ve Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research, 5*(3), 231-242. https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8

Cao, Y., Dong, X. ve Chen, X. (2022). Polymer-modified liposomes for drug delivery: from fundamentals to applications. *Pharmaceutics, 14*(4), 778. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040778

Carocho, M. ve Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology, 51*(1), 15-25. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021

Chen, D., Li, D., Xu, X. B., Qiu, S., Luo, S., Qiu, E., Rong, Z., Zhang, J. ve Zheng, D. (2019). Galangin inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis by downregulating CD44 in glioma. *Journal of Cancer, 10*(19), 4499-4508. https://doi.org/10.7150/jca.31487

Chen, F., Tan, Y. F., Li, H. L., Qin, Z. M., Cai, H. D., Lai, W. Y., Zhang, X. P., Li, Y. H., Guan, W. W., Li, Y. B. ve Zhang, J. Q. (2015). Differential systemic exposure to galangin after oral and intravenous administration to rats. *Chemistry Central Journal, 9(*1). https://doi.org/10.1186/s13065-015-0092-5

Chen, Q. X., Zhou, L., Long, T., Qin, D. L., Wang, Y. L., Ye, Y., Zhou, X. G., Wu, J. M. ve Wu, A. G. (2022). Galangin exhibits neuroprotective effects in 6-OHDA-induced models of Parkinson's disease via the Nrf2/Keap1 pathway. *Pharmaceuticals, 15*(8). https://doi.org/10.3390/ph15081014

Chen, Y., Xia, G., Zhao, Z., Xue, F., Gu, Y., Chen, C. ve Zhang, Y. (2020). 7,8-Dihydroxyflavone nano-liposomes decorated by crosslinked and glycosylated lactoferrin: storage stability, antioxidant activity, in vitro release, gastrointestinal digestion and transport in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Functional Foods, 65*. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103742

Chevallier, A. (2016). Encyclopedia of herbal medicine: 550 herbs and remedies for common ailments. Penguin.

Cui, T., Jia, A., Yao, M., Zhang, M., Sun, C., Shi, Y., Liu, X., Sun, J. ve Liu, C. (2021). Characterization and caco-2 cell transport assay of chito-oligosaccharides nano-liposomes based on layer-by-layer coated. *Molecules, 26*(14), 4144. https://doi.org/10.3390/molecules26144144

Curti, V., Zaccaria, V., Sokeng, A. J. T., Dacrema, M., Masiello, I., Mascaro, A., D'antona, G. ve Daglia, M. (2019). Bioavailability and in vivo antioxidant activity of a standardized polyphenol mixture extracted from brown propolis. *International Journal of Molecular Sciences, 20*(5), 1250. https://doi.org/10.3390/ijms20051250

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. ve Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics, 10*(2), 57. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057

Deniz, A., Sade, A., Severcan, F., Keskin, D., Tezcaner, A. ve Banerjee, S. (2010). Celecoxib-loaded liposomes: Effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics. *Bioscience Reports, 30*(5), 365-373. https://doi.org/10.1042/BSR20090104

Dixit, A., Rohilla, A., Dixit, J. ve Singh, V. (2014). Qualitative analysis of various plant extracts of Alpinia officinarum. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 4*(3), 505-508.

Dou, J., Shouqin, Z., Zhang, J., Zhang, S., Liang, Q. ve Meng, Q. (2010). Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil and methanol extracts of rhizoma Alpinia officinarum from China in vitro. *African Journal of Biotechnology, 9*(28), 4414-4421.

Ekenna, I. C. ve Abali, S. O. (2022). Comparison of the use of kinetic model plots and DD Solver software to evaluate the drug release from Griseofulvin tablets. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 12*(2-S), 5-13. https://doi.org/10.22270/jddt.v12i2-s.5402

Fang, L., Zhang, H., Zhou, J., Geng, Y. ve Wang, X. (2018). Rapid screening and preparative isolation of antioxidants from Alpinia officinarum Hance using HSCCC coupled with DPPH-HPLC assay and evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Analytical Methods in Chemistry,* 2018. https://doi.org/10.1155/2018/3158293

Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S. S. K. ve Torchilin, V. P. (2020). Recent advancements in liposome technology. *Advanced Drug Delivery Reviews, 156,* 4-22. https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022

Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C. ve Pereira, Z. V. (2014). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in Psychotria leaf extracts. *Antioxidants, 3*(4), 745-757. https://doi.org/10.3390/antiox3040745

Fr, S. ve Venkatesham, A. (2023). Comparison of the use of kinetic model plots by DD Solver software to evaluate the drug release from Rutin-Mesoporous SBA-15 complex.

Fu, J., Wang, Y., Sun, M., Xu, Y. ve Chen, L. (2022). Antibacterial activity and components of the methanol-phase extract from rhizomes of pharmacophagous plant Alpinia officinarum Hance. *Molecules, 27*(13), 4308. https://doi.org/10.3390/molecules27134308

Fu, M. C. (2015). Handbook of simulation optimization. Springer. http://www.springer.com/series/6161

Gibis, M., Ruedt, C. ve Weiss, J. (2016). In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*, *88*, 105-113. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.010

Ghil, S. (2013). Antiproliferative activity of Alpinia officinarum extract in the human breast cancer cell line MCF-7. *Molecular Medicine Reports, 7*(4), 1288-1292. https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1305

Gomaa, A. I., Martinent, C., Hammami, R., Fliss, I. ve Subirade, M. (2017). Dual coating of liposomes as encapsulating matrix of antimicrobial peptides: Development and characterization. *Frontiers in Chemistry, 5*(11). https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00103

Gomaa, M. M., Fadly, E. El, Salama, M. A. ve Abdin, M. (2022). Production of biocomposite films from gum arabic and galangal extract to prolong the shelf life of agaricus bisporus. *Journal of Polymers and the Environment, 30*(11), 4787-4799. https://doi.org/10.1007/s10924-022-02551-w

Gómez-Mascaraque, L. G., Casagrande Sipoli, C., de La Torre, L. G. ve López-Rubio, A. (2017). Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. *Food Chemistry, 233*, 343-350. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.133

Gong, J., Zhang, X., Tan, Y., Li, H., Hou, J. ve Zhang, J. (2020). Gastroprotective effect of the root extract of Alpinia officinarum Hance (Zingiberoside) against acute indomethacin-induced gastric injuries in rats: Involvement of H+/K8-ATPase and prostaglandin E receptors. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 19*(9), 1887-1893. https://doi.org/10.4314/tjpr.v19i9.13

Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A. ve Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics, 601*, 120571. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571

Hajipour, H., Nouri, M., Ghorbani, M., Bahramifar, A., Emameh, R. Z. ve Taheri, R. A. (2021). Targeted nanostructured lipid carrier containing galangin as a promising adjuvant for improving cytotoxic effects of chemotherapeutic agents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 394(*12), 2353-2362. https://doi.org/10.1007/s00210-021-02152-9

Has, C. ve Sunthar, P. (2020). A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *Journal of Liposome Research, 30*(4), 336-365. https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010

Hashemi, S. H., Montazer, M., Naghdi, N. ve Toliyat, T. (2018). Formulation and characterization of alprazolam-loaded nanoliposomes: Screening of process variables and optimizing characteristics using RSM. *Drug Development and Industrial Pharmacy, 44*(2), 296-305. https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1391834

Heo, M. Y., Sohn, S. J. ve Au, W. W. (2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research, 488*(2), 135-150. https://doi.org/10.1016/s1383-5742(01)00054-0

Hermal, F., Frisch, B., Specht, A., Bourel-Bonnet, L. ve Heurtault, B. (2020). Development and characterization of layer-by-layer coated liposomes with poly(L-lysine) and poly(L-glutamic acid) to increase their resistance in biological media. *International Journal of Pharmaceutics,* 586. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119568

Hernández-Fernández, M. Á., García-Pinilla, S., Ocampo-Salinas, O. I., Gutiérrez-López, G. F., Hernández-Sánchez, H., Cornejo-Mazón, M., de Jesús Perea-Flores, M. ve Dávila-Ortiz, G. (2020). Microencapsulation of vanilla oleoresin (V. Planifolia andrews) by complex coacervation and spray drying: Physicochemical and microstructural characterization. *Foods, 9*(10).

https://doi.org/10.3390/foods9101375
Honda, M., Asai, T., Oku, N., Araki, Y., Tanaka, M. ve Ebihara, N. (2013). Liposomes and nanotechnology in drug development: Focus on ocular targets. *International Journal of Nanomedicine, 8,* 495-504. https://doi.org/10.2147/IJN.S30725
Huang, H., Wu, D., Tian, W. X., Ma, X. F. ve Wu, X. D. (2008). Antimicrobial effect by extracts of rhizome of Alpinia officinarum Hance may relate to its inhibition of b-ketoacyl-ACP reductase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23(*3), 362-368. https://doi.org/10.1080/14756360701622099
Indrayan, A. K., Agrawal, P., Rathi, A. K., Shatru, A., Agrawal, N. K. ve Tyagi, D. K. (2009). Nutritive value of some indigenous plant rhizomes resembling ginger. *Natural Product Radiance,* 507-513.
Islam Shishir, M. R., Karim, N., Gowd, V., Zheng, X. ve Chen, W. (2019). Liposomal delivery of natural product: A promising approach in health research. *Trends in Food Science and Technology, 85,* 177-200. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.013
Jash, A., Ubeyitogullari, A. ve Rizvi, S. S. H. (2021). Liposomes for oral delivery of protein and peptide-based therapeutics: challenges, formulation strategies, and advances. *Journal of Materials Chemistry B, 9*(24), 4773-4792. https://doi.org/10.1039/d1tb00126d
Jeon, S., Yoo, C. Y. ve Park, S. N. (2015). Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate-chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 129*, 7-14. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.018
Jeong, D., Kim, H. ki, Jeong, J. pil, Dindulkar, S. D., Cho, E., Yang, Y. H. ve Jung, S. (2016). Cyclosophoraose/cellulose hydrogels as an efficient delivery system for galangin, a hydrophobic antibacterial drug. *Cellulose, 23*(4), 2609-2625. https://doi.org/10.1007/s10570-016-0975-1
Jiao, H., Xu, S., Fan, C., Zhang, Q. ve Wang, Y. (2019). Chromatographic fingerprint analysis and quantitative evaluate the rhizomes of Alpinia officinarum Hance (lesser galangal). *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 28*(10), 728-738. https://doi.org/10.5246/jcps.2019.10.069
Juhairiyah, F. ve de Lange, E. C. M. (2021). Understanding drug delivery to the brain using liposome-based strategies: Studies that provide mechanistic insights are essential. *AAPS Journal, 23*(6). https://doi.org/10.1208/s12248-021-00648-z
Jung, J. M., Kwon, O. Y., Choi, J. K. ve Lee, S. H. (2022). Alpinia officinarum Rhizome ameliorates the UVB induced photoaging through attenuating the phosphorylation of AKT and ERK. *BMC Complementary Medicine and Therapies, 22*(1). https://doi.org/10.1186/s12906-022-03707-w
Juszkiewicz, K., Sikorski, A. F. ve Czogalla, A. (2020). Building blocks to design liposomal delivery systems. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(24), 1-22. https://doi.org/10.3390/ijms21249559
Kadam, K., Kıyan, S., Uyanıkgil, Y., Karabey, F. ve Çetin, E. Ö. (2022). Investigation of acute effects of topical Alpinia officinarum (galangal) treatment in experimental contact type burns and comparison with topical silver sulfadiazine treatment. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi, 28*(1), 15-26. https://doi.org/10.14744/tjtes.2020.69002

Karkar, B. ve Şahin, S. (2022). Determination of phenolic compounds profiles and antioxidant properties of oleaster (Elaeagnus angustifolia L.) grown in Turkey. *European Food Research and Technology, 248*(1), 219-241. https://doi.org/10.1007/s00217-021-03875-y

Karkar, B., Şahin, S. ve Güneş, M. E. (2021). Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey. *Journal of Apicultural Research*, *60*(5), 765-774. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844462

Khorasani, S., Danaei, M. ve Mozafari, M. R. (2018). Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. *Trends in Food Science and Technology, 79,* 106-115.https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.009

Khuri, A. I. ve Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2*(2), 128-149. https://doi.org/10.1002/wics.73

Kim, H., Choi, J. M., Choi, Y., Tahir, M. N., Yang, Y. H., Cho, E. ve Jung, S. (2014). Enhanced solubility of galangin based on the complexation with methylated microbial cyclosophoraoses. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 79(*3-4), 291-300. https://doi.org/10.1007/s10847-013-0351-9

Koçak, Ö. F. ve Yılmaz, F. (2022). Use of Alpinia officinarum rhizome in textile dyeing and gaining simultaneous antibacterial properties. *Journal of Natural Fibers, 19*(5), 1925-1936. https://doi.org/10.1080/15440478.2021.1889441

Konno, K., Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W., Kato, M., Yamamoto, R. ve Kurokawa, M. (2011). Antiviral activities of diarylheptanoids isolated from Alpinia officinarum against respiratory syncytial virus, poliovirus, measles virus, and herpes simplex virus type 1 in vitro. *Natural product communications, 6*(12). https://doi.org/https://doi.org/10.1177/1934578X1100601222

Köse, L. P., Gülçin, I., Gören, A. C., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A. L. ve Gorinstein, S. (2015). LC-MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (Alpinia officinarum Hance) rhizomes. *Industrial Crops and Products, 74*, 712-721. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.034

Krishnaveni, M., Pg, A. ve Kr, A. (2017.). Comparative phytochemical analysis of Alpinia officinarum rhizome and Terminalia Chebula fruit. *Pharmaceutical Sciences International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 7*(1), 32-39. http://dx.doi.org/10.21276/ijpbs.2017.7.1.5

Kumar, G., Bhadoria, A. S. ve Patani, P. (2022). A complete review on liposome based drug delivery sysyem. *Journal of Pharmaceutical Negative Results, 13*, 2314-2322. https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S05.363

Kumar, S., Dutta, J., Dutta, P. K. ve Koh, J. (2020). A systematic study on chitosan-liposome based systems for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules, 160,* 470-481. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.192

Kumari, M. ve Gupta, S. K. (2019). Response surface methodological (RSM) approach for optimizing the removal of trihalomethanes (THMs) and its precursor's by surfactant modified magnetic nanoadsorbents (sMNP)-An endeavor to diminish probable cancer risk. *Scientific Reports, 9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-54902-8

Kurapati, R., Groth, T. W. ve Raichur, A. M. (2019). Recent developments in layer-by-layer technique for drug delivery applications. *ACS Applied Bio Materials, 2*(12), 5512-5527. https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00703

Landi-Librandi, A. P., Caleiro Seixas Azzolini, A. E., De Oliveira, C. A. ve Lucisano-Valim, Y. M. (2012). Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. *Drug Delivery, 19*(4), 177-187. https://doi.org/10.3109/10717544.2012.679710

Landi-Librandi, A. P., De Oliveira, C. A., Caleiro Seixas Azzolini, A. E., Mariko Kabeya, L., Del Ciampo, J. O., Lopes Badra Bentley, M. V. ve Lucisano-Valim, Y. M. (2011). In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP-H2O2-luminol system. *Journal of Microencapsulation, 28*(4), 258-267. https://doi.org/10.3109/02652048.2011.559283

Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C. ve Fessi, H. (2012). Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology, 1*(2), 147-168. https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020

Lee, J. J., Lee, J. H., Yim, N. H., Han, J. H. ve Ma, J. Y. (2017). Application of galangin, an active component of Alpinia officinarum Hance (Zingiberaceae), for use in drug-eluting stents. *Scientific Reports, 7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-08410-2

Lee, J. S., Kim, K. A., Jeong, S. H., Lee, S. G., Park, H. J., Kim, N. J. ve Lim, S. (2009). Anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-psychiatric effects by the rhizomes of Alpinia officinarum on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology, 126*(2), 258-264. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.033

Lee, M. K. (2020). Liposomes for enhanced bioavailability of water-insoluble drugs: In vivo evidence and recent approaches. *Pharmaceutics, 12*(3), 264. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030264

Li, C. Y., Cheng, S. E., Wang, S. H., Wu, J. Y., Hsieh, C. W., Tsou, H. K. ve Tsai, M. S. (2021). The anti-inflammatory effects of the bioactive compounds ısolated from Alpinia officinarum Hance mediated by the suppression of NF-kappaB and MAPK signaling. *Chinese Journal of Physiology, 64*(1), 32-42. https://doi.org/10.4103/CJP.CJP_81_20

Li, J., Zhai, J., Dyett, B., Yang, Y., Drummond, C. J. ve Conn, C. E. (2021). Effect of gum arabic or sodium alginate incorporation on the physicochemical and curcumin retention properties of liposomes. *LWT, 139,* 110571. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110571

Li, N., Zhuang, C., Wang, M., Sun, X., Nie, S. ve Pan, W. (2009). Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics, 379*(1-2), 131-138. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.06.020

Li, Y., Guo, M., Lin, Z., Zhao, M., Xia, Y., Wang, C., Xu, T. ve Zhu, B. (2018). Multifunctional selenium nanoparticles with Galangin-induced HepG2 cell apoptosis through p38 and AKT signalling pathway. *Royal Society Open Science, 5*(11), 180509. https://doi.org/10.1098/rsos.180509

Lim, T. K. (2016). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, 12. *Springer International Publishing.*

Lin, K., Wang, Y., Gong, J., Tan, Y., Deng, T. ve Wei, N. (2020). Protective effects of total flavonoids from Alpinia officinarum rhizoma against ethanol-induced gastric ulcer in vivo and in vitro. *Pharmaceutical Biology, 58*(1), 854-862. https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1803370

Lin, L. Y., Peng, C. C., Yeh, X. Y., Huang, B. Y., Wang, H. E., Chen, K. C. ve Peng, R. Y. (2015). Antihyperlipidemic bioactivity of Alpinia officinarum (Hance) Farw Zingiberaceae can be attributed to the coexistance of curcumin, polyphenolics, dietary fibers and phytosterols. *Food and Function, 6*(5), 1600-1610. https://doi.org/10.1039/c4fo00901k

Liu, G., Hou, S., Tong, P. ve Li, J. (2022). Liposomes: Preparation, characteristics, and application strategies in Analytical Chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry, 52*(2), 392-412. https://doi.*org*/10.1080/10408347.2020.1805293

Liu, T., Wang, Y., Zhong, W., Li, B., Mequanint, K., Luo, G. ve Xing, M. (2019). Biomedical applications of layer-by-layer self-assembly for cell encapsulation: Current status and future perspectives. *Advanced Healthcare Materials, 8*(1), 1800939. https://doi.org/10.1002/adhm.201800939

Liu, W., Liu, J., Li, T., Liu, C. ve Liu, W. (2013). Improved physical and in vitro digestion stability of a polyelectrolyte delivery system based on layer-by-layer self- assembly alginate-chitosan-coated nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(17), 4133-4144. https://doi.org/10.1021/jf305329n

Liu, W., Liu, W., Ye, A., Peng, S., Wei, F., Liu, C. ve Han, J. (2016). Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate. *Food Chemistry, 196*, 396-404. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.050

Lombardo, D. ve Kiselev, M. A. (2022). Methods of liposomes preparation: Formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. *Pharmaceutics, 14*(3), 543. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543

Lu, H., Chen, X. ve Xu, H. (2021). Preparation of galangin self-microemulsion drug delivery system and evaluation of its pharmacokinetics in vivo and antioxidant activity ın vitro. *Pharmacognosy Magazine, 18*(80), 1025-1034.

Lu, Y. Hua, Wang, Z. Tao, Wei, D. Z. ve Xiang, H. Bo. (2007). Mechanism and inhibitory effect of galangin and its flavonoid mixture from Alpinia officinarum on mushroom tyrosinase and B16 murine melanoma cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22*(4), 433-438. https://doi.org/10.1080/14756360601141562

Ly, T. N., Shimoyamada, M., Kato, K. ve Yamauchi, R. (2003). Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galanga (Alpinia officinarum Hance). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(17), 4924-4929. https://doi.org/10.1021/jf034295m

Madrigal-Carballo, S., Lim, S., Rodriguez, G., Vila, A. O., Krueger, C. G., Gunasekaran, S. ve Reed, J. D. (2010). Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid. *Journal of Functional Foods, 2*(2), 99-106. https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.002

Magsoudi, S., Hosseini, S. A. ve Ravandi, S. (2022). A Review on phospholipid and liposome carriers: synthetic methods and their applications in drug delivery. *Journal of Chemical Reviews, 4*(4), 346-363. https://doi.org/10.22034/JCR.2022.355104.1182

Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirolomoom, A., Reshetov, V., Stebe, M. J. ve Linder, M. (2012). Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design. *Analyst, 137*(3), 773-786. https://doi.org/10.1039/c1an15794a

Maja, L., Željko, K. ve Mateja, P. (2020). Sustainable technologies for liposome preparation. *Journal of Supercritical Fluids, 165*, 104984. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984

Mak, K. K., Tan, J. J., Marappan, P., Katyayani Balijepalli, M., Choudhury, H., Ramamurthy, S. ve Rao Pichika, M. (2018). Galangin's potential as a functional food ingredient. *Journal of Functional Foods, 46*, 490-553. https://doi.org/10.1016/j.j.2018.04.054

Maria Leena, M., Yoha, K. S., Moses, J. A. ve Anandharamakrishnan, C. (2020). Edible coating with resveratrol loaded electrospun zein nanofibers with enhanced bioaccessibility. *Food Bioscience, 36,* 100669. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100669

Mateos-Maroto, A., Fernández-Peña, L., Abelenda-Núñez, I., Ortega, F., Rubio, R. G. ve Guzmán, E. (2022). Polyelectrolyte multilayered capsules as biomedical tools. *Polymers, 14*(3), 479. https://doi.org/10.3390/polym14030479

Matsuda, H., Nakashima, S., Oda, Y., Nakamura, S. ve Yoshikawa, M. (2009). Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of Alpinia officinarum in B16 melanoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17*(16), 6048-6053. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.06.057

Mohammadi, A., Kazemi, S., Molayousefian, I., Pirzadeh, M. ve Moghadamnia, A. A. (2022). Galangin nanoparticles protect acetaminophen-induced liver injury: A biochemical and histopathological approach. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine,* 2022. https://doi.org/10.1155/2022/4619064

Muflihah, Y. M., Gollavelli, G. ve Ling, Y. C. (2021). Correlation study of antioxidant activity with phenolic and flavonoid compounds in 12 indonesian indigenous herbs. *Antioxidants, 10*(10), 1530. https://doi.org/10.3390/antiox10101530

Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M. ve Beheshtkhoo, N. (2021). Liposomes: structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9,* 748 705886. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886

Nguyen, T. T. A., Huynh, D. T. ve Rungraeng, N. (2019). Extraction and encapsulation of lesser galangal (Alpinia officinarum) essential oil using microwave pretreatment and spray drying. *The Journal of Agriculture and Development*, *18*(3), 57-63. https://doi.org/10.52997/jad.9.03.2019

Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A. ve Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon, 8*(5). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394

Nur, S., Mubarak, F., Jannah, C., Winarni, D. A., Rahman, D. A., Hamdayani, L. A. ve Sami, F. J. (2019). Total phenolic and flavonoid compounds, antioxidant and toxicity profile of extract and fractions of paku atai tuber (Angiopteris ferox Copel). *Food Research, 3*(6), 734-740. https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).135

Olajire, A. A. ve Azeez L. (2011). Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. *African Journal of Food Science and Technology, 2*(2), 22-29. http://www.interesjournals.org/AJFST

Omoregie, S. N., Omoruyi, F. O., Wright, V. F., Jones, L. ve Zimba, P. V. (2013). Antiproliferative activities of lesser galangal (Alpinia officinarum Hance Jam1), turmeric (Curcuma longa L.), and ginger (Zingiber officinale Rosc.) against acute monocytic leukemia. *Journal of Medicinal Food, 16*(7), 647-655. https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0254

Osman, M. A., Mahmoud, G. I. ve Shoman, S. S. (2020). Correlation between total phenols content, antioxidant power and cytotoxicity. *Biointerface Research in Applied Chemistry, 11*(3), 10640-10653. https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1064010653

Othman, A. K., El Kurdi, R., Badran, A., Mesmar, J., Baydoun, E. ve Patra, D. (2022). Liposome-based nanocapsules for the controlled release of dietary curcumin: PDDA and silica nanoparticle-coated DMPC liposomes enhance the fluorescence efficiency and anticancer activity of curcumin. *RSC advances*, *12*(18), 11282-11292. https://doi.org/10.1039/D2RA00071G

Panwar, P., Pandey, B., Lakhera, P. C. ve Singh, K. P. (2010). Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. *International Journal of Nanomedicine,* 101-108. https://doi.org/10.2147/ijn.s8030

Paolino, D., Mancuso, A., Cristiano, M. C., Froiio, F., Lammari, N., Celia, C. ve Fresta, M. (2021). Nanonutraceuticals: The new frontier of supplementary food. *Nanomaterials, 11*(3), 1-20. https://doi.org/10.3390/nano11030792

Pasarin, D., Ghizdareanu, A. I., Enascuta, C. E., Matei, C. B., Bilbie, C., Paraschiv-Palada, L. ve Veres, P. A. (2023). Coating materials to increase the stability of liposomes. *Polymers, 15*(3), 782. https://doi.org/10.3390/polym15030782

Pateiro, M., Gómez, B., Munekata, P. E. S., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B. ve Lorenzo, J. M. (2021). Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. *Molecules, 26*(6), 1547. https://doi.org/10.3390/molecules26061547

Patil, J., Girase, T., Patil, S. G., Suryawanshi, H. ve Patil, S. A. (2022). Conjugated polymeric liposomes: A hybrid carrier for contemporary drug delivery. *Chemistry Proceedings, 12*(1), 12. https://doi.org/10.3390/ecsoc-26-13640

Patil, S., Ujalambkar, V., Rathore, A., Rojatkar, S. ve Pokharkar, V. (2019). Galangin loaded galactosylated pluronic F68 polymeric micelles for liver targeting. *Biomedicine and Pharmacotherapy, 112,* 108691. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108691

Perez-Ruiz, A. G., Ganem, A., Olivares-Corichi, I. M. ve García-Sánchez, J. R. (2018). Lecithin-chitosan-TPGS nanoparticles as nanocarriers of (-)-epicatechin enhanced its anticancer activity in breast cancer cells. *RSC Advances, 8*(61), 34773-34782. https://doi.org/10.1039/c8ra06327c

Petrila, L. M., Bucatariu, F., Mihai, M. ve Teodosiu, C. (2021). Polyelectrolyte multilayers: An overview on fabrication, properties, and biomedical and environmental applications. *Materials, 14*(15). https://doi.org/10.3390/ma14154152

Phuong Hanh, N. ve Quoc Binh, N. (2014). Distribution of Alpinia (Zingiberaceae) and their use pattern in Vietnam. *Journal of Biodiversity ve Endangered Species, 2*(2), 121. https://doi.org/10.4172/2332-2543.1000121

Pirzadeh, M., Barary, M., Hosseini, S. M., Kazemi, S. ve Moghadamnia, A. A. (2021). Ameliorative effect of Alpinia officinarum Hance extract on nonylphenol-induced reproductive toxicity in male rats. *Andrologia, 53*(6), e14063. https://doi.org/10.1111/and.14063

Prasad, A. ve Kumari, S. (2022). Flavonoid: A mini review on Galangin. *Asian Journal of Chemistry, 34*(1), 18-24. https://doi.org/10.14233/ajchem.2022.23555

Qaddoori, M. H. ve Al-Shmgani, H. S. (2023). Galangin-Loaded gold nanoparticles: Molecular mechanisms of antiangiogenesis properties in breast cancer. *International Journal of Breast Cancer*, 2023. https://doi.org/10.1155/2023/3251211

Rampogu, S., Gajula, R. G. ve Lee, K. W. (2021). A comprehensive review on chemotherapeutic potential of galangin. *Biomedicine and Pharmacotherapy, 141,* 111808. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111808

Rao, B. N., Reddy, K. R., Mounika, B., Fathima, S. R. ve Tejaswini, A. (2019). Vesicular drug delivery system: A review. *International Journal of ChemTech Research, 12*(05), 39-53. https://doi.org/10.20902/ijctr.2019.120505

Rasmussen, M. K., Pedersen, J. N. ve Marie, R. (2020). Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nature Communications, 11*(1), 2337. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15889-3

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine, 26*(9–10), 1231–1237. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3

Refaat, H., Mady, F. M., Sarhan, H. A., Rateb, H. S. ve Alaaeldin, E. (2021). Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. *International Journal of Pharmaceutics, 592,* 120028. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120028

Reshna, K. R., Balakrishnan, P. ve Gopi, S. (2022). Systematic review on activity of liposomal encapsulated antioxidant, antibiotics, and antiviral agents. *Journal of Liposome Research, 32*(4), 340-353. https://doi.org/10.1080/08982104.2021.2024568

Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., Zhang, G., Lu, A. ve Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(1), 195. https://doi.org/10.3390/ijms19010195

Rommasi, F. ve Esfandiari, N. (2021). Liposomal nanomedicine: Applications for drug delivery in cancer therapy. *Nanoscale Research Letters, 16*(1), 95. https://doi.org/10.1186/s11671-021-03553-8

Rubaka, C., Gathirwa, J. W., Malebo, H. M., Swai, H., Sibuyi, N. R. S., Hilonga, A. ve Dube, A. (2023). Chitosan-coated liposomes of Carrisa spinarum extract: synthesis, analysis and anti-pneumococcal potency. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials, 12*(1), 12-23. https://doi.org/10.1680/jbibn.22.00046

Sabry, S., El Hakim Ramadan, A., Elghany, M., Okda, T. ve Hasan, A. (2021). Formulation, characterization, and evaluation of the anti-tumor activity of nanosized galangin loaded niosomes on chemically induced hepatocellular carcinoma in rats. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 61,* 102163. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102163

Saifullah, M., Shishir, M. R. I., Ferdowsi, R., Tanver Rahman, M. R. ve Van Vuong, Q. (2019). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science and Technology, 86*, 230-251. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030

Sakr, O. S., Jordan, O. ve Borchard, G. (2015). Novel Layer-by-Layer deposition technique for the preparation of double-chambered nanoparticle formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 104*(8), 2637-2640. https://doi.org/10.1002/jps.24507

Samarghandian, S., Hadjzadeh, M.-A.-R., Afshari, J. T. ve Hosseini, M. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptotic by ethanolic extract of Alpinia galanga rhizhome in human breast carcinoma cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 14*(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-192

Sant'Ana, L. D. O., Buarque Ferreira, A. B., Lorenzon, M. C. A., Berbara, R. L. L. ve Castro, R. N. (2014). Correlation of total phenolic and flavonoid contents of brazilian honeys with colour and antioxidant capacity. *International Journal of Food Properties, 17*(1), 65-76. https://doi.org/10.1080/10942912.2011.614368

Sarabia, L. A. ve Ortiz, M. C. (2009). Response Surface Methodology. *Comprehensive Chemometrics, 1,* 345-390.

Sawamura, R., Shimizu, T., Sun, Y., Yasukawa, K., Miura, M., Toriyama, M., Motohashi, S., Watanabe, W., Konno, K. ve Kurokawa, M. (2010). In vitro and in vivo anti-influenza virus activity of diarylheptanoids isolated from Alpinia officinarum. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 21*(1), 33-41. https://doi.org/10.3851/IMP1676

Sebaaly, C., Trifan, A., Sieniawska, E. ve Greige-Gerges, H. (2021). Chitosan-coating effect on the characteristics of liposomes: A focus on bioactive compounds and essential oils: A review. *Processes, 9*(3), 1-47. https://doi.org/10.3390/pr9030445

Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K. ve Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology, 6*, 286. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286

Sforzi, J., Palagi, L. ve Aime, S. (2020). Liposome-based bioassays. *Biology, 9*(8), 1- 28. https://doi.org/10.3390/biology9080202

Shin, D., Kinoshita, K., Koyama, K. ve Takahashi, K. (2002). Antiemetic principles of Alpinia officinarum. *Journal of Natural Products, 65*(9), 1315-1318. https://doi.org/10.1021/np020099i

Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X. ve Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science and Technology,* 78, 34-60. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018

Singh, M., Devi, S., Rana, V. S., Mishra, B. B., Kumar, J. ve Ahluwalia, V. (2019). Delivery of phytochemicals by liposome cargos: recent progress, challenges and opportunities. *Journal of Microencapsulation, 36*(3), 215-235. https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1617361

Singh N., Kushwaha P., Ahmad U. ve Abdullah M. (2019). Proliposomes: An approach for the development of stable liposome. *Ars Pharm, 60*(4), 231-240. http://dx.doi.org/10.30827/ars.v60i4.8517

Singhvi, G. ve Singh, M. (2012). Revıew: In-vıtro drug release characterızatıon models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, 2*(1), 77-84.

Singleton, V. L. ve Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16*(3), 144–147.

Solanki, D., Motiwale, M. ve Mahapatra, S. (2020). Study of drug release kinetics from sustained release matrix tablets of Acyclovir using natural polymer obtained from Colocasia Esculenta. *International Journal of PharmTech Research, 13*(3), 172-179. https://doi.org/10.20902/ijptr.2019.130306

Song, F., Chen, J., Zhang, Z. ve Tian, S. (2023). Preparation, characterization, and evaluation of flaxseed oil liposomes coated with chitosan and pea protein isolate hydrolysates. *Food Chemistry, 404*, 134547. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134547

Song, H. K., Park, S. H., Kim, H. J., Jang, S. ve Kim, T. (2021). Alpinia officinarum water extract inhibits the atopic dermatitis-like responses in NC/Nga mice by regulation of inflammatory chemokine production. *Biomedicine and Pharmacotherapy, 144.* https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112322

Sopyan, I., Insan Sunan, K. ve Gozali, D. (2020). A Review: A Novel of efforts to enhance liposome stability as drug delivery approach. *Systematic Reviews in Pharmacy, 11*(6), 555-562. https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.85

Srividya, A. R., Dhanabal, S. P., Misra, V. K. ve Suja, G. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of Alpinia officinarum. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 72*(1), 145. https://doi.org/10.4103%2F0250-474X.62233

Subramani, T. ve Ganapathyswamy, H. (2020). An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. *Journal of Food Science and Technology, 57*(10), 3545-3555. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04360-2

Subramanian, K., Selvakkumar, C., Vinaykumar, K. S., Goswami, N., Meenakshisundaram, S., Balakrishnan, A. ve Lakshmi, B. S. (2009). Tackling multiple antibiotic resistance in enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) clinical isolates: a diarylheptanoid from Alpinia officinarum shows promising antibacterial and immunomodulatory activity against EPEC and its lipopolysaccharide-induced inflammation. *International Journal of Antimicrobial Agents, 33*(3), 244-250. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.08.032

Suja, S. ve Chinnaswamy, P. (2008). Inhibition of in vitro cytotoxic effect evoked by Alpinia galanga and Alpinia officinarum on PC-3 cell line. *Ancient Science of Life, 27*(4), 33.

Şahin, S., Ari, F., Demir, C. ve Ulukaya, E. (2014). Isolation of major phenolic compounds from the extracts of Prunella L. species grown in Turkey and their antioxidant and cytotoxic activities. *Journal of Food Biochemistry*, *38*(2), 248-257. https://doi.org/10.1111/jfbc.12043

Şahin, S., Aybastier, Ö. ve Demir, C. (2016). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of quercetin and cyanidin from Pyracantha Coccinea and their scavenging effect on free radicals. *Journal of Food Biochemistry*, *40*(4), 472-479. https://doi.org/10.1111/jfbc.12236

Tan, C., Zhang, Y., Abbas, S., Feng, B., Zhang, X. ve Xia, S. (2014). Modulation of the carotenoid bioaccessibility through liposomal encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 123,* 692-700. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.011

Tao, L., Wang, Z. T., Zhu, E. Y., Lu, Y. H. ve Wei, D. Z. (2006). HPLC analysis of bioactive flavonoids from the rhizome of Alpinia officinarum. *South African Journal of Botany, 72*(1), 163-166. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.06.007

Tavares, L. ve Noreña, C. P. Z. (2020). Encapsulation of ginger essential oil using complex coacervation method: Coacervate formation, rheological property, and physicochemical characterization. *Food and Bioprocess Technology, 13*(8), 1405-1420. https://doi.org/10.1007/s11947-020-02480-3

Tomnikova, A., Orgonikova, A. ve Krizek, T. (2022). Liposomes: preparation and characterization with a special focus on the application of capillary electrophoresis. *Monatshefte fur Chemie, 153*(9), 687-695. https://doi.org/10.1007/s00706-022-02966-0

Tomsen-Melero, J., Merlo-Mas, J., Carreño, A., Sala, S., Córdoba, A. veciana, J., González-Mira, E. ve Ventosa, N. (2022). Liposomal formulations for treating lysosomal storage disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews, 190*, 114531. https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114531

Tongchure, S. ve Chanprapai, P. (2022). Antifungal properties of essential oils derived from three plants of Zingiberaceae family against Phytophthora parasitica Dastur. *10*(1), 29. https://doi.org/10.3390/iocag2022-12324

Trucillo, P. (2022). Drug Carriers: A Review on the most used mathematical models for drug release. *Processes, 10*(6). https://doi.org/10.3390/pr10061094

Trucillo, P., Campardelli, R. ve Reverchon, E. (2020). Liposomes: From bangham to supercritical fluids. *Processes, 8*(9). https://doi.org/10.3390/pr8091022

Tuli, H. S., Sak, K., Adhikary, S., Kaur, G., Aggarwal, D., Kaur, J., Kumar, M., Parashar, N. C., Parashar, G., Sharma, U. ve Jain, A. (2022). Galangin: A metabolite that suppresses anti-neoplastic activities through modulation of oncogenic targets. *Experimental Biology and Medicine, 247*(4), 345-359. https://doi.org/10.1177/15353702211062510

Wang, C., Chao, I., Qin, Y., Zhang, W., Zhao, J., Zhang, Q. ve Li, S. (2022). Comparison for quantification of eight components in Alpinia officinarum Hance by using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and charged aerosol detector with individual and substitute reference compound. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 210. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114545

Wang, D. Y., van der Mei, H. C., Ren, Y., Busscher, H. J. ve Shi, L. (2020). Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Chemistry,* 7, 871. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00872

Wang, J., Gong, J. ve Wei, Z. (2022). Strategies for liposome drug delivery systems to improve tumor treatment efficacy. AAPS *PharmSciTech,* 23, 1-14. https://doi.org/10.1208/s12249-021-02179-4

Wang, L., Xue, J., Wei, F., Zheng, G., Cheng, M. ve Liu, S. (2021). Chemopreventive effect of galangin against benzo(a)pyrene-induced stomach tumorigenesis through modulating aryl hydrocarbon receptor in Swiss albino mice. *Human and Experimental Toxicology, 40*(9), 1434-1444. https://doi.org/10.1177/0960327121997979

Wang Y. (2021). Liposome as a delivery system for the treatment of biofilm-mediated infections. *Journal of Applied Microbiology, 131*(6), 2626-2639. https://doi.org/10.1111/jam.15053

Wen, M. M., Farid, R. M. ve Kassem, A. A. (2014). Nano-proniosomes enhancing the transdermal delivery of mefenamic acid. *Journal of Liposome Research, 24*(4), 280-289. https://doi.org/10.3109/08982104.2014.911313

Wen, T., Wang, X.-K., Liu, C. ve Liu, H. (2016). Two Anti-inflammatory diterpenes from the rhizomes of Alpinia officinarum Hance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 6*(8). https://doi.org/10.20936/jpbms/160275

Wilson, L. (2015). Spices and Flavoring crops: Tubers and roots. Encyclopedia of Food and Health, 93-97. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00781-9

Witika, B. A., Makoni, P. A., Matafwali, S. K., Chabalenge, B., Mwila, C., Kalungia, A. C., Nkanga, C. I., Bapolisi, A. M. ve Walker, R. B. (2020). Biocompatibility of biomaterials for nanoencapsulation: Current approaches. *Nanomaterials, 10*(9), 16, 1-40. https://doi.org/10.3390/nano10091649

Witika, B. A., Makoni, P. A., Matafwali, S. K., Mweetwa, L. L., Shandele, G. C. ve Walker, R. B. (2021). Enhancement of biological and pharmacological properties of an encapsulated polyphenol: Curcumin. *Molecules, 26*(14), 4244. https://doi.org/10.3390/molecules26144244

Xavier, T. F. ve Agatheeswaran, S. (2010). Antibacterial effects of leaf extract of Alpinia officinarum. *Journal of Tropical Medicinal Plants*, *11*(2).

Xia, D. Z., Yu, X. F., Wang, H. M., Ren, Q. Y. ve Chen, B. M. (2010). Anti-Obesity and hypolipidemic effects of ethanolic extract from Alpinia officinarum Hance (Zingiberaceae) in rats fed high-fat diet. *Journal of Medicinal Food*, *13*(4), 785-791. https://doi.org/10.1089/jmf.2009.1235

Xian, J., Zhong, X., Gu, H., Wang, X., Li, J., Li, J., Wu, Y., Zhang, C. ve Zhang, J. (2021). Colonic delivery of celastrol-loaded layer-by-layer liposomes with pectin/trimethylated chitosan coating to enhance its anti-ulcerative colitis effects. *Pharmaceutics, 13*(12), 2005. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122005

Xiong, Y., Guo, D., Wang, L., Zheng, X., Zhang, Y. ve Chen, J. (2009). Development of nobiliside A loaded liposomal formulation using response surface methodology. *International Journal of Pharmaceutics, 371*(1-2), 197-203. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.031

Xiong, Y., Wu, B., Guo, X., Shi, D., Xia, H., Xu, H. ve Liu, X. (2023). Galangin delivered by retinoic acid-modified nanoparticles targeted hepatic stellate cells for the treatment of hepatic fibrosis. *RSC Advances, 13*(16), 10987-11001. https://doi.org/10.1039/d2ra07561j

Yakufu, M., Hailiwu, R., Cong, Y., Habaike, A., Wang, X. ve Abulizi, P. (2021). Antitumor activity of flavonoids from Alpinia officinarum hance on gastric cancer. *European Journal of Inflammation, 19*. https://doi.org/10.1177/20587392211051119

Yao, H., Lu, H., Zhang, J., Xue, X., Yin, C., Hu, J., Zou, R., Wang, L. ve Xu, H. (2019). Preparation of prolonged-circulating galangin-loaded liposomes and evaluation of antitumor efficacy in vitro and pharmacokinetics in vivo. *Journal of Nanomaterials, 2019.* https://doi.org/10.1155/2019/7236895

Yasukawa, K., Sun, Y., Kitanaka, S., Tomizawa, N., Miura, M. ve Motohashi, S. (2008). Inhibitory effect of the rhizomes of Alpinia officinarum on TPA-induced inflammation and tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin.

Journal of Natural Medicines, *62*(3), 374-378. https://doi.org/10.1007/s11418-008-0243-2

Ye, W., Sun, W., Chen, R., Wang, Z., Cui, X., Zhang, H., Qian, S., Zheng, Q., Zhou, Y., Wan, J., Xu, J., Wang, X. ve Zhou, Y. (2019). Pharmacokinetics in rat plasma and tissue distribution in mice of galangin determined by UHPLC-MS/MS. *Acta Chromatographica*, *31*(2), 120-125. https://doi.org/10.1556/1326.2017.00389

Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J. S., Best, I. ve Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. *Polymers, 14*(19), 4194. https://doi.org/10.3390/polym14194194

Zhang, B. B., Dai, Y., Liao, Z. X. ve Ding, L. S. (2010). Three new antibacterial active diarylheptanoids from Alpinia officinarum. *Fitoterapia*, *81*(7), 948-952. https://doi.org/10.1016/j.tote.2010.06.015

Zhang, H., Liang-Xiong, X. U., Wu, P. ve Wei, X. Y. (2014). Flavonoids from the aerial parts of Alpinia officinarum. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, *22*(1), 89-92. https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-3395.2014.01.014

Zhang, J. Q., Wang, Y., Li, H. L., Wen, Q., Yin, H., Zeng, N. K., Lai, W. Y., Wei, N., Cheng, S. Q., Kang, S. L., Chen, F. ve Li, Y. B. (2015). Simultaneous quantification of seventeen bioactive components in rhizome and aerial parts of Alpinia officinarum Hance using LC-MS/MS. *Analytical Methods*, *7*(12), 4919- 4926. https://doi.org/10.1039/c5ay00647c

Zhang, L., Khoo, C., Rao Koyyal, S., de Pedro, N. ve Reddy, N. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of ethanol soluble organics from water extracts of selected medicinal herbs and their relation with flavonoid and phenolic contents. *Pharmacologia, 8*(2), 59-72. https://doi.org/10.5567/pharmacologia.2017.59.72

Zhang, T., Su, M., Jiang, X., Xue, Y., Zhang, J., Zeng, X., Wu, Z., Guo, Y. ve Pan, D. (2019). Transepithelial transport route and liposome encapsulation of milk-derived ACE-Inhibitory peptide Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(19), 5544-5551. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00397

Zhou, Y.Q., Liu, H., He, M.X., Wang, R., Zeng, Q.Q., Wang, Y., Ye, W.C. ve Zhang, Q.W. (2018). A review of the botany, phytochemical, and pharmacological properties of galangal. *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*, 351-396. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811518-3.00011-9

Zhu, J., Wang, Q., Li, H., Zhang, H., Zhu, Y., Omari-Siaw, E., Sun, C., Wei, Q., Deng, W., Yu, J. ve Xu, X. (2018). Galangin-loaded, liver targeting liposomes: Optimization and hepatoprotective efficacy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *46*, 339-347. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.034

Zhu, J., Wang, Q., Zhu, Y., Adu-Frimpong, M., Li, H., Omari-Siaw, E., Jin, X., Yang, Q., Deng, W., Xu, X. ve Yu, J. (2018). Enhanced oral bioavailability and in vivo hypouricemic activity of galangin via polymeric micelles. *Latin American Journal of Pharmacy, 37*(9), 1818-1827.