BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATRICARIA RECUTITA L. (ALMAN PAPATYASI) BİTKİSİNİN ÇİÇEKLERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE FİTOFARMASÖTİK ÜRÜNLERİN GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Mahmut ÇİÇEK

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KARTAL

EKİM 2024

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATRICARIA RECUTITA L. (ALMAN PAPATYASI) BİTKİSİNİN ÇİÇEKLERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE FİTOFARMASÖTİK ÜRÜNLERİN GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Mahmut ÇİÇEK
205312002

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KARTAL

EKİM 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 205312002 numaralı Doktora Öğrencisi Mahmut ÇİÇEK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "*MATRICARIA RECUTITA* L. (ALMAN PAPATYASI) BİTKİSİNİN ÇİÇEKLERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE FİTOFARMASÖTİK ÜRÜNLERİN GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Murat KARTAL** .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU** .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Aydan DAĞ .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY .....
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Çağla KIZILARSLAN HANÇER .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Tuba KUŞMAN SAYĞI .....
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Teslim Tarihi : 14 Ekim 2024
Savunma Tarihi : 03 Ekim 2024

Canım aileme;

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince benden hiçbir desteğini esirgemeyen, karşılaştığım her zorlukta bana destek olan, engin bilgi ve tecrübesi ile doğal ürünlerin muazzam dünyasını bizlere içtenlikle yaşatan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Murat KARTAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hem ders hem de tez süresince iyi niyet ve içtenlikle bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya desteği için çok teşekkür ederim.

Değerli görüşleri ile araştırmamın şekillenmesini sağlayan ve çalışmalarda verdikleri desteklerden dolayı saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Aydan DAĞ ve Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan, çok verimli ve keyifli bir çalışma ortamınının oluşmasına katkı sağlayan Hatice AKBAL İNAN, Mustafa SARAÇ, Fulya ÖZBAYRAK ve Büşra BAYRAK'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmaları sırasında verdiği desteklerden dolayı Neriman AYDİLEK ve Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ÇAĞMAN'a çok teşekkür ederim.

Bitkilerin yetiştirilmesindeki desteklerinden dolayı Ecem SERİM'e çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Şeyma ULUSOY ve Arş. Gör. Ebrar İNAL'a çok teşekkür ederim.

Eğitimim süresince sabır ve sevgiyle desteklerini hiç esirgemeyen, kendilerine büyük bir zaman borçlu olduğum canım aileme, her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekim 2024 Mahmut ÇİÇEK

Yüksek Kimyager

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Mahmut ÇİÇEK

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **iv**
BEYAN ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
KISALTMALAR ..... **ix**
SEMBOLLER ..... **xi**
TABLO LİSTESİ ..... **xii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. *Matricaria recutita* TÜRÜNE AİT BOTANİK BİLGİLER **4**
2.1 *Matricaria recutita* Türünün Sistematikteki Yeri 4
2.2 Asteraceae Familyasının Özellikleri 5
2.3 *Matricaria* Cinsi 5
2.4 *Matricaria recutita* Türünün Özellikleri ve Yayılışı 5
3. GENEL BİLGİLER **9**
3.1 *Matricaria recutita*'nın Besin Değeri ve Fitokimyasal İçeriği 9
3.1.1 Vitaminler 10
3.1.2 Karbonhidratlar 10
3.1.3 Proteinler ve aminoasitler 10
3.1.4 Mineraller 10
3.1.5 Uçucu Yağ 11
3.1.6 Polifenoller 12
3.1.7 Organik Asitler 14
4. *Matricaria recutita* TÜRÜNÜN KULLANIM ALANLARI ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ **15**
4.1 *Matricaria recutita* Türünün Kullanım Alanları 15
4.2 Antienflamatuvar Aktivite 17
4.3 Antispazmodik Aktivite 18
4.4 Anksiyolitik Aktivite 19
4.5 Yara İyileştirici Aktivite 20
4.6 Antimikrobiyal Aktivite 21
4.7 Diğer aktiviteler 22
5. GEREÇ ve YÖNTEM **24**
5.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler 24
5.2 Bitki Materyallerinin Tanımlanması 25
5.3 Uçucu Yağ Eldesi ve Verimi 25
5.4 Uçucu Yağ Bileşiklerinin GC-FID/MS ile Analizi 25
5.5 Bitki Materyallerinin Nem Tayini 26

5.6 Bitki Materyallerinin A7G İçeriğinin Analizi 26
5.7 Ekstrelerin Hazırlanması 27
5.8 *Matricaria recutita* L. Çiçek Ekstrelerindeki A7G Miktarının HPLC-PDA Yöntemi ile Belirlenmesi ve Validasyon Çalışmaları 31
5.8.1 Numune hazırlanması 31
5.8.2 Kromatografik koşullar 31
5.8.3 Seçicilik 32
5.8.4 Kalibrasyon eğrisi ve doğrusallık 32
5.8.5 Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) 32
5.8.6 Doğruluk ve geri kazanım 33
5.8.7 Sağlamlık 33
5.8.8 Kesinlik 33
5.9 Ekstrelere Ait Stabilite Çalışmaları 33
5.10 Total Fenolik Madde Miktar Tayini Yöntemi 33
5.11 Total Flavonoit Madde Miktar Tayini Yöntemi 34
5.12 Ekstrelerin Sıvı Kromatografisi ve Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrometresi (LC-HRMS) ile Fenolik Bileşen Tayini Yöntemi 34
5.13 Topikal Ürünlerin Formülasyonu 35
5.13.1 M ekstresini içeren topikal krem formülasyonunun hazırlanması 35
5.13.2 N ekstresini içeren topikal krem formülasyonunun hazırlanması 37
5.14 Topikal Ürünlerin Fiziko-Kimyasal Karakterizasyonu ve Stabilitesi 38
5.14.1 Görünüş ve pH 38
5.14.2 A7G içeriğinin belirlenmesi 38
5.14.3 Reolojik ölçümler 39
5.15 Referans ve Test Ürünlerin *In-Vitro* Salım Profillerinin Karşılaştırması 39
5.16 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları 40
5.16.1 Hücre kültürünün hazırlanması 40
5.16.2 Hücre canlılığı analizi 40
5.16.3 Apoptoz analizi 41
6. BULGULAR ve TARTIŞMA 42
6.1 Uçucu Yağ Eldesi ve Verimi 42
6.2 Uçucu Yağ Bileşiklerinin GC-FID/MS ile Analizi 42
6.3 Bitki Materyallerinin Nem Tayini Analizi Bulguları 45
6.4 Bitki Materyallerinin A7G Analizi Bulguları 45
6.5 *Matricaria Recutita* L. Çiçek Ekstrelerinin A7G İçeriklerinin Analizine Ait Bulgular 47
6.6 HPLC-PDA Yönteminin Validasyon Çalışmaları Bulguları 50
6.6.1 Seçicilik 51
6.6.2 Kalibrasyon eğrisi ve doğrusallık 51
6.6.3 Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) 53
6.6.4 Doğruluk ve geri kazanım 53
6.6.5 Sağlamlık 54
6.6.6 Kesinlik 55
6.7 Ekstrelerin Stabilite Çalışmaları Bulguları 55
6.8 Ekstrelerin Spektrofotometrik Yöntemle Tayin Edilen Total Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarları 57
6.9 Ekstrelerin LC-HRMS Bulguları 60
6.10 Formüle Edilen Topikal Ürünlerin Fiziko-Kimyasal Karakterizasyonu ve Stabilitesine Ait Bulgular 63

6.10.1 M ekstresini içeren topikal ürünün fiziko-kimyasal karakterizasyonu ve stabilitesine ait bulgular 63
6.10.2 N ekstresini içeren topikal ürünün fiziko-kimyasal karakterizasyonu ve stabilitesine ait bulgular 65
6.11 Referans ve Test Ürünlerin *In-Vitro* Salım Profillerinin Karşılaştırılmasına Ait Bulgular 68
6.11.1 M1 krem ve Kamillosan® kremin *in-vitro* salım profillerinin karşılaştırılmasına ait bulgular 68
6.11.2 N1 krem ve Kamillosan Salbe® merhemin in-vitro salım profillerinin karşılaştırmasına ait bulgular 70
6.12 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları 72
6.12.1 Sitotoksisite çalışmalarına ait bulgular 72
6.12.2 Apoptoz analizine ait bulgular 74
7. SONUÇ ve ÖNERİLER 75
KAYNAKLAR 81
ÖZGEÇMİŞ 91

KISALTMALAR

Abs	:	Absorbans
AR	:	Arnavutköy
A7G	:	Apigenin-7-O-Glikozit
BN1	:	Bandırma (1.yıl)
BN2	:	Bandırma (2.yıl)
cAMP	:	Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
DER	:	Bitki-Ekstre Oranı
DMEM	:	Dulbecco'nun Modifiye Kültür Ortamı
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
EMA	:	Avrupa İlaç Ajansı
EP	:	Avrupa Farmakopesi
ESI	:	Elektrosprey İyonizasyon
FBS	:	Fetal Bovin Serum
FCR	:	Folin–Ciocâlteu Reaktifi
FID	:	Alev İyonlaşma Dedektörü
GC	:	Gaz Kromatografisi
HPLC	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTFE	:	Hidrofilik Politetrafloroetilen
ICH	:	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
IC_{50}	:	%50 İnhibisyon Değeri
İLMER	:	Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi
IL-10	:	İnterlökin 10
LC-HRMS	:	Sıvı Kromatografisi ve Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrometresi
LD	:	Öldürücü Doz
LOD	:	Tespit sınırı
LOQ	:	Tayin sınırı
LPS	:	Lipopolisakkarit
MD	:	Mevcut Değil
MİK	:	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MÖ	:	Milattan Önce
MS	:	Kütle Spektrometresi
MSD	:	Kütle Seçici Dedektör
MTT	:	3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür
PBS	:	Fosfat Tamponlu Salin
PDA	:	Fotodiyot Dizisi Dedektör
PDE	:	Fosfodiesteraz
PI	:	Propidium İyodür
RC	:	Rejenere Selüloz

RH	:	Bağıl Nem
RRI	:	Relatif Alıkonma İndisi
RSD	:	Bağıl Standart Sapma
S/G	:	Sinyal/Gürültü Oranı
SD	:	Standart Sapma
Th	:	T Yardımcı Lenfosit
TNF-α	:	Tümör Nekrozis Faktör-α
UV-VIS	:	Ultraviyole - Görünür Işık Bölgesi
WOMAC	:	Western Ontario ve McMaster Üniversiteleri Osteoartrit İndeksi
a	:	Ağırlık
amu	:	Atomik Kütle Birimi
cm^2	:	Santimetrekare
dk	:	Dakika
h	:	Hacim
kg	:	Kilogram
kV	:	Kilovolt
mAU	:	Miliabsorbans Unit
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
m/z	:	Kütle/yük oranı
nm	:	Nanometre
Pas	:	Pascalsaniye
r^2	:	Regresyon Değeri
rpm	:	Dakikadaki Devir Sayısı
sn	:	Saniye
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre

SEMBOLLER

α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gama
η	:	Eta
%	:	Yüzde
®	:	Referans
˚C	:	Santigrat derece
k	:	Salım Hız Sabiti
n	:	Numune Sayısı
p	:	Para pozisyonu
µ	:	Mikro

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: *M. recutita*'nın taksonomik hiyerarşisi. 6
Tablo 3.1: *M. recutita* besin içeriği. 9
Tablo 5.1: *M. recutita* çiçek ekstreleri. 28
Tablo 5.2: M ekstresi içeren topikal kremin birim formülü. 36
Tablo 5.3: N ekstresi içeren topikal kremin birim formülü. 37
Tablo 6.1: Örneklerin uçucu yağ verimleri. 42
Tablo 6.2: *M. recutita* çiçek uçucu yağların kimyasal bileşimleri. 43
Tablo 6.3: Bitki materyallerinin nem içerikleri. 45
Tablo 6.4: Bitki materyallerinin A7G içerikleri. 46
Tablo 6.5: *M. recutita* çiçek ekstrelerinin endikasyonları ve uygulama yolları. 48
Tablo 6.6: *M. recutita* çiçek ekstrelerinin A7G içerikleri. 49
Tablo 6.7: Farklı bölgelerden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin A7G içerikleri. . 50
Tablo 6.8: A7G standardlarının konsantrasyon ve alanları. 53
Tablo 6.9: Gerikazanım çalışması bulguları. 54
Tablo 6.10: Sağlamlık çalışması bulguları. 54
Tablo 6.11: Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışması bulguları. 55
Tablo 6.12: Ekstrelerin toplam fenolik miktarları. 58
Tablo 6.13: Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları. 59
Tablo 6.14: LC-HRMS bulgularına göre G, M, N ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin miktarları. 61
Tablo 6.15: M1 kremin başlangıç ve stabilite analizlerine ait bulgular 64
Tablo 6.16: Kamillosan® krem ve M1 kremin üç farklı kayma hızındaki viskozitelerine ait bulgular. 65
Tablo 6.17: N1 kremin başlangıç ve stabilite analizlerine ait bulgular. 66
Tablo 6.18: Kamillosan Salbe® merhem ve N1 kremin üç farklı kayma hızındaki viskozitelerine ait bulgular. 67
Tablo 6.19: Kamillosan® Krem ve M1 kremden salınan A7G'nin kümülatif miktarları.. 69
Tablo 6.20: Kamillosan Salbe® merhem ve N1 kremden salınan A7G'nin kümülatif miktarları. 70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: *M. recutita* türünün çiçek tablası görünümü. 4
Şekil 2.2: *M. recutita* türünün morfolojik yapısı. 6
Şekil 2.3: *M. recutita* türünün Türkiye'deki yayılışı. 7
Şekil 2.4: *M. recutita* türünün dünya üzerindeki yayılışı. 8
Şekil 3.1: β-Farnesen. 11
Şekil 3.2: Farnesol. 11
Şekil 3.3: α-bisabolol. 11
Şekil 3.4: Bisabolol oksit A. 11
Şekil 3.5: Bisabolol oksit B. 12
Şekil 3.6: Kamazulen. 12
Şekil 3.7: Apigenin. 12
Şekil 3.8: A7G. 13
Şekil 3.9: Luteolin. 13
Şekil 3.10: Luteolin-7-O-glikozit. 13
Şekil 3.11: Kuersetin. 13
Şekil 3.12: Rutin. 14
Şekil 3.13: Naringenin. 14
Şekil 6.1: Uçucu yağ kromatogramı (Bandırma, 1.yıl). 44
Şekil 6.2: Uçucu yağ kromatogramı (Bandırma, 2.yıl). 44
Şekil 6.3: Uçucu yağ kromatogramı (Arnavutköy). 44
Şekil 6.4: Hazırlanan ekstrelerin görselleri. 47
Şekil 6.5: G, M ve N ekstrelerine ait HPLC kromatogramı. 51
Şekil 6.6: A7G standardının kalibrasyon eğrisi. 52
Şekil 6.7: Farklı sıcaklıklar altında G ekstresinin A7G içeriğinin stabilitesi. 56
Şekil 6.8: Farklı sıcaklıklar altında M ekstresinin A7G içeriğinin stabilitesi. 56
Şekil 6.9: Farklı sıcaklıklar altında N ekstresinin A7G içeriğinin stabilitesi. 57
Şekil 6.10: Gallik asidin UV-VIS mikroplaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi. 58
Şekil 6.11: Kuersetinin UV-VIS mikroplaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi. 59
Şekil 6.12: Kamillosan® krem ve M1 kreme ait görseller 63
Şekil 6.13: M ekstresini içeren kremin (M1) viskozite profili. 64
Şekil 6.14: Kamillosan Salbe® ve N1 kreme ait görseller 66
Şekil 6.15: N ekstresini içeren kremin (N1) viskozite profili. 67
Şekil 6.16: M1 Krem ve Kamillosan® kremin salım profilleri.. 69
Şekil 6.17: M1 Krem ve Kamillosan® kremin salım hızı sabitleri.. 70
Şekil 6.18: N1 krem ve Kamillosan Salbe® merhemin salım profilleri 71
Şekil 6.19: N1 krem ve Kamillosan Salbe® merhemin salım hızı sabitleri 71
Şekil 6.20: Örneklerin CCD-1079Sk ve SK-MEL-28 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik muamelesi sonra canlılığı. 73

Şekil 6.21: Örneklerin 24 ve 48 saatlik muamelesi sonrası CCD-1079Sk ve SK-MEL-28 hücrelerindeki apoptoz analizi... 74

MATRICARIA RECUTITA L. (ALMAN PAPATYASI) BİTKİSİNİN ÇİÇEKLERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE FİTOFARMASÖTİK ÜRÜNLERİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Matricaria recutita L. bitkisi Asteraceae familyasından olup ülkemizde Alman papatyası, mayıs papatyası ve tıbbi papatya olarak isimlendirilmektedir. Ülkemizde Marmara, Ege, Trakya, Güneybatı Anadolu'da doğal koşullarda yetişir ve yol kenarlarında, boş tarlalarda bol miktarda bulunur. Ayrıca, Marmara ve Ege bölgelerinde kültürü yapılmaktadır. *Matricaria recutita*'nın çiçek kısımları başta antienflamatuvar olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahiptir.

Matricaria recutita bitkisini içeren fitofarmasötik ürünler ülkemizde yok denecek kadar az ve mevcut ürünlerde bulunan ekstrelerin kalite kontrol analizleri gerçekleştirilmeden tüketicinin kullanımına sunulmaktadır. Bu nedenle, bitkinin çiçeklerinin gıda, kozmetik ve ilaç sanayiinde değerlendirilmesi, ülke ekonomisine kazandırılması ve ürüne dönüştürülmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Avrupa İlaç Ajansı monografına göre standardize *Matricaria recutita* ekstrelerinin hazırlanması ve etken madde olarak kullanılması, ekstrelerin apigenin-7-O-glikozit içeriklerinin HPLC yöntemi ile belirlenmesi ve geliştirilen yöntemin valide edilmesi, bu ekstreler kullanılarak güvenli, etkili ve kaliteli fitofarmasötik ürünlerin formüle edilmesi hedeflenmektedir.

Matricaria recutita'nın sahip olduğu tıbbi etkiler içerdiği fenolik bileşikler ile ilgilidir. Apigenin, *Matricaria recutita* 'da bulunan ana flavonoit bileşiktir. Bu bileşiğin önemli bir miktarı glikozit formunda bulunurken, yalnızca küçük bir miktarı serbestçe bulunmaktadır. Bu nedenle apigenin-7-O-glikozit bileşiği *Matricaria recutita* L. çiçek ekstreleri için kullanışlı ve uygun bir belirteç olarak kabul edilmektedir.

Avrupa İlaç Ajansı monografında yer alan 14 farklı çözücü sistemi kullanılarak, Bandırma/Balıkesir bölgesinde yetiştirilen *Matricaria recutita* çiçek kısımları ile ekstreler hazırlanmış ve ekstrelerin apigenin-7-O-glikozit içerikleri HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Hazırlanan likit ve katı ekstrelerin endikasyon, uygulama yolu ve apigenin-7-O-glikozit içerikleri değerlendirilmiştir ve G, M, N ekstreleri seçilerek bu ekstreler üzerinden analitik metot validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca G, M, N ekstrelerinin farklı sıcaklıklar altındaki stabiliteleri takip edilmiş ve artan sıcaklıkla apigenin-7-O-glikozit içeriğinin düştüğü gözlemlenmiştir. Geliştirilen ve valide edilen HPLC yönteminin, *Matricaria recutita* ekstrelerinin kalite kontrolünde kullanılması öngörülmektedir.

Sonraki yıl Bandırma/Balıkesir ve Arnavutköy/İstanbul bölgelerinde yetiştirilen *Matricaria recutita* çiçek kısımlarından da G, M, N ekstreleri hazırlanmıştır. İki bölgeden toplanan bitkiden elde edilen G, M, N ekstrelerinin apigenin-7-O-glikozit içerikleri, toplam fenolik ve toplam flavonoit içerikleri, fitokimyasal içerikleri analiz edilmiştir. Ayrıca, bitki materyallerinin apigenin-7-O-glikozit içerikleri, uçucu yağ miktarı ve bileşenleri analiz edilmiştir. Arnavutköy/İstanbul bölgesinde yetiştirilen bitkiden elde edilen ekstrenin apigenin-7-O-glikozit, toplam fenolik ve toplam

flavonoit içeriklerinin daha yüksek olması nedeniyle, bu bölgeden toplanan bitkiden hazırlanan M ve N ekstreleri kullanılarak iki farklı topikal ürün formüle edilmiştir. G ekstresi doğrudan ekstre formunda uygulama yoluna sahiptir.

Topikal ürünler, piyasada bulunan referans ürünlerin apigenin-7-O-glikozit içeriklerine eşdeğer olarak formüle edilmiş, referans ürünler ile *in vitro* salım ve fiziko-kimyasal profilleri karşılaştırılmıştır. 6. saat sonunda topikal ürünler referans ürünlerden biraz daha hızlı *in vitro* salım göstermekle birlikte, neredeyse benzer bir *in vitro* salım ve fiziko-kimyasal profil sergilemişlerdir. Topikal ürünlerin farklı sıcaklıklar altında stabiliteleri takip edilmiştir. Ayrıca, M ekstrelerinin ve M ekstresini içeren topikal kremin (M1) hücre canlılığı profili ve apoptotik etkisi, fibroblast (CCD-1079Sk) ve melanom (SK-MEL-28) hücre kültürleri üzerinde değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, topikal formülasyonların *in vitro* salım ve fizikokimyasal özellikleri göz önüne alındığında etkili, güvenilir ve kaliteli fitofarmasötik ürünler olarak sunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Matricaria recutita* L., apigenin-7-O-glikozit, topikal ürün, metot validasyonu, tıbbi papatya

PREPARATION OF STANDARDIZED EXTRACTS FROM FLOWERS OF *MATRICARIA RECUTITA* L. (GERMAN CHAMOMILE) PLANT AND DEVELOPMENT OF PHYTOPHARMACEUTICAL PRODUCTS

SUMMARY

Matricaria recutita L. plant is from the Asteraceae family, and is called German chamomile, may chamomile, and medicinal chamomile in our country. In our country, it grows under natural conditions in Marmara, Aegean, Thrace and Southwestern Anatolia, and is found abundantly on roadsides and empty fields. Additionally, it is cultivated in the Marmara and Aegean regions. The flower parts of *Matricaria recutita* have various biological effects, especially anti-inflammatory.

Phytopharmaceutical products containing the *Matricaria recutita* plant are almost non-existent in our country, and are presented to consumers without quality control analyzes of the extracts contained in the existing products. For this reason, it is of great importance to utilize the flowers of the plant in the food, cosmetics and pharmaceutical industries, to bring them into the country's economy and to turn them into products. In this study, it is aimed to prepare standardized *Matricaria recutita* extracts according to the European Medicines Agency monograph, and its use as an active ingredient, to determine the apigenin-7-O-glucoside contents of the extracts by HPLC method, and to validate the developed method, and to formulate reliable, effective and high-quality phytopharmaceutical products using these extracts.

The medicinal effects of *Matricaria recutita* are related to the phenolic compounds it contains. Apigenin is the main flavonoid compound found in *Matricaria recutita* While a significant amount of this compound exists in glucoside form, only a small amount is freely available. Therefore, apigenin-7-O-glucoside compound is considered a useful and suitable marker for *Matricaria recutita* flower extracts.

Using 14 different solvent systems included in the European Medicines Agency monograph, extracts were prepared with the flower parts of *Matricaria recutita* grown in Bandırma/Balıkesir region, and the apigenin-7-O-glucoside contents of the extracts were analyzed by HPLC method. The indication, administration route and apigenin-7-O-glucoside contents of the prepared liquid and solid extracts were evaluated, and analytical method validations were carried out on these extracts by selecting G, M, N extracts. In addition, the stabilities of G, M, N extracts under different temperatures were followed, and it was observed that apigenin-7-O-glucoside content decreased with increasing temperature. The developed and validated HPLC method is envisaged to be used in the quality control of *Matricaria recutita* extracts.

The following year, G, M, N extracts were prepared from the flower parts of *Matricaria recutita* grown in Bandırma/Balıkesir and Arnavutköy/İstanbul regions. Apigenin-7-O-glucoside contents, total phenolic and total flavonoid contents, and phytochemical contents of G, M, N extracts prepared from plants collected from two regions were analyzed. In addition, apigenin-7-O-glucoside contents, essential oil amount and components of the plant materials were analysed. Since apigenin-7-O-glucoside, total phenolic and total flavonoid contents of the extract prepared from the

plant grown in Arnavutköy/İstanbul region were higher, two different topical products were formulated using M and N extracts prepared from the plant collected from this region. G extract has a direct administration route.

Topical products were formulated to have apigenin-7-O-glucoside contents equivalent to commercially available reference products, and their *in vitro* release and physicochemical profiles were compared with reference products. At the end of the 6th hour, topical products showed slightly faster *in vitro* release than reference products, but they had almost similar *in vitro* release and physicochemical profiles. The stability of topical products under different temperatures was monitored. In addition, the cell viability profile and apoptotic effect of M extracts and topical cream containing M extract (M1) were evaluated on fibroblast (CCD-1079Sk) and melanoma (SK-MEL-28) cell cultures.

As a result, considering the *in vitro* release and physicochemical properties of topical formulations, these products are presented as effective, reliable and high-quality phytopharmaceutical products.

Key Words: *Matricaria recutita* L., apigenin-7-O-glucoside, topical product, method validation, medicinal chamomile

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Doğa her zaman bir arada yaşamanın öne çıkan olgularını gösteren altın bir işarettir. Bitkilerden, hayvanlardan ve minerallerden elde edilen doğal ürünler, insan hastalıklarının tedavisinin temelini oluşturur. 1957-1961 yılları arasında Kuzey Irak'taki Şanidar Mağarası'nda gerçekleştirilen kazılarda ortaya çıkarılan Neandertal insan kalıntılarının yanı sıra mezarda bulunan nesneler, bitki-insan ilişkisinin başlangıcına dair ilk kanıt olarak kabul edilmektedir. 60 bin yıl öncesine tarihlenen ve bir şamana ait olduğu düşünülen bu mezarda, kanarya otu, civanperçemi, gül hatmi, mor sümbül, efedra ve peygamber çiçeği gibi çeşitli bitki türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir [1-3].

Tarih boyunca insanlar, beslenme, barınma, ısınma, yaraları iyileştirme ve hastalıkları tedavi etme amacıyla bitkilerden faydalanmışlardır. MÖ 5000'li yıllarda, tedavi amaçlı kullanılan 250 bitki türünün varlığı tespit edilmiştir. Hititler, Mısırlılar, Sümerler, Asurlular ve Mezopotamyalılar uzun yıllar boyunca bitkisel tedavi yöntemlerini kullanmışlardır. Ancak, zamanla ilaçların endüstriyel üretimine başlanması, tıbbi aromatik bitki kullanımının azalmasına neden olmuştur. 1900'lü yıllardan sonra, sentetik ilaçların yan etkilerinin keşfedilmesi ve yiyecek ile içeceklerdeki sentetik maddelerin insan sağlığına zararlarının anlaşılmasıyla birlikte doğal ürünlere olan talep artmıştır [1-3].

Dünya genelinde popüler olan tıbbi bitki sayısının 4.000-6.000 arasında olduğu, ticareti yapılan tür sayısının ise 3.000 civarında olduğu belirtilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, günümüzde kullanılan farmasötik ilaçların %25'i tıbbi bitkilerden elde edilmektedir. Benzer şekilde, Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre, dünya genelinde satılan ilaçların %30'u bitkisel materyallerden türetilen bileşenler içermektedir [4].

Çoğu ülkede çeşitli hastalıkların tedavisinde şifalı bitkiler kullanılmaktadır [5]. *Matricaria recutita* L. (*M. recutita*) genel olarak “tıbbi bitkilerin yıldızı” olarak ifade edilen bir bitki türüdür [6]. Bitki Asteraceae familyasında yer almaktadır [7]. Bitkinin çiçek kısımları drog olarak kullanılmaktadır [8]. *M. recutita*, Türkiye’de yerel olarak

“Papatya” olarak adlandırılmaktadır [9]. Dünyada yılda 4.000 ton üretilen papatya, hem tıbbi hem de ekonomik açıdan dünya çapında büyük bir öneme sahiptir [10].

M. recutita dünyada en çok kullanılan bitkilerden biridir ve ayrıca birçok geleneksel ve tıbbi ürünün içeriğinde yer almakta, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde de kullanılmaktadır. Cildin her yerine uygulanabilmektedir. Bu nedenle *M. recutita* preparatlarında güvenli ve tekrarlanabilir bir belirtecin belirlenmesi endüstri açısından oldukça önemlidir [11].

M. recutita çiçek kısımları Avrupa İlaç Ajansı (EMA) monografına göre, şişkinlik ve minör spazmlar gibi minör mide-bağırsak şikayetlerinin semptomatik tedavisinde, soğuk algınlığı semptomlarının giderilmesinde, ağız ve boğazdaki iltihapların ve minör ülserlerin tedavisinde, anal ve genital bölgedeki cilt ve mukoza tahrişlerinin adjuvan terapisinde, derinin hafif iltihaplanması (güneş yanığı), yüzeysel yaralar ve minör çıbanların tedavisinde geleneksel kullanıma sahiptir [12].

Bu kadar önemli endikasyonlara sahip olmasına rağmen standardize *M. recutita* ekstrelerini içeren fitofarmasötik ürünler piyasada yok denecek kadar az ve mevcut ürünler ise kalite kontrolü konusunda şüphelere sahiptir. Bu çalışma kapsamında, *M. recutita* bitkisinin çiçek kısımlarının EMA monografına uygun çözücü sistemleri ile ekstrakte edilerek standardize, yerli ve katma değeri yüksek ilaç hammaddesi olarak kullanılması, elde edilen ekstrelerin apigenin-7-O-glikozit (A7G) içeriklerini belirlemek için HPLC-PDA metodunun geliştirilmesi ve valide edilmesi, bu ekstreler kullanılarak güvenli, kaliteli ve etkili fitofarmasötik ürünlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, geliştirilen ve valide edilen HPLC-PDA yönteminin *M. recutita* ekstrelerinin kalite kontrolünde güvenle kullanılabilmesi amaçlanmıştır.

Patent üzerine yapılan bir araştırma, ilaç endüstrisinin *Matricaria* türlerini kullanarak deri hastalıklarına yönelik ilaç üretmek için giderek daha fazla çaba ve yatırım yaptığını ortaya çıkarmıştır. *Matricaria* ile ilgili akademik çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Sonuç olarak, bilimsel çalışmalardan bunların ilaç pazarındaki uygulamalarına kadar uzun bir yolculuk olduğu kabul edilmektedir. *Matricaria* bazlı yeni ürünlerin önümüzdeki yıllarda ilaç pazarına girebileceği ihtimalini akla getirmektedir [13]. Bu nedenle, gerçekleştirilen bu kapsamlı çalışmanın etkili,

güvenilir ve kaliteli fitofarmasötik ürünlerin geliştirilmesine ışık tutacağı öngörülmektedir.

2. *Matricaria recutita* TÜRÜNE AİT BOTANİK BİLGİLER

2.1 *Matricaria recutita* Türünün Sistematikteki Yeri

M. recutita Compositae olarak da bilinen Asteraceae familyasında yer almaktadır. Geleneksel tıpta en yaygın kullanılan papatyalar Alman papatyası (Sinonim: *M. chamomilla,* diğer adı: *M. recutita* L.), Roman papatyası (*Chamaemelum nobile* (L.) diğer adı: *Anthemis nobilis* L.) ve Juhua veya Çin papatyasıdır (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat.). Bu papatya türlerinin her birinde çok sayıda kültivar ve hibritler mevcuttur. Çiçek morfolojileri bakımından yakın benzerliklere sahip olmaları, türlerin tanımlanmasında kafa karışıklığına ve ticareti yapılan malzemelerin kalite kontrolünde zorluklara yol açmaktadır [7]. Ülkemizde *M. recutita* türünün 3 varyetesi bulunmakta ve bu türler doğal olarak yetişmektedir [14]. Sonbaharda ekilen bitkinin boyu, çiçeklenme dönemi ve verimi ilkbaharda ekilenlere kıyasla daha fazladır [15]. *M. recutita* çiçek tablasının yapısı konik, içi boş olması ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.1) [16].

Şekil 2.1: *M. recutita* türünün çiçek tablası görünümü.

2.2 Asteraceae Familyasının Özellikleri

Genellikle Sunflower familyası olarak da bilinen Asteraceae familyası, dünya çapında 1600'den fazla cins ve 25.000 türü içeren en büyük çiçekli bitki familyasıdır. Hindiba, ayçiçeği, marul, kız gözü çiçeği, yıldız çiçeği ve papatya gibi iyi bilinen bir dizi türün yanı sıra pelin otu ve karahindiba gibi tıbbi öneme sahip bir dizi bitkiyi içerir [17].

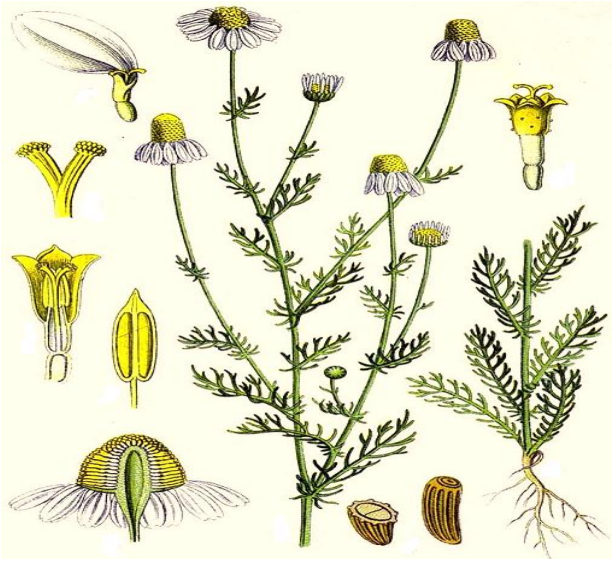
Asteraceae familyası, Antarktika hariç, dünya çapında çeşitli ekolojik habitatlarda yaygın olarak dağılmaktadır. Orman habitatlarında, yüksek rakımlı çayırlarda ve hatta kentsel yeşil alanlarda bulunurlar, ancak tropik bölgelerde çok daha az yaygındırlar. Asteraceae bitkilerinin morfolojisi de çeşitlidir. Şili'deki *Dasyphyllum excelsum* veya Malezya'daki *Vernonia arborea* gibi bazı türler 30 m'nin üzerine ulaşan ağaçlardır, Ancak diğerlerinin çoğu, 1-3 m boyunda değişen çok yıllık veya daha az yıllık bitkilerdir [17].

2.3 *Matricaria* Cinsi

Matricaria, tek yıllık ve otsu olan *Matricaria apressa* Charit., *Matricaria aurea* (Loefl.) Sch.Bip., *M. recutita* L., *Matricaria discoidea* DC., *Matricaria Occidentalis* Greene., *Matricaria tzvelevii* Pobed. gibi altı ana türe sahiptir. Avrupa, Kuzey Afrika, Makaronezya, Batı, Güneybatı ve Orta Asya ile Batı Kuzey Amerika'da dağılım gösterir. Ayrıca, *Matricaria* L. cinslerinin bazıları Avustralya'da doğallaştırılmıştır. *Matricaria* cinsinin Türkiye florasında *M. aurea, M. chamomilla* var. *chamomilla, M. chamomilla* var. *recutita* ve *M. matricarioides* olmak üzere dört taksonu tanımlanmıştır. Bu cinsin *M. recutita* gibi bazı türleri tıbbi bitki olarak tanınır ve birçok ülkede ticari amaçla yetiştirilir [16, 18-21].

2.4 *Matricaria recutita* Türünün Özellikleri ve Yayılışı

Chamomile adı "toprakta" anlamına gelen Khamai ve "elma" anlamına gelen melon’dan oluşan iki Yunanca kelimeden türetilmiştir. Çiçekleri elma benzeri bir aromaya sahiptir. Kısa kökleri olan tek yıllık otsu bir bitkidir. Bitki uzun ve dar küçük loplara sahip hafif küçük yapraklara sahiptir. Kapitulumlar ayrı, çapı 15-25 mm ve hepsi heterogamdır. Tüpsü çiçekler 3-5 dişli altın sarısı, dilsi çiçekler beyazdır. Çiçeğin kokusu tatlıdır. Tohumlar küçük, hafif ve uzundur. Kökler ince, iğ şeklindedir. Gövde dallı, dik ve çok dallanmıştır (Şekil 2.2) [22].



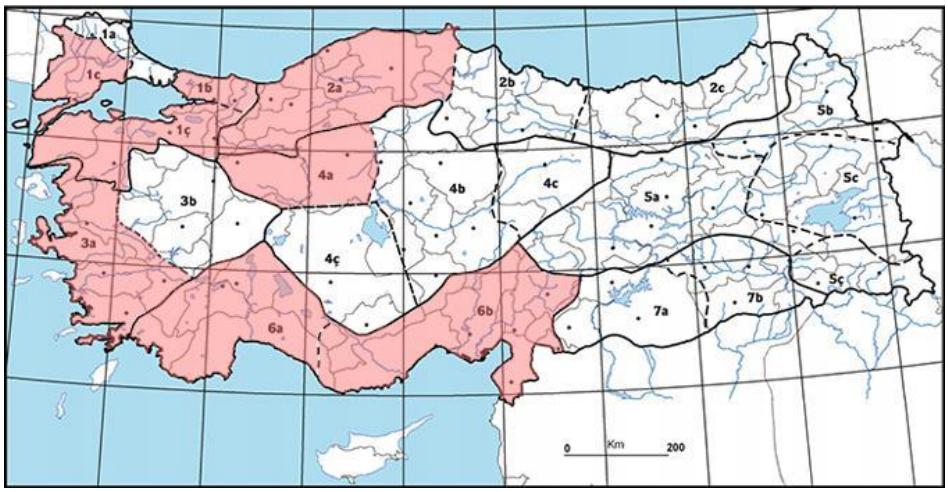
Şekil 2.2: *M. recutita* türünün morfolojik yapısı.

M. recutita L.'nin taksonomik hiyerarşisi Tablo 2.1'de verilmektedir [23].

Tablo 2.1: *M. recutita*'nın taksonomik hiyerarşisi.

Taksonomik Hiyerarşi	
Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Asteridae
Sıra	Asterales
Aile	Asteraceae
Cins	*Matricaria*
Tür	*Matricaria recutita* L.
Sinonim	*Matricaria chamomilla* L.
Yaygın isim	Tıbbi papatya, Mayıs papatyası, Alman papatyası

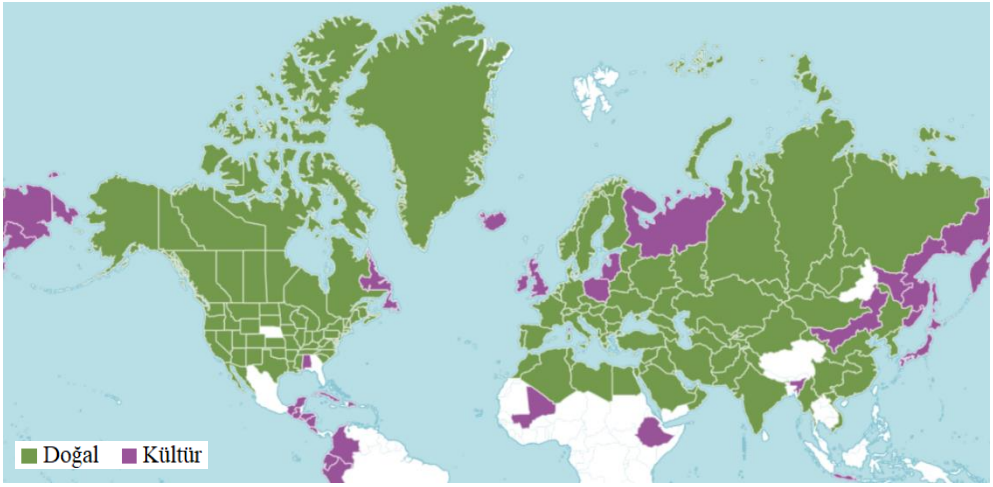
Ülkemizde Çatalca-Kocaeli Bölümü (1b), Ergene Bölümü (1c), Güney Marmara Bölümü (1ç), Batı Karadeniz Bölümü (2a), Asıl Ege Bölümü (3a), Yukarı Sakarya Bölümü (4a), Antalya Bölümü (6a) ve Adana Bölümü'nde (6b) yayılış göstermektedir (Şekil 2.3) [24]. Ayrıca yol kenarlarında, boş tarlalarda bol miktarda bulunmaktadır [25].



Şekil 2.3: *M. recutita* türünün Türkiye'deki yayılışı.

Türkiye orjinli varyetelerin uçucu yağı kamazulen açısından fakirdir, uçucu yağlar yüksek oranda bisabolon içerir ve genellikle sarı renklidir. Ancak küresel papatya pazarında mavi renkli kamazulen içeriğine sahip tıbbi *M. recutita* türü kabul görmektedir. Bu nedenle, ülkemizde genellikle yurt dışında ıslah edilmiş ve dünya pazarında standartlara ve farmakopelere uygun tıbbi papatyalar yetiştirilmeye başlanmıştır. Balıkesir, Afyonkarahisar ve Samsun'da *M. recutita* tarımı ile uğraşan çiftçilerin olduğu bilinmektedir [14].

M. recutita Avrupa, Asya, Akdeniz, Güney Afrika ve Kuzeybatı Amerika'da yaygın olarak yetişmektedir. Toprağa ve çevreye oldukça uyumludur, nispeten dayanıklıdır ve hatta 2000 m rakımda ve pH 8.0–9.0'da alkali topraklarda bile yetişebilir [26]. Tarımsal ürün olarak Almanya, Mısır, Polonya, Arjantin ve daha az ölçekte Çek Cumhuriyeti, Slovakya, Şili, İspanya ve birkaç Balkan (Bulgaristan, Bosna Hersek, Sırbistan ve Hırvatistan) ülkelerinde yetiştiriciliği yapılmakta, Bulgaristan, Arnavutluk, Macaristan, Kosova, Hırvatistan ve Makedonya gibi ülkelerde de doğadan toplanmaktadır. Macaristan geçmişten günümüze kadar önemli üretici ülkelerin başında gelmektedir. Macaristan doğal florası nedeniyle *M. recutita* üretiminde bölgesel uzmanlaşmanın nasıl olabileceğinin bir örneğidir. *M. recutita*'nın yıllık küresel ticaret hacminin, çoğunlukla Mısır, Almanya, Slovakya, Polonya ve Arjantin gibi ülkelerden sağlandığı bilinmektedir. Bitkinin dünya üzerindeki yayılışı Şekil 2.4'te yer almaktadır [14, 21, 27].



Şekil 2.4: *M. recutita* türünün dünya üzerindeki yayılışı.

3. GENEL BİLGİLER

3.1 *Matricaria recutita*'nın Besin Değeri ve Fitokimyasal İçeriği

European Pharmacopoeia (EP) çiçek monografına göre; *M. recutita* bitkisinin kurutulmuş çiçek kısımları minimum 4 mL/kg uçucu yağ içermelidir [28]. Bitki büyümesi çevresel, iklimsel ve diğer faktörlerden etkilenebilir. Bu nedenle, ekim alanının yoğunluğu, bitki toplandıktan sonra uygulanan kurutma yöntemi ve sıcaklığı, depolama koşulları, ekim zamanı, hasat zamanı ve bitki olgunluğu, iklim koşulları, toprak yapısı ve bir çok etken bitkinin içeriğinde hem niteliksel hem de niceliksel olarak farklılıklara neden olmaktadır [15, 29-36]. 100 gram olarak hazırlanan *M. recutita* infüzyonunun besin içeriği Tablo 3.1'de verilmektedir [37].

Tablo 3.1: *M. recutita* besin içeriği.

Besin içeriği	Miktar
Enerji	1 kcal
Su	99,7 g
Karbonhidrat	0,2 g
Kül	0,01 g
Kalsiyum	2 mg
Demir	0,08 mg
Magnezyum	1 mg
Potasyum	9 mg
Sodyum	1 mg
Çinko	0,04 mg
Bakır	0,015 mg
Beta Karoten	12 µg
A vitamini	1 µg
B2 Vitamini	0,004 mg
B1 Vitamini	0,01 mg
B5 Vitamini	0,011 mg
Folat	1 µg
Manganez	0,044 mg

3.1.1 Vitaminler

M. recutita çiçeklerinde A, B ve C vitaminleri bulunmaktadır. Literatürde C vitamini üzerine çalışmalar yer almaktadır. Aishwarya ve Chauhan tarafından yapılan bir araştırmada, *M. recutita* çiçeklerinin %1,65 oranında C vitamini içerdiği belirlenmiştir [37, 38]. Telesinski ve arkadaşları, dört farklı *M. recutita* kültivarı üzerine yaptığı araştırmada C vitamini içeriklerini %0,038-%0,042 aralıklarında analiz etmişlerdir [39].

3.1.2 Karbonhidratlar

M. recutita L. çiçeklerinin %4,74 oranında karbonhidrat içerdiği belirlenmiştir [38]. Farklı yıllarda hasat edilen *M.recutita* çiçeklerinin %13,05 ve %12,28 oranlarında karbonhidrat içerdiği analiz edilmiştir [40].

3.1.3 Proteinler ve aminoasitler

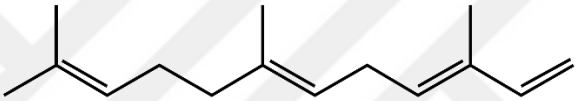
Aishwarya ve Chauhan tarafından yapılan bir araştırmada, *M. recutita* çiçeklerinin %0,87 oranında protein içerdiği belirlenmiştir [38]. Hassanain ve arkadaşları, farklı yıllarda hasat edilen *M. recutita* çiçeklerinin protein içeriklerini sırasıyla %12,38 ve %12,00 olarak, toplam serbest aminoasit içeriklerini %0,235 ve %0,209 olarak bildirmişlerdir [40].

3.1.4 Mineraller

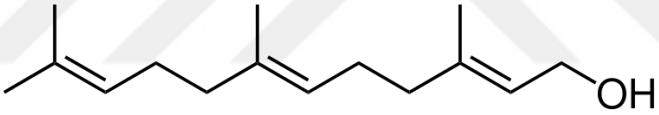
Bazı bitkisel çayların bileşiminde bir dizi makro ve mikro elementler bulunur ve bunların bazıları insan vücudunun gelişimi için büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca, bazen toksik elementler de bitkilerde düşük miktarlarda tespit edilmektedir. *M. recutita*'da kurutulmuş 1 kg bitki başına 1440 mg Demir (Fe), 135 mg Mangan (Mn), 45,6 mg Çinko (Zn) gibi mikro elementleri ve 10,23 mg Bakır, <10 mg Kobalt (Co), Kurşun (Pb) ve Kadmiyum (Cd) gibi toksik elementleri içermektedir [41,42]. Başgel ve Erdemoğlu tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *M. recutita*'nın Kalsiyum (Ca), Magnezyum (Mg), Demir (Fe), Alüminyum (Al), Mangan (Mn), Çinko (Zn), Stronsiyum (Sr), Bakır (Cu), Baryum (Ba), Nikel (Ni), Krom (Cr), Kobalt (Co), Kurşun (Pb) ve Kadmiyum (Cd) elementlerini içerdiği belirlenmiş ve en fazla Magnezyum (Mg), en düşük ise Kobalt (Co) içerdiği tespit edilmiştir [43].

3.1.5 Uçucu Yağ

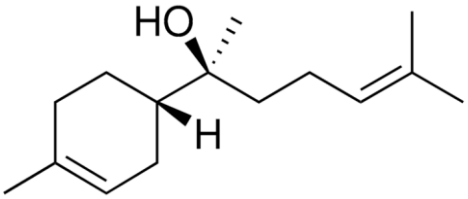
M. recutita çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ kamazulen, monoterpenik ve seskiterpenik (bisabololoksit, bisabolol gibi) bileşikleri içermektedir. Uçucu yağ içeriğinde yüz yirminin üzerinde bileşen tanımlanmıştır. Çiçeklerin uçucu yağ bileşeni kültürü yapılan türlerde ortalama %0,42 oranında tespit edilmiştir. Uçucu yağın ana bileşenleri *a*-bisabolol terpenoidleri ve onların oksitlerini (<%78) ve kamazulen (% 1-1,5) dahil azulenleri içermektedir [44]. Ayrıca, uçucu yağın ana bileşenlerinin *β*-farnesene (Şekil 3.1), farnesol (Şekil 3.2), *α*-bisabolol (Şekil 3.3), bisabolol oksitler (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5) ve mavi rengi veren bileşik olarak bilinen kamazulen (Şekil 3.6) olduğu da bildirilmiştir. Türkiye'de yetişen *M. recutita* türlerinden elde edilen uçucu yağlar kamazulen açısından fakir ve sarı renklidir [14, 45].



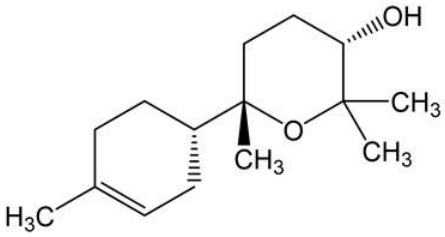
Şekil 3.1: *β*-Farnesen.



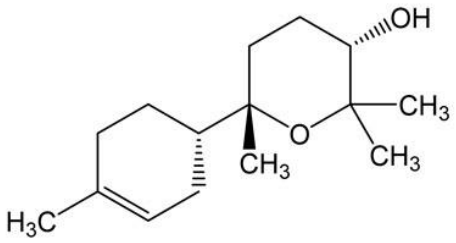
Şekil 3.2: Farnesol.



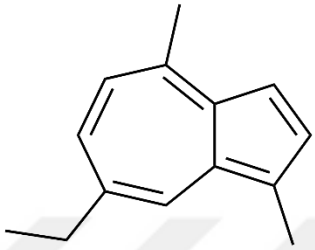
Şekil 3.3: *α*-bisabolol.



Şekil 3.4: Bisabolol oksit A.



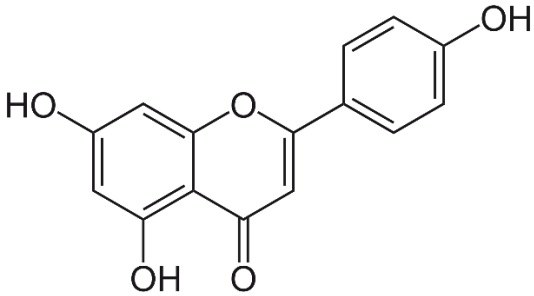
Şekil 3.5: Bisabolol oksit B.



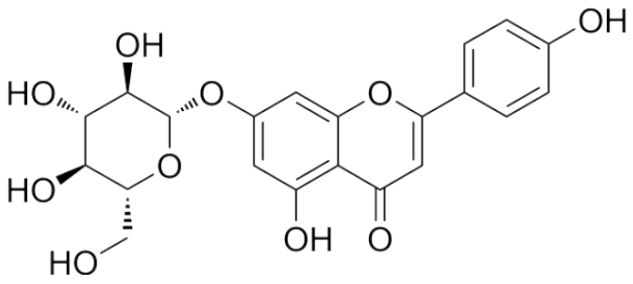
Şekil 3.6: Kamazulen.

3.1.6 Polifenoller

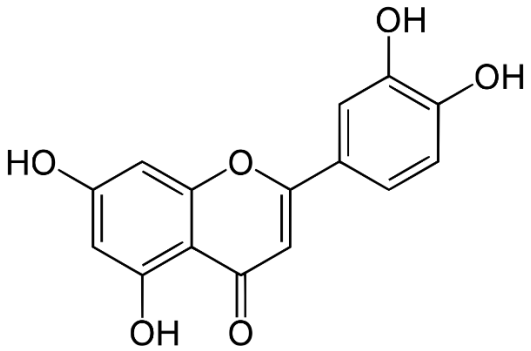
M. recutita çiçekleri flavon olarak apigenin (Şekil 3.7), A7G (Şekil 3.8), luteolin (Şekil 3.9) ve luteolin-7-O-glikozit (Şekil 3.10), flavonol olarak kuersetin (Şekil 3.11) ve rutin (Şekil 3.12), flavanon olarak naringenin (Şekil 3.13) bileşiklerini temel olarak içermektedir [38]. *M. recutita* 'nın sahip olduğu tıbbi etkiler içerdiği fenolik bileşikler ile ilgilidir. Apigenin, *M. recutita*'da bulunan ana flavonoit bileşiktir. Bu bileşiğin önemli bir miktarı glikozit formunda bulunurken, yalnızca küçük bir miktarı serbestçe bulunmaktadır. Bu nedenle apigenin-7-O-glikozit bileşiği bu bitkide ve bu bitkiden elde edilen ekstrelerde belirteç olarak kabul edilmektedir [11].



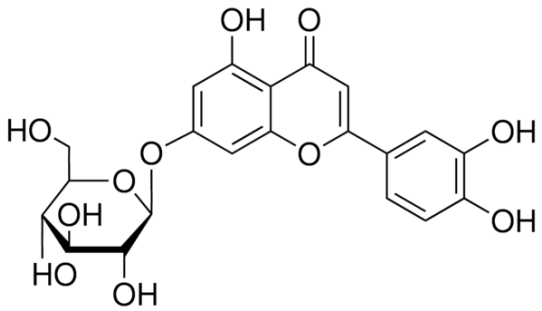
Şekil 3.7: Apigenin.



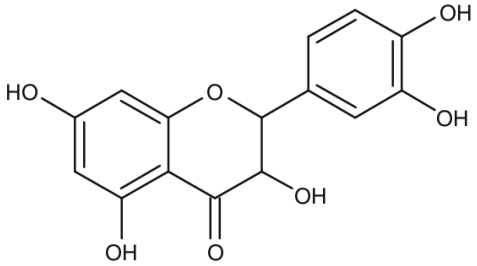
Şekil 3.8: A7G.



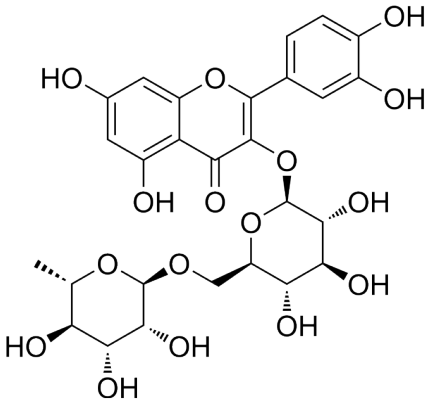
Şekil 3.9: Luteolin.



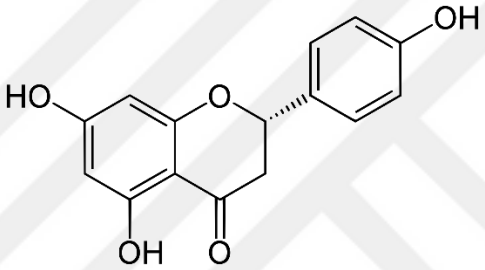
Şekil 3.10: Luteolin-7-O-glikozit.



Şekil 3.11: Kuersetin.



Şekil 3.12: Rutin.



Şekil 3.13: Naringenin.

M. recutita çiçekleri ayrıca A7G'nin asetillenmiş türevleri [46], luteolin-7-rutinozit, naringin [47], luteolin-O-açilhekzosit, kuersetin-7-O-asetilhekzosit [48], krozoeriol, patulitrin, patuletin, kuersetin-7-glikozit [49], epikateşin gallat [50] gibi fenolik bileşikleri de içermektedir.

Fenolik asitlerden klorojenik asit, kafeik asit [47], 2,5-dihidrobenzoik asit [51], protokateşik asit [48], ferulik asit ve *p*-kumarik asit [52] bulundurmaktadır. Ayrıca *M. recutita* çiçeklerinde umbelliferon, herniarin, skimmin, daphnin ve daphnetin gibi kumarin bileşiklerinin de varlığı bildirilmiştir [53, 54].

3.1.7 Organik Asitler

M. recutita çiçeklerinde organik asitler de bulunmaktadır. Ferreira ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *M. recutita* çiçeklerinde oksalik asit, kinik asit, malik asit, şikimik asit, askorbik asit, sitrik asit, süksinik asit ve fumarik asit tespit edilmiştir [48].

4. *Matricaria recutita* TÜRÜNÜN KULLANIM ALANLARI ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

4.1 *Matricaria recutita* Türünün Kullanım Alanları

Tıbbi papatya yüzyıllardır bilinen bir bitkidir ve geleneksel halk hekimliğinde, ishal ve gaz gibi konvülsiyonlarla bağlantılı ağrılı mide ve bağırsak şikayetlerinde ve ayrıca gastrit ve enterit gibi iltihaplı mide ve bağırsak hastalıklarının tedavisinde dahili olarak içilen çay formu kullanılmaktadır. Tıbbi papatya preparatları esas olarak antiflojistik, spazmolitik, sakinleştirici ve karminatif aktiviteleri nedeniyle de kullanılmaktadır. Ayrıca, bakteriyostatik ve fungistatik özellikleri (antibakteriyel ve antimikotik etkiler) hafife alınmamalıdır ve bunlar birçok çalışmada kanıtlanmıştır [55].

Tıbbi papatya haricen, zor iyileşen yaralarda sıcak kompres şeklinde, apseler, çıbanlar, hemoroidler ve kadın hastalıkları için oturma banyosu olarak, ağız ve boğaz boşluğu iltihaplarında ağız gargarası olarak, akne vulgaris tedavisinde papatya buharı inhalasyonu olarak, burun akıntısı ve bronşit için inhalasyon olarak ve bebek banyolarına katkı maddesi olarak uygulanır. Klinik ve pratikte dermatoloji, stomatoloji, kulak burun boğaz ile ilgilenen tıp disiplini, radyasyon terapisi, pulmoloji, pediatri, jinekoloji ve gastroenteroloji alanlarında tıbbi papatya'nın galenik preparatları kullanılmaktadır [55].

M. recutita'nın çiçek kısımları EMA monografına göre, şişkinlik ve minör spazmlar gibi minör mide-bağırsak şikayetlerinin semptomatik tedavisinde, soğuk algınlığı semptomlarının giderilmesinde, ağız ve boğazdaki iltihapların ve minör ülserlerin tedavisinde, anal ve genital bölgedeki cilt ve mukoza tahrişlerinin adjuvan terapisinde, derinin hafif iltihaplanması (güneş yanığı), yüzeysel yaralar ve minör çıbanların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır [12]. Tıbbi papatya hem tıbbi hem de ekonomik açıdan dünya çapında önemli bir bitki haline gelmiştir. Ayrıca, sadece birkaç geleneksel ve tıbbi preparatın bir bileşeni olmakla kalmaz, aynı zamanda ilaç, kozmetik, gıda ve parfümeri endüstrilerinde de kullanılmaktadır. Kozmetik alanında

cilt bakım, saç bakım ve bebek bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [10, 11, 13, 56].

Saçları sarartmak ve kumaşları boyamak için kullanılabilmektedir. Ek olarak infüzyonu cilt, ağız, göz bakımında ve şampuanlar için aroma olarak kullanılmaktadır [57, 58]. Günümüzde kozmetik endüstrileri, papatyayı tek başına veya biberiye gibi diğer bitkilerle birlikte kullanmaktadır. Papatya içeren şampuan, saç rengini açmada kullanılır. Ekstreleri, cildi yumuşatmak için şampuanlarda, çeşitli banyo köpüklerinde, sabunlarda ve losyonlarda kullanılır. Papatya ekstreleri, maskenin ve ön yıkama sıvılarının bileşenlerinden biridir. Papatya ve ekstreleri, saçları daha açık, daha yumuşak ve daha dolgun hale getirmektedir [59].

Dermatolojik hastalıklarda kullanılan farmasötik formülasyonlar üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, tekstil materyallerine aktif bileşenlerin dahil edilmesinin, kullanımını kolaylaştırdığı ve yaralı bölgeye uyum sağlama kapasitesine sahip olduğu ve cilt hastalıklarının tedavisine daha fazla etkinlik kazandırdığı için, bu bitkiyi içeren bandaj formülasyonları geliştirilmiştir [13].

İdrar söktürücü, kadınların adet kanamasını ve emziren annelerin süt salgısını arttırma, baş ağrılarını ve migreni hafifleme, mesane taşlarını düşürme etkilerine sahiptir. Düşük adet akıntısının tedavisinde kullanılmaktadır. Ağrıyan göz tedavisi için papatya sirke ile karıştırılıp buharda pişirilerek kullanılmıştır [59].

M. recutita uçucu yağı özellikle parfüm üretiminde, belirli farmasötik ve kozmetik bileşimlerin üretiminde ve standardizasyonunda önemli bir uygulamaya sahiptir. Uçucu yağ içeren preparatlar (%1'e kadar) lokal olarak yaraların ve akut kronik cilt iltihabının (dermatit, egzama) tedavisinde kullanılır. Papatya uçucu yağı, banyo katkısı şeklinde uygulandığında kaslar üzerinde rahatlatıcı bir etkiye sahiptir ve zihinsel gerginliği gidermektedir. Ayrıca ağız gargarası ürünlerinde, diş macunlarında, dekoratif kozmetiklerde ve şampuanlarda da yer almaktadır [60, 61].

Türkiye pazarında tıbbi papatya ekstresini veya uçucu yağını içeren ürünler az sayıda ve diğer birçok bitki ile kombine şeklinde gıda takviyesi olarak satışa sunulmaktadır. Meda Farma (Almanya) tarafından üretilen ve Kamillosan® ismi ile satışta olan ürünler oral solüsyon, boğaz spreyi, burun spreyi, topikal krem, topikal merhem ve banyo katkısı formunda yurtdışı piyasasında dermokozmetik ürünler olarak satışa

sunulmaktadır. Türkiye'de Kamillosan® ürünlerinin bir kısmı satışa sunulmaktadır [62, 63].

4.2 Antienflamatuvar Aktivite

M. recutita, özellikle antienflamatuvar etki olmak üzere çeşitli biyolojik etkiler sunan tıbbi bir bitkidir. Bu etkiyle ilişkili bileşiklerden biri, çoğunlukla glikozlanmış formunda A7G olarak doğal kaynaklarda bulunan ve bir flavonoit olan apigenindir. Baretta ve arkadaşları, A7G'nin antienflamatuvar özelliğini daha önce lipopolisakkarit (LPS) ile muamele edilen fare makrofajlarında TNF-α sitokin üretimini inhibe ederek gösterdiğini belirtmişlerdir [11]. Makrofajlar üzerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, *M. recutita* etanol ekstresinin makrofajlar üzerindeki antienflamatuvar aktivitesi nitrik oksit üretimi ve hücre canlılığında azalma ile ilişkiliyken, lenfositler üzerinde antienflamatuvar etkisinin sitokin üretiminin (IL-10) indüksiyonu ve hücre canlılığında azalma ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, *M. recutita* sulu ekstresi makrofajlar üzerinde nitrik oksit üretiminin azalmasına ve hücre canlılığında artışa neden olurken, Th1/Th2 dengesini bozarak etkili bir Th1 arttırıcı Th2 baskılayıcı bir davranış sergilmiştir. Sonuç olarak, alkollü ekstrenin antienflamatuvar etkisi sulu ekstreden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu iki ekstre arasındaki farkın, içerdikleri farklı aktif bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir [64].

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, liyofilize *M. recutita* ekstrelerinin hem enflamatuvar etkiyi hem de lökosit infiltrasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir. *M. recutita* %80 etanol ekstresi için intraperitoneal LD_{50} dozunun 1/10'u tarafından üretilen karragen kaynaklı pati ödeminin baskılanması ölçülerek, sağlam sıçanlar üzerindeki antienflamatuvar aktivitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar bitkinin iyi bir antienflamatuvar aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [65, 66].

Tomic ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *M. recutita* kurutulmuş çiçeklerinden elde edilen uçucu yağın, doza bağlı olarak karragen ile oluşturulmuş ödemi (25, 50 ve 100 mg/kg dozlarda sırasıyla inhibisyon oranları % 18,4, %27,5 ve %40,1) ve hiperaljeziyi (25, 50 ve 100 mg/kg dozlarda sırasıyla inhibisyon oranları % 18,4, %29,5 ve %45,9) giderdiği belirtilmiştir [67].

Diz osteoartriti olan hastalarda topikal *M. recutita* uçucu yağının etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek amacıyla, randomize kontrollü klinik bir çalışma

gerçekleştirilmiştir. Hastalar günde 3 hafta boyunca günde 3 kez topikal tıbbi papatya yağı, diklofenak veya plasebo ile tedavi edilmiştir. Analjezik olarak parasetamol kullanmalarına izin verilmiş ve hastalara toplam parasetamol kullanımları sorulmuştur. Ayrıca, kayıt sırasında ve haftalık olarak Western Ontario ve McMaster Üniversiteleri Osteoartrit İndeksi (WOMAC) anketi kullanılarak ağrı, fiziksel işlev ve sertlik açısından değerlendirilmiştir. Tıbbi papatya yağı, hastaların parasetamol ihtiyacını diklofenak ve plaseboya kıyasla önemli ölçüde azaltığı gözlemlenmiştir. Hastalar papatya yağı kullanımında herhangi bir yan etki bildirmemişlerdir [68].

4.3 Antispazmodik Aktivite

M. recutita'nın spazmolitik aktivitesinin altında yatan mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. Siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP)-fosfodiesterazlar'ın (PDE) inhibisyonu spazmolitik ilaçlar tarafından çalıştırılan mekanizmalardan biridir. Dellaagli ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, tıbbi papatyanın PDE üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İnsan trombosit cAMP-PDE ve rekombinant PDE5A1, çiçek kısımlarından infüzyon yoluyla hazırlanan ekstre varlığında test edilmiştir. *M. recutita* cAMP-PDE aktivitesini (IC_{50}=17,9-40,5 µg/mL) inhibe ederken, cGMP-PDE5 (-%15, 50 µg/mL'de) daha az etkilenmiştir. Ayrıca, test edilen bireysel bileşikler arasında, yalnızca flavonoitler (A7G, apigenin, luteolin, luteolin-7-O-glukozit, hiperozit, patuletin-7-O-glukozit) inhibitör etki (IC_{50}=1.3-14.9 µM) göstermiş ve infüzyon inhibisyonunun yaklaşık %39'una katkıda bulunmuştur. Fenolik asitler (kafeik asit, klorojenik asit ve ferulik asit), terpenoidler (α-bisabolol ve oksitleri) ve kumarinler (herniarin ve umbelliferon) ise inaktif etki sergilemişlerdir [69].

Yazdi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *M. recutita* hidroalkolik ekstresinin izole tavşan jejunumunda antispazmodik etkisi incelenmiştir. Çalışmada, izole jejunum preparatları kolinerjik, protein kinaz A, nitrerjik ve histaminerjik reseptörleri modüle eden farmakolojik problar olmak üzere yedi gruba ayrılmıştır. *M. recutita* ekstresi, jejunumun spontan düz kas kasılmasını konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe etmiş ve hem potasyum hem de kalsiyum kaynaklı kasılmaları azaltmıştır. Bu etki, Verapamil'in etkisine benzemektedir. Ekstrenin antispazmodik etkisi H89 (bir protein kinaz A inhibitörü) tarafından inhibe edilmiştir. *M. recutita*, farklı sinyal yollarıyla iletilen spazmolitik ve antispazmodik etkileri uyarmıştır. Sonuç

olarak, kalsiyum kanallarını bloke ederek, asetilkolin ve histamin reseptörlerini aktive ederek, nitrik asit'i serbest bırakarak ve protein kinaz A'yı aktive ederek bu ikili inhibitör etkiyi gösterdiği belirtilmiştir [70].

4.4 Anksiyolitik Aktivite

Endoskopi öncesi *M. recutita* uçucu yağının inhalasyonun kaygıya olan etkisini belirlemek amacıyla, endoskopi bölümü'ne sevk edilen hastalar arasında randomize klinik bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmanın popülasyonu, randomize deney ve kontrol gruplarına ayrılan 152 katılımcıyı içermekteydi. Kaygı, durum-özellik kaygı envanteri anketi kullanılarak ölçülmüştür. Ardından, deney grubu 20 dk boyunca *M. recutita* uçucu yağını ve kontrol grubu ise plasebo (susam yağı) solumuştur. İnhalasyondan 10 dk sonra kaygı tekrar ölçülmüş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Deney ve kontrol grubunda inhalasyondan sonra ortalama anksiyete seviyesi her iki grupta da azalmış, fakat deney grubunda azalmanın daha anlamlı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, *M. recutita* uçucu yağı inhalasyonunun endoskopi adayı olan hastaların anksiyetesini azaltmada etkili olduğunu göstermiştir [71].

M. recutita çayının içilmesinin kanser hastalarındaki anksiyete ve depresyon düzeyine olan etkisini belirlemek amacıyla tek kör klinik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, deney ve kontrol grubunda bulunan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi, anksiyete ve depresyon anketleri ile ölçülmüştür. Deney grubunun çayın içilmesinden önce ve sonra depresyon puanlarının ortalaması sırasıyla 25,81 ve 19,49 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda çalışmadan önce ve sonra depresyon puanlarının ortalaması sırasıyla 25,83 ve 24,90 olarak bulunmuştur. Sonuçlar deney ve kontrol grubunda çalışmadan önce ve sonra depresyon puanlarının ortalamasının anlamlı derecede farklı olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, *M. recutita* çayının güvenli ve etkili olması nedeniyle, kemoterapi gören kanser hastalarının depresyon tedavisine alternatif bir tedavi olarak önerilmiştir [72].

Arnason ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışma, anksiyete tedavisinde kullanılan ve ticari olarak tedarik edilebilen bitkilerin γ-aminobütirik asit metabolizmasından sorumlu birincil beyin enzimlerine doğrudan etkisi olup olmadığını saptamak amacıyla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Kaygı giderici bitkiler glutamik asit dekarboksilaz veya gama aminobütirik asit transaminaz ile etkileşime girebilir ve nihayetinde beyin gama aminobütirik asit seviyelerini ve

nörotransmisyonu etkileyebilir. Farklı bitkilere ait sulu ve etanolik bitki ekstrelerinin inhibitör konsantrasyonlarını (IC_{50}) belirlemek için iki *in vitro* sıçan beyin homojenat testi geliştirilmiştir. Kullanılan on farklı bitkiden, *Melissa officinalis* bitkisinin sulu ekstresi gama aminobütirik asit transaminaz aktivitesinin en büyük inhibisyonunu (IC_{50}=0,35 mg/ml) gerçekleştirmiştir. *M. recutita* ve *Humulus lupulus* glutamik asit dekarboksilaz aktivitesi üzerinde önemli inhibisyon (0,11–0,65 mg/mL) göstermişlerdir [73].

Hafif ile orta şiddette anksiyete bozukluğu olan 57 hasta üzerinde gerçekleştirilen randomize, çift kör ve plasebo (laktoz monohidrat) kontrollü bir çalışmada, hastalara 8 hafta boyunca apigenin (%1,2) üzerinden standardize edilmiş *M. recutita* ekstresini içeren kapsüller verilmiştir. Çalışmalar, ilk hafta günde 1 kapsül olarak başlatılmış ve tedavinin ikinci haftasında günde 2 kapsüle çıkarılmıştır. Toplam anksiyete puanı (başlangıca göre) %50 veya daha az azalma olan hastalar için, tedavinin 3. haftasında günde 3 kapsüle çıkarılmış ve ardından tedavinin 4. haftasında günde 4 kapsüle çıkarılmıştır. Başlangıç anksiyete puanı %50 veya daha az azalmaya devam eden hastalar için, tedavinin 5 ile 8. çalışma haftaları arasında günde 5 kapsüle çıkarılmıştır. *M. recutita* ekstresinin tedavisinde, plasebo tedavisine kıyasla ortalama toplam anksiyete puanında önemli ölçüde daha büyük bir azalma gözlemlenmiştir ($p = 0,047$). Sonuçlar, *M. recutita*'nın hafif ila orta şiddette anksiyete bozukluğu olan hastalarda orta düzeyde kaygı giderici aktiviteye sahip olabileceğini göstermiştir [74].

4.5 Yara İyileştirici Aktivite

M. recutita çiçek ekstresinin yara iyileştirme aktivitesini değerlendirmek amacıyla sıçanlar üzerinde bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Yara iyileştirme aktivitesi eksizyon, insizyon ve ölü boşluk yarası modelleri kullanılarak belirlenmiştir. Hayvanlar her model için altışarlı iki gruba ayrılmıştır. Test grubundaki hayvanlar içme sularına karıştırılan *M. recutita* sulu ekstresiyle (120 mg/kg/gün) tedavi edilmiştir. Kontrol grubundaki hayvanlar sade içme suyuyla beslenmişlerdir. İyileşme yara iyileşme hızı, yara kırma gücü, epitelizasyon süresi, hidroksiprolin içeriği ve granülasyon doku ağırlığı ile değerlendirilmiştir. 15. günde test grubundaki hayvanlar, kontrol grubundakilerle kıyaslandığında yara alanında daha büyük bir azalma (%61'e karşı %48), daha hızlı epitelizasyon ve önemli ölçüde daha yüksek bir yara kırma gücü

sergilemişlerdir ($p<0,002$). Ek olarak, ıslak ve kuru granülasyon doku ağırlığı ve hidroksiprolin içeriği önemli ölçüde daha yüksek olarak bulunmuştur [75].

M. recutita çiçeklerinin zeytinyağı ile hazırlanan ekstresinin Wistar sıçanları üzerinde yara iyileştirici etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, 36 adet sıçanın dilinde 5 mm çapında yara oluşturulmuş ve lineer insizyon yara modeli kullanılarak test edilmiştir. Tedavi grubu hayvanları topikal olarak 0,04 mL/gün tıbbi papatya ekstresini içeren merhem ile tedavi edilirken, kontrol grubu hayvanları tedavi edilmemiştir. Enflamasyon derecesinin, fibroblast sayısının ve yara boyutunun yarı kantitatif analizi, lezyonun yeniden epitelizasyonunun ve kollajen liflerinin yüzdesinin histometrik analizi yapılmıştır. Tıbbi papatya ekstresini içeren merhem ile tedavi edilen hayvanlar 10 gün sonra epitelizasyon ve kolajen liflerinin yüzdesi açısından en iyi sonuçları göstermiş ve ekstrenin anlamlı bir ($p< 0,05$) yara iyileştirici etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [76].

M. recutita çiçeklerinin zeytinyağı ile hazırlanan ekstresinin albino sıçanlardaki yanık yarasına etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, 30 erkek albino sıçan rastgele seçilmiş ve taşıyıcı, tedavi ve kontrol grubu olarak 3 gruba ayrılmışlardır. Tedavi ve taşıyıcı grubundaki hayvanların sırt kısımları 8 sn boyunca kaynar suya yerleştirilerek hayvanın tüm vücut yüzey alanının %20'sinde ikinci derece yanık oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki hayvanlara hiçbir tedavi uygulanmamıştır. Taşıyıcı ve tedavi gruplarındaki hayvanlara, yanık indüksiyonunun ilk gününden yara iyileşmesi tamamlanana kadar günde iki kez sırasıyla zeytinyağı ve zeytinyağında çözülmüş ekstre ile topikal olarak tedavi uygulanmıştır. Yara iyileşme yüzdesi haftalık olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, taşıyıcı ve tedavi grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu ($p<0,05$) göstermiştir. Bu nedenle, tıbbi papatya ekstresinin topikal yağ formunda sıçanlarda yanık yarası iyileşmesini hızlandırmada iyi bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır [77].

4.6 Antimikrobiyal Aktivite

M. recutita uçucu yağlarının ve ekstrelerinin antibakteriyel etkinliği çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır. Genellikle, diskler veya kuyular kullanılan agar difüzyon tekniği, *M. recutita* uçucu yağlarının ve ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesini taramak için en çok kullanılan tekniktir [58].

Shikov ve arkadaşları, *M. recutita* çiçeklerinin zeytinyağı ile hazırlanan ekstresinin *Helicobacter pylori*'ye karşı antibakteriyel aktivitesini değerlendirmiş ve agar dilüsyon testi uygulamışlardır. Ekstre, *Helicobacter pylori*'ye karşı etkili olmuş, $MİK_{90}$ (minimum inhibitör konsantrasyonu) ve $MİK_{50}$ değerlerini sırasıyla 125 mg/mL ve 62,5 mg/mL olarak elde etmişlerdir. Ekstrenin, *Helicobacter pylori* tarafından üretilen üreaz enziminin inhibisyonu yoluyla bu etkiyi gösterdiği belirtilmiştir [78].

Yapılan başka bir çalışmada, *M. recutita* etanol ekstresinin, herpes virüsü ve poliovirüsünün büyümesini engellediği bildirilmiştir [79, 80]. Orofaringeal kandidiyazisli İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü pozitif hastalardan izole edilen flukonazol'e dirençli ve duyarlı *C. albicans* suşları, duyarlı suşlar üzerinde daha iyi bir etkiyle *M. recutita* uçucu yağı tarafından inhibe edilmiştir [58].

İlkimen ve Gülbandılar tarafından yapılan bir çalışmada, *Lavandula stoechas, Salvia officinalis, Thymus vulgaris* ve *M. recutita* gibi tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen ekstrelerin antifungal ve antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Etanol ile soxhlet ektraksiyonu sonucunda hazırlanan ekstreler dimetilsülfoksit içinde çözündürülmüştür. Kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bitkilerden elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal ve antifungal etkileri, gram (+) bakteri olan *Staphylococcus aureus*, gram (-) bakteri olan *Escherichia coli* bakterilerine, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* mayalarına karşı belirlenmiştir. Antimikrobiyal özellikleri açısından sefepim, levoflaksasin, vankomisin antibiyotikleriyle, antifungal özellikleri bakımından ise flukonazol ile kıyaslanmıştır. Çalışma sonununda, *M. recutita* bitkisi *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakteri suşlarına karşı etki göstermişlerdir. Ayrıca, *Candida parapsilosis* mantar suşuna karşı etki gösterirken *Candida krusei* suşuna karşı herhangi bir etki göstermediği belirtilmiştir [81].

4.7 Diğer aktiviteler

M. recutita çiçek kısımlarından elde edilen ekstreler ve uçucu yağlar, birincil olarak başta antienflamatuvar aktivite olmak üzere yukarıda belirtildiği gibi antispazmodik, anksiyolitik, antimikrobiyal ve yara iyileştirici etkiler göstermektedir. Yukarıda belirtilen çalışmalar dışında bu bitkiden elde edilen ekstre veya uçucu yağların antiparazitik [82], antioksidan [83], antikanser [84], antidiyareik [85], antiülser [86], antihipertansif [87], antiplatelet [88], antigenotoksik [89], vazodilatör [90] ve

antihelmintik [91] etkileri üzerinde yapılan çalışmalarda da kayda değer olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

- A7G standardı (≥ %97, Sigma-Aldrich)
- Metanol (HPLC saflığında, Merck)
- Asetonitril (HPLC saflığında, Merck)
- Sitrik asit monohidrat (Analitik saflıkta, Merck)
- Folin & Ciocalteu fenol reaktifi (Analitik saflıkta, Merck)
- Alüminyum klorür (Analitik saflıkta, Merck)
- Sodyum karbonat (Analitik saflıkta, Isolab)
- orto-Fosforik asit (Analitik saflıkta, Merck)
- Sodyum hidroksit (Analitik saflıkta, Merck)
- Amonyak (Analitik saflıkta, Merck)
- Etanol %96 (Farmasötik saflıkta, Merck)
- Poloksamer 188 (Farmasötik saflıkta, Basf)
- Makrogol hidroksistearat (Farmasötik saflıkta, Basf)
- Sodyum askorbat (Farmasötik saflıkta, QLP)
- Sodyum asetat (Farmasötik saflıkta, Merck)
- Sodyum asetat trihidrat (Farmasötik saflıkta, Merck)
- İzopropil alkol (Farmasötik saflıkta, Merck)
- Gliseril monostearat (Farmasötik saflıkta, Basf)
- Setil alkol (Farmasötik saflıkta, Basf)
- Gliserin (Farmasötik saflıkta, Merck)

- Metil 4-hidroksibenzoat (Farmasötik saflıkta, Gujarat Organics)
- Spermaceti (Farmasötik saflıkta, Galenik Ecza)
- Beyaz balmumu (Farmasötik saflıkta, QLP)
- Badem yağı (Farmasötik saflıkta, Fitomer)

5.2 Bitki Materyallerinin Tanımlanması

2022 ve 2023 yıllarında Bandırma/Balıkesir bölgesinde yetiştirilen *M. recutita* bitkisinin çiçek kısımları kullanılmıştır. Arnavutköy/İstanbul bölgesinde yetiştirilen *M. recutita* çiçek başları 2023 yılında toplanmıştır. Asteraceae familyasından olan bitki materyalleri Dr. Ebru Özdemir Nath tarafından tayin edilmiştir. Herbaryum örnekleri Altınbaş Üniversitesi Herbaryumu'nda (Herbaryum numarası: HERA1237, HERA1241, HERA1236) saklanmaktadır.

5.3 Uçucu Yağ Eldesi ve Verimi

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş her bitki materyalinden 200 gram üç örnek halinde 3 saat boyunca EP'de tarif edilen Clevenger cihazı kullanılarak hidrodistilasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen uçucu yağlar susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarılarak analizler için 4°C'de amber renkli şişelere konulmuştur.

5.4 Uçucu Yağ Bileşiklerinin GC-FID/MS ile Analizi

M. recutita uçucu yağlarının bileşikleri GC-FID/MS yöntemi ile belirlenmiştir. Agilent 7890B GC-FID (Santa Clara, CA, ABD) ile Agilent 5977E elektron impakt kütle spektrometresi (Santa Clara, CA, ABD) iki yönlü kapiler ayırıcı ile bağlanarak uçucu yağların içerdiği bileşikler ölçülmüş ve tespit edilmiştir. Örnekler, otomatik enjektör Agilent G4513A (Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak 1 µL olarak enjekte edildi. DB-WAX kolonu (60m, 0.25mm, 0.25µm) kullanılarak sıcaklık programı ilk 15 dk için 70 ºC ve 2 ºC/dk ile 180 ºC'ye çıktı. Daha sonra 5 dk boyunca 180 °C'lik izotermal sıcaklığa devam edilerek kolon sıcaklığı 5 °C/dk ile 230 °C'ye çıkarıldı ve izotermal sıcaklıklar 15 dk boyunca 230 °C'ye ayarlandı. Split oranı 1:50'dir. Kuadrupol, iyon kaynağı, FID sıcaklıkları, MSD transfer hattı ve enjektör portu sıcaklıkları sırasıyla

150 °C, 230 °C, 220 °C, 250 °C ve 220 °C idi. Analiz süresi 100 dkdır ve taşıyıcı olarak helyum gazı kullanılmıştır (sabit akış hızı 1,5 mL/dk).

Kütle aralığı 45-450 m/z'dir. FID hava akışı 400 mL/dk olduğunda H_2 akışı 30 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrumları 70 eV'de gözlendi. Uçucu yağ bileşiklerinin tanımlanmasında, Wiley Kütle Spektral Verileri Kaydı, 9. baskı (Nisan 2011) ve NIST 11 Kütle Spektral Kütüphanesi'nden (NIST11/2011/EPA/NIH) elde edilen bileşiklerin kütle spektrumları karşılaştırılmıştır. Aynı çalışma koşulları için GC-FID/MS'de üç farklı eş zamanlı otomatik enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. DB-WAX kolonundaki bileşiklerin bağıl tutulma indeksine (RRI) dayalı tanımlama yöntemi, FID'deki doymuş n-alkan serisine (C7-C40) göre hesaplanarak gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar literatürdeki önceki çalışmalara ve NIST çevrimiçi web kitabına göre değerlendirilmiştir. Bağıl yüzdelerin hesaplanması, temsili bileşenlerin GC-FID analizlerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerine dayanan bir dış standart yaklaşımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

5.5 Bitki Materyallerinin Nem Tayini

Tıbbi papatyanın nem tayini EP çiçek monografına göre gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 1 gr bitki materyali 105 °C'de 2 saat boyunca OHAUS MB 35 Nem Tayin Cihazında bekletilerek nem oranı tayin edilmiştir [28].

5.6 Bitki Materyallerinin A7G İçeriğinin Analizi

A7G'nin analizi için numunelerin hazırlanmasında EP çiçek monografında yer alan yöntem kullanılmıştır. 40 g kurutulmuş bitki materyali toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitki materyalinin 2,00 g'ı 500 ml'lik balona konuldu. İçerisine 200 mL etanol (%96) eklendi. Karışım ısıtıcı üzerinde geri soğutucu altında 15 dk ısıtıldı. Daha sonra soğutuldu ve süzüldü. Süzüntü ve filtre az miktarda etanol (%96) ile yıkandı. Üzerine 10 mL sodyum hidroksit çözeltisi eklendi ve karışım ısıtıcı üzerinde geri soğutucu altında yaklaşık 1 saat ısıtıldı. Daha sonra, soğutuldu ve etanol (%96) ile 250,0 mL'ye seyreltildi. 50,0 mL çözeltiye 0,5 g sitrik asit monohidrat eklendi. 5 dk çalkalandı ve süzüldü. Çözücü karışımı ile 5,0 mL çözelti 10,0 mL'ye tamamlandı [28]. *M. recutita* çiçek kısımlarının A7G analizinde kullanılan referans çözeltisinin hazırlanma yöntemi, ekstrenin analizinde kullanılan yöntem ile aynıdır.

5.7 Ekstrelerin Hazırlanması

M. recutita çiçek kısımları kullanılarak, EMA'da yer alan "European Union herbal monograph on *M. recutita*, flos" monografı baz alınarak ilk yıl Bandırma/Balıkesir bölgesinden toplanan farklı çözücü sistemlerine sahip 14 farklı sıvı ve katı ekstrelerin 3'er kez deneme seri boyutundaki üretimleri gerçekleştirilmiştir [12]. Daha sonra, ekstrelerin uygulama yolları, dozaj şekli ve A7G içerikleri değerlendirilerek G, M ve N ekstreleri kullanılarak farmasötik ürünlerin geliştirilmesine karar verilmiştir. Bu ekstrelerin üç pilot ölçekte üretimleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki süreçte, 2023 yılında Bandırma ve Arnavutköy bölgesinden toplanan bitkilerin çiçek kısımlarından da G, M ve N ekstreleri hazırlanmıştır. EMA monografında yer alan ekstre bilgileri aşağıda yer alan Tablo 5.1'de belirtilmiştir.

Ekstrelerin hazırlanmasında, tıbbi papatyanın kurutulmuş çiçek başları öğütme makinesi (G1, Yazıcılar, Türkiye) ile yaklaşık 20 mm ile 40 mm boyutlarında toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilmiş çiçek kısımları oda sıcaklığında Tablo 5.1'de bulunan ekstraksiyon çözücülerinde 2 saat boyunca 1000 rpm'de (W3000-D, Wiggens, Çin) mekanik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Elde edilen ekstreler filtre kağıdından (20 µm, 40cmx40cm, Isolab, Almanya) süzülmüş ve rotary-evaporatör (G3, Heidolph, Almanya) kullanılarak, hedef ekstre oranları elde edilene kadar çözücüler buharlaştırılmıştır. Elde edilen ekstreler 4°C'de şişelerde saklanmıştır.

Tablo 5.1: *M. recutita* çiçek ekstreleri.

Ekstre Tipi	Bitki Miktarı (g)	Çözücü Miktarı (mL)	Final Ekstre Miktarı (g)	DER (Bitki/Ekstre Oranı)
Bandırma/Balıkesir (1.Yıl) /Deneme Ölçek				
B: Likit ekstre (DER 1:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %96	20	250	20	1 : 1
h/h:su:amonyak solüsyonu %10 a/a (50:47,5:2,5)	20	250	20	1 : 1
	20	250	20	1 : 1
C: Likit Ekstre (DER 1:4.3-5.7), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %96	10	125	50	1 : 5
h/h:su:amonyak solüsyonu %10 a/a (50:47.5:2.5)	20	250	100	1 : 5
	20	250	100	1 : 5
D: Likit Ekstre (DER 1:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %48	10	125	10	1 : 1
h/h:amonyak solüsyonu %10 a/a (39:1)	20	250	20	1 : 1
	20	250	20	1 : 1
E: Likit Ekstre (DER 1:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %45	10	125	10	1 : 1
h/h:amonyak solüsyonu %10 a/a (14.7:1)	20	250	20	1 : 1
	20	250	20	1 : 1
F: Katı Ekstre(DER 4-7:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %50 a/a	40	500	8,3	4,82 : 1
	40	500	7,6	5,26 : 1
	40	500	7,79	5,13 : 1
G: Likit Ekstre (DER 1:1.7-2.6), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %48	10	125	21,5	1 : 2,15
h/h	20	250	45	1 : 2,25
	20	250	45	1 : 2,25
H: Likit Ekstre (DER 1:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %55 h/h	10	125	10	1 : 1
	20	250	20	1 : 1
	20	250	20	1 : 1
I: Likit Ekstre (DER 1:2), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %70 h/h	10	125	20	1 : 2
	20	250	40	1 : 2
	20	250	40	1 : 2

Tablo 5.1 (devam): *M. recutita* çiçek ekstreleri.

Ekstre Tipi	Bitki Miktarı (g)	Çözücü Miktarı (mL)	Final Ekstre Miktarı (g)	DER (Bitki/Ekstre Oranı)
J: Likit Ekstre (DER 1:4.1-4.6), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %55 h/h:Poloxamer 188 (993:3)	10	66,6*	43,5	1 : 4,35
	20	133,2*	87	1 : 4,35
	20	133,2*	87	1 : 4,35
K: Likit Ekstre (DER 1:1.8-2.1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %52 h/h:makrogol hidroksistearat (99.5:0.5)	20	250	39	1 : 1,95
	20	250	39	1 : 1,95
	20	250	39	1 : 1,95
L: Likit Ekstre (DER 1:4-4.5) ekstraksiyon çözücüsü: etanol %38,5 a/a (%1,36 sodyum asetat trihidrat, %0,45 sodyum askorbat ve %0,41 sodyum hidroksit içeren)	10	125	42,5	1 : 4,25
	20	250	85	1 : 4,25
	20	250	85	1 : 4,25
M: Likit ekstre (DER 2.7-5.5:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit içeren)	40	500	10	4 : 1
	80	1000	20	4 : 1
	80	1000	20	4 : 1
N: Katı ekstre (DER 11-16:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit içeren)	67,5	843,75	6	11,25 : 1
	67,5	843,75	5,97	11,30 : 1
	67,5	843,75	5,77	11,70 : 1
O: Likit Ekstre (DER 1:2-2.8), ekstraksiyon çözücüsü: propan-2-ol %48 h/h	10	125	24	1 : 2,4
	20	250	49	1 : 2,45
	20	250	49	1 : 2,45
Bandırma/Balıkesir (1.yıl) /Pilot Ölçek				
G: Likit Ekstre (DER 1:1.7-2.6), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %48 h/h	100	1250	200	1 : 2
M: Likit ekstre (DER 2.7-5.5:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit içeren)	1200	15000	300	4 : 1
N: Katı ekstre (DER 11-16:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol %95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit içeren)	3000	37500	257,5	11,65 : 1

Tablo 5.1 (devam): *M. recutita* çiçek ekstreleri.

Ekstre Tipi	Bitki Miktarı (g)	Çözücü Miktarı (mL)	Final Ekstre Miktarı (g)	DER (Bitki/Ekstre Oranı)
Bandırma/Balıkesir (2.yıl) /Deneme Ölçek				
G: Likit Ekstre (DER 1:1.7-2.6), ekstraksiyon çözücüsü: etanol	40	500	90	1 : 2,25
%48 h/h	40	500	90	1 : 2,25
	40	500	90	1 : 2,25
M: Likit ekstre (DER 2.7-5.5:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol	120	1500	30	4 : 1
%95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit	120	1500	30	4 : 1
içeren)	120	1500	30	4 : 1
N: Katı ekstre (DER 11-16:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol	120	1500	9,56	12,55 : 1
%95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit	120	1500	10	12,00 : 1
içeren)	120	1500	10,43	11,50 : 1
Arnavutköy/İstanbul /Deneme Ölçek				
G: Likit Ekstre (DER 1:1.7-2.6), ekstraksiyon çözücüsü: etanol	40	500	90	1 : 2,25
%48 h/h	40	500	90	1 : 2,25
	40	500	90	1 : 2,25
M: Likit ekstre (DER 2.7-5.5:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol	120	1500	30	4 : 1
%95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit	120	1500	30	4 : 1
içeren)	120	1500	30	4 : 1
N: Katı ekstre (DER 11-16:1), ekstraksiyon çözücüsü: etanol	120	1500	9,99	12,01 : 1
%95,4 h/h (%0,22 sodyum asetat, %0,12 sodyum hidroksit	120	1500	10,03	11,96 : 1
içeren)	120	1500	9,98	12,02 : 1

*: Çözücü karışımı, Poloksamer 188'in maximum günlük alım dozu (1800 mg/gün) göz önünde bulundurularak g cinsinden tartılarak eklenmiştir.
a: ağırlık, h:hacim

5.8 *Matricaria recutita* L. Çiçek Ekstrelerindeki A7G Miktarının HPLC-PDA Yöntemi ile Belirlenmesi ve Validasyon Çalışmaları

M. recutita çiçek ekstrelerinin majör flavonoiti A7G'nin fotodiyot dizisi dedektörlü (PDA) yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) miktar tayini için metot validasyonu gerçekleştirilmiştir. EP *M. recutita* likit ekstre monografında, ekstrelerin A7G tayini için bir analiz yöntemi yer almamaktadır [92]. EP *M. recutita* çiçek monografındaki kromatografik koşullar modifiye edilerek (gradient sistemin uzatılması, kolon sıcaklığı, kolon sayısı) ve numune hazırlama basamağı ekstre analizi için geliştirilerek A7G içeriklerinin belirlenmesi için yeni bir analitik yöntem geliştirilmiştir [28]. İlk yıl Bandırma/Balıkesir bölgesinden toplanan farklı çözücü sistemlerine sahip 14 farklı sıvı ve katı ekstrelerin A7G içeriklerinin belirlenmesi bu yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin uygulama yolları, dozaj şekli ve A7G içerikleri değerlendirildikten sonra G, M ve N ekstreleri seçilerek, HPLC-PDA yönteminin metot validasyonu bu ekstreler (G, M, N) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uluslararası Harmonizasyon topluluğu (ICH) yönergelerine göre, HPLC-PDA yöntemi kesinlik, seçicilik, doğruluk, tespit limiti, tayin limiti, sağlamlık ve doğrusallık açısından geliştirilmiş ve doğrulanmıştır [93].

5.8.1 Numune hazırlanması

Numune hazırlanmasında, yaklaşık 1 mL sıvı ekstre veya 50 mg katı ekstre 50 mL erlenmeyere eklendi. 10 mL metanol ve 10 mL sodyum hidroksit çözeltisi (%8,5 g/mL) üzerine eklendi. Karışım, manyetik bir karıştırıcı yardımıyla 1 saat boyunca bir geri soğutucu altında ısıtıldı. Daha sonra, çözelti soğutuldu ve %0,5 orto-fosforik asit içeren su ve asetonitril 3:1 (h/h) karışımı ile 50,0 mL'ye seyreltildi. 50,0 mL çözeltiye 1,5 g sitrik asit monohidrat eklendi. 5 dk çalkalandı ve ardından analizden önce 0,45 µm RC filtreden süzülerek sisteme enjekte edildi. Standart çözeltisinin hazırlanmasında, 7,2 mg A7G standardı 50,0 mL metanolde çözündürüldü. Bu çözeltinin 25,0 mL'si, %0,5 orto-fosforik asit içeren su ve asetonitril 3:1 (h/h) karışımı ile 200,0 mL'ye seyreltildi.

5.8.2 Kromatografik koşullar

Cihaz: Shimadzu LC 2030C

Dedektör: Photodiode Array Detector (PDA)

Kolon: GLScience Inertsil ODS3 C18 (5 µm x 250 x 4.6 mm)

Dalga boyu: 340 nm

Enjeksiyon: 20 µL

Fırın sıcaklığı: 40 ^{0}C

Mobil faz (A): %0,5 orto-Fosforik asit -Su

Mobil faz (B): %0,5 orto-Fosforik asit -Asetonitril

Akış hızı: 1 mL/dk

Akış tipi: gradyan

Akış programı:

Dk 0-9– Mobil faz B: %25

Dk 9-19 –Mobil faz B: %25 → %75

Dk 19-24 – Mobil faz B: %75

Dk 24-25 – Mobil faz B: %75 → %25

Dk 25-50 – Mobil faz B: %25.

5.8.3 Seçicilik

Analitin saflığı, Likit Kromatografi İş İstasyonu aracılığıyla sağlanan yazılım kaynağıyla birlikte PDA'den elde edilen veriler kullanılarak, A7G'nin alıkonma zamanına süresine karşılık gelen bir alıkonma süresinde HPLC'den çıkan pik boyunca belirlendi.

5.8.4 Kalibrasyon eğrisi ve doğrusallık

A7G standardının farklı konsantrasyonları (0,001, 0,003, 0,01, 0,05, 0,1, 0,3 mg/mL) altı kez enjekte edildi ve hem doğrusallık faktörü hem de regresyon denklemi belirlendi.

5.8.5 Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Tespit sınırı (LOD), örnekteki bileşenin belirlenebildiği ancak kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük konsantrasyonudur. LOD hesaplaması, üç sinyal-gürültü (S/G) oranına göre yapıldı. Bir analitik yöntemin tayin sınırı (LOQ), örnekteki

bileşenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilen en düşük konsantrasyonudur. LOQ, on sinyal-gürültü oranında (S/G) hesaplandı. Gürültü seviyesi, ekstrelerden birinin analizi sırasında tespit edildi ve A7G pikinin bulunduğu bölgeden ayrılmış kromatogramın bir kısmını içermekteydi.

5.8.6 Doğruluk ve geri kazanım

Doğruluk ve geri kazanım, geliştirilen yöntemin üç farklı konsantrasyonla (%80, %100, %120) zenginleştirilmiş ekstrelere uygulanmasıyla belirlendi. Doğruluk, geri hesaplama ile değerlendirildi ve çalışılan üç farklı konsantrasyonda A7G miktarı ile eklenen miktar arasındaki yüzde sapma olarak belirtildi.

5.8.7 Sağlamlık

Analitik prosedürün sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki nispeten küçük miktardaki değişikliklerle kararlı kalma kapasitesinin ölçüsü olarak bilinir [93]. Sağlamlık testleri, kolonun sıcaklığını 50°C ve 30°C'ye değiştirerek, mobil fazın pH'ını %1,0 orto-fosforik asitle artırarak ve gradyan sistemini değiştirerek değerlendirilmiştir.

5.8.8 Kesinlik

Yöntem kesinliği, ara kesinlik (günler arası değişim), test konsantrasyonunun %100'ünde standart çözeltinin tespiti ile tekrarlanabilirlik üzerinde çalışıldı. Günler arası kesinlik, numunenin başka bir analist tarafından ve farklı günlerde analiz edilmesiyle tespit edildi. Yöntemin gün içi kesinliğini, değerlendirmek için numuneler bir gün içinde altı kez enjekte edildi.

5.9 Ekstrelere Ait Stabilite Çalışmaları

İlk yıl Bandırma/Balıkesir bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan üç ekstrenin (G, M, N) A7G içeriklerinin 2-8°C, 25°C/%60 RH ve 40°C/%75 RH sıcaklık koşullarında 6 aylık, 60°C koşulunda 3 aylık stabilitesi takip edilmiştir.

5.10 Total Fenolik Madde Miktar Tayini Yöntemi

Bandırma/Balıkesir ve Arnavutköy/İstanbul bölgelerinden toplanan bitkilerden hazırlanan G, M ve N ekstrelerinin toplam fenolik bileşikleri, modifiye edilmiş Folin Ciocalteu yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [94]. Bir dizi

gallik asit seyreltisi hazırlanarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Tüm ekstrelerin ve gallik asit seyreltilerinin test çözeltileri hazırlanmıştır. Mikro plakaya 104 µL saf su ve 8 µL numune eklenmiştir. Daha sonra, 8 µl Folin Ciocalteu Reaktifi (FCR) eklenmiştir. 5 dk bekledikten sonra, 80 µL %10'luk sodyum karbonat (Na_2CO_3) eklenmiştir. Test çözeltileri 90 dk karanlıkta bekletilmiştir. Ölçümler UV-VIS spektrofotometresinde (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) 725 nm'de alınmıştır. Örneklerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit miktarı, standart grafik denklemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, gallik asit eşdeğerinin yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

5.11 Total Flavonoit Madde Miktar Tayini Yöntemi

Bandırma/Balıkesir ve Arnavutköy/İstanbul bölgelerinden toplanan bitkilerden hazırlanan G, M ve N ekstrelerinin toplam flavonoit içerikleri alüminyum klorür yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [94]. Bir dizi kuersetin seyreltisi hazırlanarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Tüm ekstrelerin ve kuersetin seyreltilerinin test çözeltileri hazırlanmıştır. Mikro plakaya 134 µL saf su ve 20 µL numune eklenmiştir. Daha sonra, 6 µL %10 alüminyum klorür ($AlCl_3$) ve 40 µL 1M amonyum asetat (CH_3COONH_4) eklenmiştir. Test çözeltisi karanlıkta 10 dk bekletilmiştir. Ölçümler, bir UV-VIS spektrofotometresinde (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) 425 nm'de alınmıştır. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen kuersetin miktarı, standart grafik denklemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, kuersetin eşdeğerinin yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

5.12 Ekstrelerin Sıvı Kromatografisi ve Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrometresi (LC-HRMS) ile Fenolik Bileşen Tayini Yöntemi

Bandırma/Balıkesir ve Arnavutköy/İstanbul bölgelerinden toplanan bitkilerden hazırlanan G, M ve N ekstrelerinin fenolik bileşenleri LC-HRMS yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstre çözeltisinin 970 µL'sine metanol içindeki 1000 ppm stok çözeltisinden 30 µL dahili standart dihidrokapsaisin çözeltisi ilave edilmiştir.

LC-HRMS ölçümleri, Thermo ORBITRAP Q-EXACTIVE (Bremen, Almanya) kütle spektrometresi donanımlı ESI iyon kaynağı ve Dionex sıvı kromatografi (LC) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Tarama aralığı m/z 100-900 amu olarak ayarlanmış ve diğer

kütle parametreleri şu şekilde kullanılmıştır: gaz akış hızı: 45, yardımcı gaz akış hızı: 10, püskürtme voltajı: 3,80 kV, kapiler sıcaklık: 320 °C, yardımcı gaz ısıtıcısı sıcaklık: 320 °C ve S-lens RF 50'dir. Bileşiklerin ayrılması için bir Troyasil C18 kolonu (150 x 3 mm iç çap, 5 µm partikül boyutu, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Mobil fazlar A ve B sırasıyla %1 formik asit (EMSURE® Merck, Almanya)-su ve %1 formik asit-metanolden (Sigma-Aldrich, Almanya) oluşmuştur. Gradient programı 0-1,00 dk %50 A ve %50 B; 1,01-6,00 dk %100 B ve son olarak 6,01-15 dk %50 A ve %50 B idi. Mobil fazın akış hızı 0,35 mL/dak idi. Kolon sıcaklığı 22°C'dir. Çevre koşulları sıcaklık 22,0 ± 5,0 °C ve bağıl nem (50 ± 15) % bağıl nem olarak ayarlanmıştır. Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER) Kütüphanesi'nde bulunan bileşiklerin alıkonma süreleri ve hedef iyonları karşılaştırılarak bileşikler tanımlanmıştır.

5.13 Topikal Ürünlerin Formülasyonu

EMA'da yer alan "European Union herbal monograph on *M. recutita* L., flos" monografı kapsamında; G ekstresi direkt olarak çözelti formunda oral, inhalasyon, oromukozal, kutanöz ve banyo katkı maddesi gibi kullanım yollarına sahiptir. G ekstresi direkt olarak çözelti formunda müstahzar olarak kullanıldığı için G ekstresi ile ilgili formülasyon çalışması gerçekleştirilmemiştir. M ve N ekstreleri ise topikal yarı katı dozaj formunda müstahzar olarak kullanılabilmektedir [12]. Bu bilgiler ışığında, M ve N ekstrelerini içeren topikal krem müstahzarları formüle edilmiştir. Yüksek fenolik, flavonoit miktar ve A7G içeriğine sahip olması nedeniyle, Arnavutköy/İstanbul bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan ekstreler kullanılarak krem ürünleri formüle edilmiştir.

5.13.1 M ekstresini içeren topikal krem formülasyonunun hazırlanması

Arnavutköy/İstanbul bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan M ekstresini içeren topikal krem'in (M1) formüle edilmesi amaçlanmıştır. Referans ürün olarak MEDA pharma tarafından üretilen Kamillosan® Krem (Hamburg, Almanya) baz alınmıştır. Kamillosan® Krem'in (Lot no:326670) A7G içeriğine eşdeğer M ekstresini içeren vanishing formda topikal krem (M1) formüle edilmiştir.

Formülasyon çalışmalarında, daha önce gerçekleştirilen bazı çalışmalar ve derleme göz önünde bulundurularak birim formül ve üretim yöntemi dizayn edilmiştir [95-97].

Srivastava ve Siddiqui tarafından yayımlanan derlemede, emülgatörler, antimikrobiyal koruyucular ve pH ajanları gibi faktörlerin bitkisel krem formülasyonu için ürün stabilitesini sağladığı belirtilmiştir [95]. Bu faktörler göz önünde bulundurularak, test kreminin formülasyonunda emülgatörler (gliseril monostearat, setil alkol, stearik asit), bir antimikrobiyal koruyucu (metil 4-hidroksibenzoat) ve bir pH ajanı (sodyum hidroksit) kullanılmıştır. Uddin ve arkadaşları tarafından, yağ fazının hazırlanması, su fazının hazırlanması ve daha sonra su fazının yağ fazına eklenmesini içeren bir üretim yöntemi kullanarak poliherbal bir ekstre içeren bir krem formüle edilmiştir. Kremin 40°C'de bir ay boyunca fizikokimyasal stabilite gösterdiğini bildirmişlerdir [96]. Bu üretim yöntemi, mevcut formülasyon geliştirme çalışmalarında da benzer şekilde kullanılarak su/yağ formunda krem elde edilmiştir.

Üretilen topikal krem, sıvı M ekstresi, stearik asit, gliseril monostearat, setil alkol, gliserin, sodyum hidroksit, metil 4-hidroksibenzoat ve distile su içermektedir. Birim formül Tablo 5.2'de sunulmuştur.

Tablo 5.2: M ekstresi içeren topikal kremin birim formülü.

Hammaddeler	**Birim Formül (mg/g)**	**Birim Formül (%)**
M ekstresi	31,4	3,14
Stearik asit	170,0	17,00
Gliseril monostearat	10,0	1,00
Setil alkol	10,0	1,00
Gliserin	60,0	6,00
Metil 4-hidroksibenzoat	1,5	0,15
Sodyum hidroksit	2,5	0,25
Distile su	714,6	71,46
TOPLAM	**1,0 g**	**100,0**

200 gr seri boyutunda gerçekleştirilen üretim prosesi aşağıdaki adımları kapsamaktadır; ana kazana tartılan yağ fazı (stearik asit, gliseril monostearat, setil alkol) 70°C'ye ısıtılarak eritildi. Yardımcı kazan-1'de bir miktar distile su (%50'si) içerisinde sodyum hidroksit çözündürüldü. Daha sonra üzerine gliserin eklenerek 5-10 dk karıştırıldı. Su fazı, yağ fazı ile aynı sıcaklığa gelene kadar ısıtıldı. Yardımcı kazan-1'deki karışım yağ fazına aktarıldı ve karıştırmaya bir ısıtıcı üzerinde 30 dk devam edildi. Yardımcı kazan-2'de kalan distile su (%50'si) içerisinde 95°C'de metil 4-hidroksibenzoat ve 70°C'de sıvı M ekstresi sırasıyla çözündürüldü. Karışım 70°C'deyken ana kazana eklendi. Ekleme işlemi tamamlanınca oda sıcaklığına gelene kadar 40 dk karıştırıldı.

Referans Kamillosan® Krem, kontakt dermatit, endüstriyel egzama, çocuk egzaması ve nörodermatit (atopik egzama) gibi iltihaplı cilt hastalıklarının lokal kortikosteroid tedavisinden sonra takip tedavisinde kullanılmaktadır. Kamillosan® Krem, sıvı papatya ekstresi (%95,4 h/h etanol (0,22% sodyum asetat trihidrat, %0,12 sodyum hidroksit içeren) İlaç/Ekstre Oranı (DER) 2,7-5,5:1), metil 4-hidroksibenzoat, propil 4-hidroksibenzoat, setil stearil alkol, hidrojene fıstık yağı, lanolin alkolleri, gliseril monostearat, sodyum setil stearil sülfat, izopropil miristat, gliserin ve saf su içermektedir.

5.13.2 N ekstresini içeren topikal krem formülasyonunun hazırlanması

Arnavutköy/İstanbul bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan N ekstresini içeren topikal krem'in (N1) formüle edilmesi amaçlanmıştır. Referans ürün olarak MEDA pharma tarafından üretilen Kamillosan Salbe® merhem (Hamburg, Almanya) baz alınmıştır. Kamillosan Salbe®'nin (Lot no:327601) A7G içeriğine eşdeğer N ekstresini içeren cold formda su/yağ tipinde yağlı topikal krem (N1) formüle edilmiştir.

Formülasyon çalışmalarında, daha önce gerçekleştirilen çalışmalar göz önünde bulundurularak birim formül ve üretim yöntemi dizayn edilmiştir. Türk kodeksi standartları ve kozmetik bilimi teknolojisi el kitabında yer alan datalar göz önünde bulundurularak topikal ürün formüle edilmiştir [98-100].

Üretilen topikal krem, katı N ekstresi, beyaz balmumu, spermaceti, badem yağı, metil 4-hidroksibenzoat ve distile su içermektedir. Birim formül Tablo 5.3'te sunulmuştur.

Tablo 5.3: N ekstresi içeren topikal kremin birim formülü.

Hammaddeler	**Birim Formül (mg/g)**	**Birim Formül (%)**
N ekstresi	13,3	1,33
Beyaz balmumu	70,0	7,00
Spermaceti	80,0	8,00
Badem yağı	600,00	60,00
Metil 4-hidroksibenzoat	1,50	0,15
Distile su	235,2	23,52
TOPLAM	**1,0 g**	**100,0**

300 gr seri boyutunda gerçekleştirilen üretim prosesi aşağıdaki adımları kapsamaktadır; ana kazana tartılan yağ fazı (badem yağı, beyaz balmumu, spermaceti) 70°C'ye ısıtıldı. Yardımcı kazan'da distile su içerisinde 95°C'de metil 4-hidroksibenzoat ve 70°C'de katı N ekstresi sırasıyla eklendi ve karıştırıldı. Karışım

70°C'deyken ana kazana eklendi. Ekleme işlemi tamamlanınca oda sıcaklığına gelene kadar 40 dk karıştırıldı.

Referans Kamillosan Salbe® merhem ciltte ve mukoza zarının iltihaplanmasında kullanılmaktadır. Merhem ayrıca hemoroid tedavisi de dahil olmak üzere anal ve genital bölgede topikal kullanıma sahiptir. Kamillosan Salbe® merhem, katı papatya ekstresi (%95,4 h/h etanol (0,22% sodyum asetat trihidrat, %0,12 sodyum hidroksit içeren)-Bitki/ekstre Oranı (DER) 15-25:1), disperse silikon dioksit, lanolin (bütil hidroksitoluen içeren), sarı vazelin, gliserin, esanslar ve saf su içermektedir.

5.14 Topikal Ürünlerin Fiziko-Kimyasal Karakterizasyonu ve Stabilitesi

M1 ve N1 test ürünleri ile referans Kamillosan® ürünlerinin fiziko-kimyasal özellikleri bakımından kıyaslamaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, M ve N ekstresini içeren topikal ürünlerin 25°C/%60 RH ve 40°C/%75 RH sıcaklık koşullarında 3. Ay ve 6. Ay periyotlarında stabiliteleri takip edilmiştir. Ürünler 6 ay boyunca alüminyum tüplerde saklanmıştır. Ürünlerin stabilite değerlendirmesi görünüş, pH, reolojik davranış ve A7G'nin miktar tayini testlerini içermektedir.

5.14.1 Görünüş ve pH

Topikal ürünlerin görünüşü (yani koku, renk, kıvam) görsel olarak değerlendirilmiştir. Ürünlerin pH'ı 25 ± 2 °C'de kalibre edilmiş bir pH metre ile ölçülmüştür (Ohaus ST300, ABD).

5.14.2 A7G içeriğinin belirlenmesi

Topikal ürünlerdeki A7G'nin kantitatif analizi için analitik yöntem olarak HPLC-PDA yöntemi kullanılmıştır. Numunelerin hazırlanmasında, yaklaşık 500 mg topikal ürün 100 mL'lik bir erlenmeyer şişesine yerleştirildi. Daha sonra, içine 20 mL metanol ve 2 mL sodyum hidroksit çözeltisi (%8,5 g/mL) eklendi. Karışım, manyetik bir karıştırıcıda 1 saat boyunca bir geri soğutucu altında ısıtıldı. Daha sonra, çözelti soğutuldu ve %0,5 orto-fosforik asit içeren su ve asetonitril 3:1 (h/h) karışımı ile 100,0 mL'ye seyreltildi. 100,0 mL çözeltiye 1,0 g sitrik asit monohidrat eklendi. Karışım 5 dk çalkalandı ve ardından HPLC analizinden önce 0,45 µm RC ile filtrelendi ve sisteme enjekte edildi.

5.14.3 Reolojik ölçümler

Test ve referans ürünlerinin akış özelliklerini incelemek amacıyla literatürdeki yöntemler modifiye edilerek çalışılmıştır [101, 102]. Test ve referans ürünlerin reolojik özellikleri, Thermo Scientific HAAKE RS1 reometresi ve konik plaka sensörü (C35 TiL, 1˚ konik açı, 53 µm boşluk genişliği) ile "kayma hızı artışı" testi kullanılarak karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu test yönteminde, numunelerin akış özelliklerini ölçmek için plaka üzerine yaklaşık 1 gram numune yerleştirilmiştir. Sıcaklık 25°C±2°C'ye ayarlanmıştır. Numunelerin sıcaklığının sabitlenmesi için 60 sn beklenmiştir. Testler, 120 sn boyunca 0-1000 1/s rpm kayma hızı aralığında 120 veri alınacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her numune için n=3 çalışılmıştır.

5.15 Referans ve Test Ürünlerin *In-Vitro* Salım Profillerinin Karşılaştırması

Tez çalışmalarında M1 test kremi ile referans Kamillosan® krem, N1 test kremi ile referans Kamillosan Salbe® merhem ürünlerinin *in vitro* salım profillerinin kıyaslaması gerçekleştirilmiştir.

In vitro ilaç salım çalışmaları, yarı katı dozaj formlarının *in vitro* performans çalışmalarında yaygın olarak kullanılan 1,77 cm^2'lik etkili difüzyon alanına ve 500 rpm'lik dönüş hızına sahip modifiye edilmiş bir Franz tipi difüzyon hücresi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (PermeGear, V6A Karıştırıcı, ABD). Reseptör haznesi, batma koşulu korunarak 12 mL PBS (fosfat tamponlu salin) pH 7,4 ve etanol (%50) ile doldurulmuştur. Diyaliz membranı (Sigma Aldrich, diyaliz tüpü selüloz membran Lot 3110; ABD) en az 18 saat boyunca bir reseptör ortamında ıslatılmıştır. 400 mg numune, etkili yüzey alanını tamamen kaplayacak şekilde donör hücrelerin üzerine yerleştirilmiştir [103]. Reseptör fazı, manyetik bir çubukla sürekli karıştırılarak 32ºC'de tutulmuştur. Test ve referans ürünler difüzyon hücrelerinin donör bölmesine yukarıya doğru yerleştirilerek etkili yüzey alanını tamamen kaplanması sağlanmıştır (n=6). Donörler, buharlaşmayı önlemek için formülasyon eklendikten hemen sonra parafilm ile kapatılmıştır.

Formülasyonların ilaç salınımı 6 saat boyunca takip edilmiştir. Analiz için uygun zaman aralıklarında (1, 2, 3, 4, 5 ve 6 saat) 1 mL'lik numuneler çıkarılmış ve hemen taze reseptör ortamıyla değiştirilmiştir [104]. Numuneler 0,45 µm HPTFE filtrelerden

(CHROMAFIL®XTRA H-PTFE-45/13) filtrelenmiştir. Numuneler, valide edilmiş HPLC-PDA yöntemi ile A7G içerikleri açısından analiz edilmiştir.

5.16 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

Tez çalışmalarında, Bandırma/Balıkesir (1.yıl) ile Arnavutköy/İstanbul bölgelerinden toplanan bitkinin çiçek kısımlarından elde edilen M ekstreleri ve daha iyi stabilite sonuçları elde edilen M1 krem ve referans Kamillosan® krem ürünlerinin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amacıyla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin ve topikal ürünlerin hücre canlılık profili ve apoptotik etkisi fibroblast (CCD-1079Sk) ve melanom (SK-MEL-28) hücre hatlarında değerlendirilmiştir.

5.16.1 Hücre kültürünün hazırlanması

SK-MEL-28 (insan melanom hücreleri, ATCC, HTB-72) ve CCD-1079Sk (insan normal deri fibroblast hücreleri, ATCC, CRL-2097) hücre hatları başlangıçta kültür ortamına ekilmiş ve %10 FBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), %1 penisilin/streptomisin (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) ile desteklenmiş DMEM'de çoğaltılmıştır. Hücre hatları 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2'li nemli bir ortamda tutulmuştur. Kültür ortamı hücreler %80 konfluent hale gelinceye kadar kadar her iki günde bir değiştirilmiştir.

5.16.2 Hücre canlılığı analizi

3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür (MTT) ekstrelerin, A7G ve apigenin bileşiklerinin sitotoksisitesini değerlendirmek için kullanılmıştır. Hücreler, kuyucuk başına $5x10^3$ hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalarda çoğaltılmıştır. Toplamda, konfluent hücrelerin %70 ila %80'i (24 saat sonra) 24 ve 48 saat boyunca büyüme ortamında farklı konsantrasyonlarda ekstreler, A7G ve apigenin (1% DMSO içeren bir ortamda hazırlanmış) ile muamele edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda, 0,5 mg/mL'lik son konsantrasyon elde etmek için kuyucuklara MTT çözeltisi eklenmiştir. Hücreler daha sonra 37 °C'de 3,5 saat daha inkübe edilmiştir. Formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiştir. Optik yoğunluk, bir ELISA mikro plaka okuyucusu kullanılarak 540 nm'de ölçüldü ve doğrudan canlı hücre sayısıyla ilişkilendirildi. Her konsantrasyon

için, ölçümün en az üç kez tekrarlandığı veriler karşılaştırılmıştır. Göreceli % hücre canlılığı ve IC_{50} değerleri, grafiğin konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak çizilmesiyle belirlenmiştir. İşlem görmemiş hücreler kontrol ve hücresi olmayan ortam arka plan kontrolü olarak kabul edilmiştir. Bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için, bileşik içeren işlem görmemiş hücreler %100 canlı kabul edilmiş ve hücre canlılığı denklem 5.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{Hücre canlılığı} = (\text{Örnek}\ /\text{kontrol})\ \times 100 \tag{5.1}$$

M1 krem ve Kamillosan® kremin sitotoksisitesinin belirlenmesi için, SK-MEL-28 ve CCD-1079Sk hücreleri 24 kuyulu bir plakaya ekilmiştir ve yarı-konfluent olana kadar (24 saat) inkübe edilmiştir. Daha sonra numuneler doğrudan temas için bir mumlu kağıdın yüzeyine uygulanmış ve hücre yüzeyindeki test maddesiyle kuyulara yerleştirilmiştir. Mumlu kağıtlar, kuyuların 1:10 yüzey alanına uyacak şekilde hazırlanmıştır ve sterilize edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra, her numune için formazan oluşumu belirlenmiştir ve değerler kontrol kültürlerinden elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Hücrelerin canlılığı, 540 nm'de optik yoğunluk olarak okunan mavi-mor formazan miktarıyla doğrudan ilişkilendirilmiştir [105].

5.16.3 Apoptoz analizi

Örneklerin apoptotik etkileri, PI'li bir FITC Annexin V Apoptozis Tespit Kiti ile bir Flow sitometri (BD Accuri C6) kullanılarak analiz edilmiştir. Apoptozis testi için, CCD1079-Sk ve SK-MEL-28 hücreleri ayrı ayrı 24 kuyulu plakalara (kuyucuk başına $2x10^5$ hücre) ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler örneklerle muamele edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra, örnekleri içeren büyüme ortamı çıkarılmıştır ve iki kez PBS ile, ardından bir kez bağlama tamponu ile yıkanmıştır. Hücreler tripsinizasyonla toplanmıştır ve $1x10^6$ hücre/mL'de Annexin V bağlama tamponunda yeniden süspanse edilmiştir. 100 µL hücre süspansiyonuna 2,5 µL FITC Annexin V eklenmiştir. Hücreler oda sıcaklığında karanlıkta 15 dk inkübe edilmiştir. Hücreler 5 dk santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı atılmıştır. 2,5 µL PI, 100 µL hücre süspansiyonuna aktarılmıştır. 15 dklık bir inkübasyon süresinden sonra hücreler bir Flow sitometri ile analiz edilmiştir [106].

6. BULGULAR ve TARTIŞMA

6.1 Uçucu Yağ Eldesi ve Verimi

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş her bitki materyalinden 200 gram üç örnek halinde 3 saat boyunca EP'de tarif edilen Clevenger cihazı kullanılarak hidrodistilasyona tabi tutulmuştur ve uçucu yağlar elde edilmiştir. Uçucu yağ verimleri Tablo 6.1'de verilmektedir.

Tablo 6.1: Örneklerin uçucu yağ verimleri.

Örnekler	Uçucu Yağ Verimi (mL/100 g)
Bandırma/Balıkesir (1.yıl)	0,50 ± 0,02
Bandırma/Balıkesir (2.yıl)	0,48 ± 0,01
Arnavutköy/ İstanbul	1,22 ± 0,03

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

EP tıbbi papatya çiçek monografına göre *M. recutita* uçucu yağı minimum 4 mL/kg kurutulmuş bitki materyali, yani 100 g kurutulmuş bitki materyali minimum 0,4 mL uçucu yağ içermelidir [28]. Bu kapsamda bitki örneklerinin hepsi EP'de belirtilen limitler dahilinde bulunmuştur. Arnavutköy bölgesinden elde edilen uçucu yağ yüksek kamazulen içeriği nedeniyle mavi, Bandırma bölgesinden elde edilen uçucu yağlar ise düşük kamazulen içeriği nedeniyle sarımsı renktedir.

6.2 Uçucu Yağ Bileşiklerinin GC-FID/MS ile Analizi

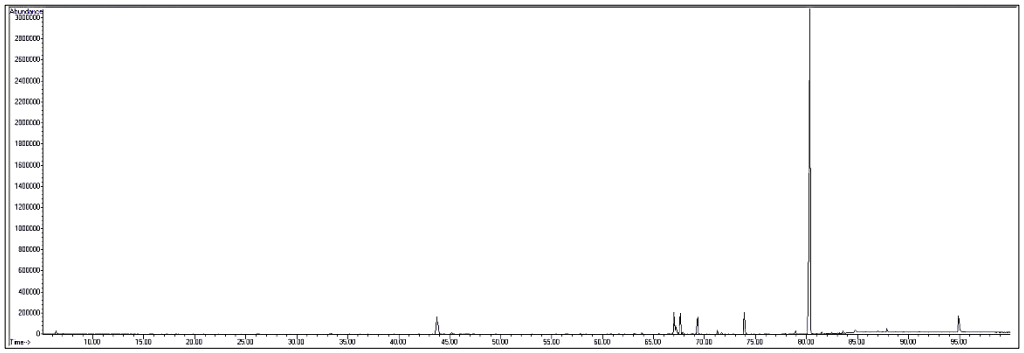
Bandırma/Balıkesir bölgesinden iki farklı yıllarda toplanan bitkiden elde edilen uçucu yağlar başta bisabolol oksit A olmak üzere *cis-β*-farnesen, bisabolol oksit B ve bisabolon oksit bileşiklerini majör olarak içermektedir. Arnavutköy/İstanbul bölgesinden toplanan bitkiden elde edilen uçucu yağ ise başta *cis-β*-farnesen olmak üzere germakren-D, bisiklogermakren, bisabolol oksit A ve B, bisabolon oksit ve kamazulen bileşiklerini majör olarak içermektedir (Tablo 6.2).

Tablo 6.2: *M. recutita* çiçek uçucu yağların kimyasal bileşimleri.

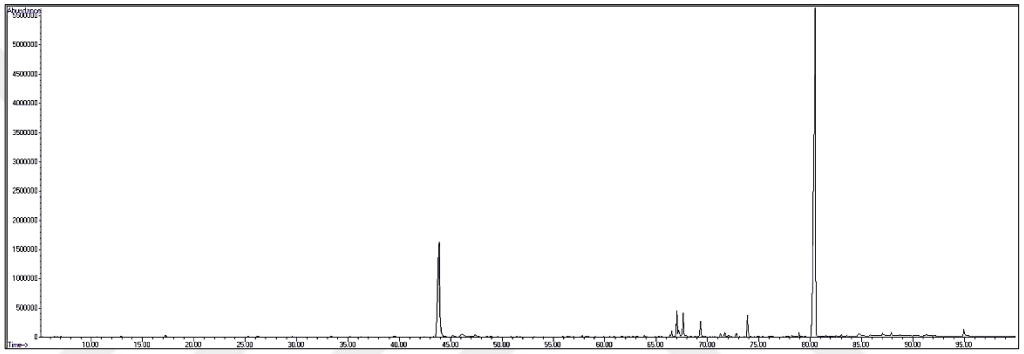
No	Bileşikler	KI	RRI	Bandırma/ Balıkesir (1.yıl)	Bandırma/ Balıkesir (2.yıl)	İstanbul/ Arnavutköy
				İçerik (%)		
1	*α*-Pinen	1018-1032[a]	1026	0,387±0,006	-	-
2	*cis*-Osimen	1028-1047[a]	1039	-	-	0,502±0,003
3	Artemisia keton	1050-1071[a]	1062	-	-	1,700±0,012
4	Artemisia alkol	1072–1092[a]	1080	-	-	0,501±0,005
5	Limonen dioksit	MD	1110	-	-	0,177±0,001
6	Lavandulol	1145–1168[a]	1165	-	-	0,171±0,004
7	*p*-Simen	1264-1280[a]	1275	0,175±0,009	-	-
8	Octanal	1296[c]	1301	-	0,224±0,002	-
9	Yomogi alkol	1377-1405[a]	1390	0,274±0,019	-	0,628±0,004
10	*trans*-Nerolidol	1539-1570[a]	1564	-	-	0,293±0,002
11	*β*-Farnesen, *cis*-	1638-1667[a]	1664	6,443±0,061	21,090±0,153	33,761±0,120
12	*endo*-Borneol	1690-1719[a]	1698	0,726±0,066	0,340±0,005	-
13	Germakren-D	1699-1726[a]	1703	-	0,714±0,009	5,703±0,027
14	Bisiklogermakren	1723-1751[a]	1732	-	0,526±0,068	5,356±0,019
15	Denderalasin	MD	1925	-	0,160±0,001	-
16	Kaprilik asit	MD	1992	-	0,170±0,002	-
17	*7*-Hidroksi farnesen	1658-2260[b]	2022	-	0,229±0,002	0,805±0,002
18	*cis*-Lanceol	MD	2040	-	0,520±0,001	0,405±0,000
19	*b*-Tumeron	MD	2044	-	-	0,358±0,001
20	Metil oktadekanoat	2110-2139[a]	2136	-	-	0,145±0,001
21	Spathulenol	2117–2144[a]	2143	3,731±0,039	2,702±0,011	1,660±0,000
22	Santalol	MD	2050	2,137±0,085	0,976±0,009	-
23	Bisabolol oksit B	1646-2115[b]	2070	3,936±0,183	2,584±0,008	15,850± 0,018
24	Bisabolon oksit	1735-2400[b]	2090	3,508±0,004	1,872±0,006	10,767±0,020
25	*a*-Bisabolol	2204-2232[a]	2224	0,741±0,004	0,407±0,004	-
26	Bergamotol, *z-a-trans*	2241-2247[d]	2244	-	0,350±0,001	-
27	*n*-Kaprik asit-Dekanoik asit	2261-2296[a]	2272	4,414±0,027	2,476±0,007	-
28	Leden oksit (II)	MD	2299	-	0,099±0,001	-
29	Kamazulen	1711-2380[b]	2330	0,485±0,004	0,316±0,003	12,768± 0,092
30	Bisabolol oksit A	1735-2400[b]	2370	72,603±0,336	63,052±0,103	7,462± 0,139
31	Etil linoleat	2613[e]	2541	-	0,173±0,013	-
32	Miristik asit	2670[e]	2572	-	0,223±0,002	-
Toplam tanımlanan bileşiklerin miktarı (%)				**99,560**	**99,202**	**99,844**
Monoterpen hidrokarbon (1, 2, 7)				0,562	-	0,502
Seskiterpen hidrokarbon (11, 13, 14, 29)				6,928	22,646	57,588
Oksijenli monoterpen (3-6, 9, 12)				1,000	0,340	3,177
Oksijenli seskiterpen (10, 15, 17-19, 21-26, 28, 30)				86,656	72,951	37,600
Yağ asitleri (16, 27, 31, 32)				4,414	3,042	-
Diğerleri (8, 20)				-	0,224	0,145

RRI: n-alkanlara karşı hesaplanan bağıl tutma indeksleri; % FID verilerinden hesaplanmıştır.
MD: Güncel literatürde mevcut değildir.
KI, çoğunlukla her bileşik için RI veri aralıklarından elde edilen literatürlerden verilmiştir (a: [107], b: [108], c: [109], d: [110], e: [111].

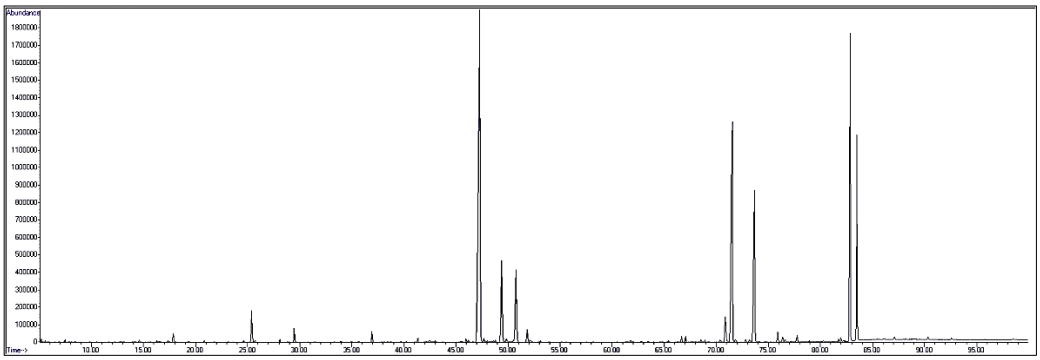
İlgili bileşiklere ait GC kromatogramları Şekil 6.1, Şekil 6.2 ve Şekil 6.3'te sunulmaktadır.



Şekil 6.1: Uçucu yağ kromatogramı (Bandırma, 1.yıl).



Şekil 6.2: Uçucu yağ kromatogramı (Bandırma, 2.yıl).



Şekil 6.3: Uçucu yağ kromatogramı (Arnavutköy).

Bitkilerdeki uçucu yağların içeriği ve bileşimi iklimsel, çevresel ve diğer faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu faktörler tek başlarına veya kombinasyon halinde, bitkilerdeki uçucu yağların hem içeriği hem de bileşimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [112]. Gosztola ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, güneşli saatlerin sayısının azalması ve bol yağmurun *α*-bisabolol'ün oksidasyonu için elverişsiz koşullar sağladığını ve birikmesine neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmada, kamazulen, *a*-bisabolol oksit A ve B miktarlarının önemli ölçüde değişiklik

göstermediği gözlemlenmiştir [36]. Başka bir çalışmada bitkini tam çiçeklenme döneminde, bitkinin daha fazla güneş ışığına ve sıcaklığa maruz kalması nedeniyle daha fazla uçucu yağ verimi elde edilmiştir [112].

Bettray ve Vomel'in *M. recutita* üzerindeki çalışma, bitkinin uçucu yağ verimi, *a*-bisabolol ve kamazulen miktarının daha yüksek hava sıcaklıklarında arttığınını bildirmektedir [113]. Farklı bir çalışma, yüksekliğin *M. recutita* uçucu yağ verimi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir [114].

Bandırma bölgesinden farklı yıllarda toplanan bitkilerin aynı şartlarda (yükseklik, toprak yapısı) yetiştirilip hasat edilmesi nedeniyle, uçucu uçucu yağ veriminde ve uçucu yağ bileşenlerindeki küçük varyasyonların gözlemlenmesinde büyük ölçüde iklimsel faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Arnavutköy bölgesinde yetiştirilip toplanan tıbbi papatya'dan elde edilen uçucu yağ verimi ve uçucu yağ bileşenlerinin Bandırma bölgesinden toplanan uçucu yağlara göre majör farklılıklar göstermesinde tohum tipi, toprak yapısı, kuraklık, yükseklik, yağış miktarı ve güneşli gün sayısı gibi birçok çevresel ve iklimsel faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

6.3 Bitki Materyallerinin Nem Tayini Analizi Bulguları

EP monografına göre kurutulmuş *M. recutita* çiçekleri maksimum % 12 nem içermelidir [28]. Nem oranları Bandırma (1.yıl) örneği için %10,10, Bandırma (2.yıl) örneği için %9,58 ve Arnavutköy örneği için % 9,62 olarak analiz edilmiştir. Nem tayini sonuçları EP monografı dahilinde olup, Tablo 6.3'te sunulmaktadır.

Tablo 6.3: Bitki materyallerinin nem içerikleri.

Örnekler	Nem içeriği (%)
Bandırma/Balıkesir (1.yıl)	10,10 ± 0,19
Bandırma/Balıkesir (2.yıl)	9,58 ± 0,18
Arnavutköy/ İstanbul	9,62 ± 0,20

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

6.4 Bitki Materyallerinin A7G Analizi Bulguları

M. recutita çiçeklerinin A7G içerikleri analiz edilmiştir. Sonuçlar, valide edilen HPLC-PDA yöntemindeki kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. EP

monografına göre *M. recutita* kurutulmuş çiçek kısımları ağırlıkça minimum %0,25 A7G içermelidir. A7G içerikleri Bandırma (1.yıl) örneği için %0,725, Bandırma (2.yıl) örneği için %0,425 ve Arnavutköy örneği için %1,128 olarak analiz edilmiştir. A7G içerik analiz sonuçları EP monografı dahilinde olup, Tablo 6.4'te sunulmaktadır.

Tablo 6.4: Bitki materyallerinin A7G içerikleri.

Örnekler	**A7G içerikleri % (g/g)**
Bandırma/Balıkesir (1.yıl)	0,725 ± 0,011
Bandırma/Balıkesir (2.yıl)	0,425 ± 0,006
Arnavutköy/ İstanbul	1,128 ± 0,014

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Bitki büyümesi çevresel, iklimsel ve diğer faktörlerden etkilenebilir. Bu nedenle, ekim alanının yoğunluğu, bitkiyi toplandıktan sonra uygulanan kurutma yöntemi ve kurutma sıcaklığı, depolama koşulları, ekim zamanı, hasat zamanı ve bitki olgunluğu, iklim koşulları, toprak yapısı ve bir çok etken bitkinin içeriğinde hem niteliksel hem de niceliksel olarak farklılıklara neden olmaktadır [15, 29-36].

Benkovic-Lacic tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, kurutma yöntemlerinin tıbbi papatyanın kimyasal profilinde farklılıklara yol açtığı gözlemlenmiştir ve yüksek sıcaklıklarda bitkiyi kurutmanın polifenolik bileşikler üzerinde önemli derecede olumsuz bir etkisi olmuştur [31]. Farklı çalışmalarda, *M. recutita*'nın depolama sırasında A7G kaybının artan sıcaklık koşullarıyla birlikte yavaşça arttığı gözlemlenmiştir [32, 33]. Tıbbi papatya bitkisini terapötik amaçlarla toplamak için en uygun zaman, tam çiçeklenme zamanı olarak belirtilmiştir [32].

Önceki çalışmalarda, ilkbahar ve sonbahar ekiminin *M. recutita* 'nın hasat sonrası A7G miktarındaki değişimlere doğrudan bir etkisi olup olmadığı tam olarak belirlenememiştir [33,34]. Fakat, Dadkhah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sonbahar ekiminde bitki boyu, çiçeklenme süresi ve verimin ilkbahar ekimine göre önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur [15].

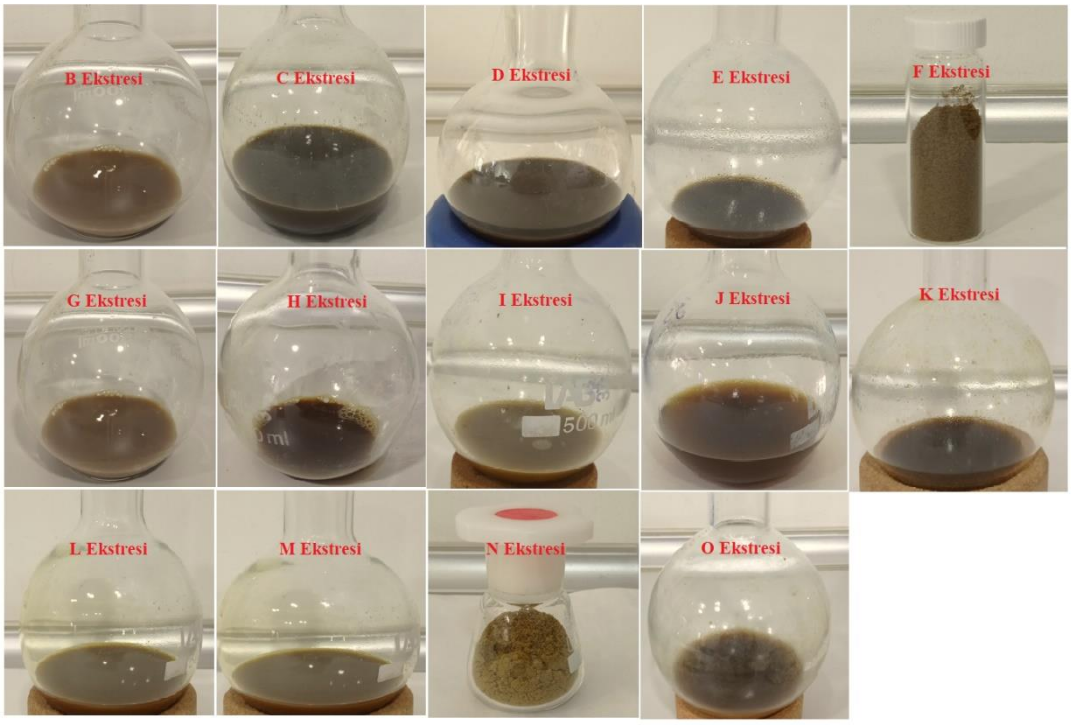
Baghalian ve Afzali tarafından gerçekleştirilen iki farklı çalışmada, A7G içeriğinin artan kuraklık stresi koşulları altında azaldığı bildirilmiştir. [115,116]. Gosztola ve arkadaşları, farklı hava koşullarında en yüksek apigenin içeriğinin havanın kuru, sıcak ve güneşli olduğu zamanlarda elde edildiğini belirlemiştir [117].

Tüm bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar dahilinde, Bandırma bölgesinden farklı yıllarda toplanan bitkiler için toprak yapısı, ekim ve hasat zamanı, toplanma sırasında

bitki olgunluğu, toplanan bitkinin depolama koşulları gibi faktörlerin benzer olması nedeniyle bu faktörlerin etkisinin A7G içeriğindeki farklılıklar üzerine etkisi olmadığı düşünülmekte olup, A7G içeriğindeki farklılıkların gözlemlenmesinde büyük ölçüde iklimsel faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Arnavutköy bölgesinde yetiştirilip toplanan tıbbi papatya'dan elde edilen bitkinin A7G içeriğinin Bandırma bölgesinden toplanan bitkilere göre majör farklılık göstermesinde tohum tipi, toprak yapısı, depolama koşulları, kuraklık, yağış miktarı ve güneşli gün sayısı gibi birçok çevresel, iklimsel ve diğer faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

6.5 *Matricaria Recutita* L. Çiçek Ekstrelerinin A7G İçeriklerinin Analizine Ait Bulgular

M. recutita çiçek kısımları kullanılarak, EMA'da yer alan "European Union herbal monograph on *M. recutita* L., flos" monografı baz alınarak ilk yıl Bandırma bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan farklı çözücü sistemlerine sahip 14 farklı sıvı ve katı ekstrelerin deneme seri boyutundaki üretimleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrelerin görselleri Şekil 6.4'te yer almaktadır.



Şekil 6.4: Hazırlanan ekstrelerin görselleri.

Elde edilen ekstrelerin sahip olduğu endikasyonlar ve uygulama yollarına ait bilgiler Tablo 6.5'te sunulmuştur [12].

Tablo 6.5: *M. recutita* çiçek ekstrelerinin endikasyonları ve uygulama yolları.

Endikasyon	
Endikasyon 1	Şişkinlik ve küçük spazmlar gibi küçük mide-bağırsak şikayetlerinin semptomatik tedavisinde
Endikasyon 2	Soğuk algınlığı semptomlarının giderilmesinde
Endikasyon 3	Küçük ülserlerin ve ağız ve boğazdaki iltihapların tedavisinde
Endikasyon 4	Anal ve genital bölgedeki cilt ve mukoza tahrişlerinin adjuvan tedavisinde
Endikasyon 5	Derinin hafif iltihaplanması (güneş yanığı), yüzeysel yaralar ve küçük çıbanların (çıban) tedavisinde

Uygulama yolu	Oral	İnhalasyon	Oromukozal	Kutonöz, Banyo katkı maddesi	Kutonöz, Banyo katkı maddesi
Endikasyon No	1	2	3	4	5
B Ekstresi	x	-	-	-	-
C Ekstresi	-	-	x	-	x
D Ekstresi	x	x	x	x	x
E Ekstresi	x	x	x	x	x
F Ekstresi	-	-	-	-	x
G Ekstresi	x	x	x	x	x
H Ekstresi		x	x	x	x
I Ekstresi	x	-	x	-	x
J Ekstresi	x	x	x	x	x
K Ekstresi	x	x	x	x	x
L Ekstresi	x	x	x	x	x
M Ekstresi*	-	-	-	x	x
N Ekstresi*	-	-	-	x	x
O Ekstresi	-	-	-	x	x

*M ve N ekstreleri yarı-katı dozaj formunda kullanılmaktadır

Bandırma bölgesinden ilk yıl toplanan tıbbi papatyanın çiçeklerinden elde edilen ekstrelerin A7G içerikleri HPLC-PDA yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Tablo 6.6'da sunulmuştur.

Tablo 6.6: *M. recutita* çiçek ekstrelerinin A7G içerikleri.

Ekstre Tipi	A7G içerikleri (mg/mL)
B Ekstresi	3,028 ± 0,015
C Ekstresi	0,627 ± 0,043
D Ekstresi	2,469 ± 0,641
E Ekstresi	2,460 ± 0,220
F Ekstresi*	19,921 ± 0,321
G Ekstresi	1,679 ± 0,112
H Ekstresi	3,763 ± 0,152
I Ekstresi	1,855 ± 0,094
J Ekstresi	0,922 ± 0,104
K Ekstresi	1,943 ± 0,029
L Ekstresi	0,871 ± 0,006
M Ekstresi	4,161 ± 0,144
N Ekstresi*	14,451 ± 0,318
O Ekstresi	1,794 ± 0,023

*Katı ekstrelerin analiz sonuçları mg/g olarak sunulmaktadır
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Ekstreler arasında F, N ve M ekstrelerinin A7G içerikleri yüksek miktarlarda analiz edilmiştir. Ekstrelerin A7G içerikleri, uygulama yolları ve endikasyonları göz önünde bulundurularak G, M ve N ekstreleri ile çalışmaların devam edilmesi kararlaştırılmıştır. G, M ve N ekstrelerinin daha büyük ölçekte üretimleri ve bu üç ekstre üzerinden validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışmalarına Bölüm 6.6'da yer verilmiştir. Ayrıca daha sonraki yıllarda Balıkesir ve Arnavutköy bölgelerinden toplanan bitkinin çiçek kısımlarından da G, M ve N ekstreleri hazırlanıp A7G içerikleri tespit edilmiştir. İlgili örneklere ait sonuçlar özet tablo halinde Tablo 6.7'de sunulmuştur.

Tablo 6.7: Farklı bölgelerden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin A7G içerikleri.

Örnekler	A7G içerikleri		
	G ekstresi (mg/mL)	M ekstresi (mg/mL)	N ekstresi (mg/g)
Bandırma/Balıkesir (1.yıl)	1,679 ± 0,112	4,161 ± 0,144	14,451 ± 0,318
Bandırma/Balıkesir (2.yıl)	2,212±0,068	3,760±0,023	11,378±0,009
Arnavutköy/ İstanbul	3,171±0,027	6,434±0,037	21,820±0,316

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Sonuçlar incelendiğinde, Arnavutköy bölgesinden toplanan bitkiden elde edilen ekstrelerin en yüksek A7G içeriklerine sahip olduğu, Bandırma bölgesinden ilk yıl toplanan bitkiden hazırlanan M ve N ekstrelerinin ikinci yıl toplanana göre daha yüksek A7G içeriklerine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürdeki bazı çalışmalarda *M. recutita* çiçek kısımlarından hazırlanan ekstrelerin A7G içerikleri analiz edilmiştir. Haghi ve arkadaşları su, metanol ve %70 etanol çözücülerini kullanarak *M. recutita* çiçek ekstrelerinin A7G içeriklerini incelemişlerdir. Ekstrelerin A7G içeriklerini sırasıyla %0,68, %1,11 ve %1,23 olarak analiz etmişlerdir [122]. Başka bir çalışmada, Baretta ve arkadaşları, *M. recutita* çiçek glikolik ekstresinin A7G içeriğini incelemiş ve 7,01 mg/g olarak analiz etmişlerdir [11]. Redaelli ve arkadaşları, farklı yıllarda toplanan *M. recutita* çiçek hidro-alkolik ekstresinin A7G içeriklerini analiz etmiş ve 0,16-0,86 mg/mL aralığında gözlemlemişlerdir [123].

Literatürde G, M ve N ekstreleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışma yapılmamış olup, farklı çözücü ve farklı ekstre oranlarıyla hazırlanan ekstrelerin A7G içerikleri hem daha yüksek hem de daha düşük değerler olmak üzere değişken sonuçlar göstermektedir.

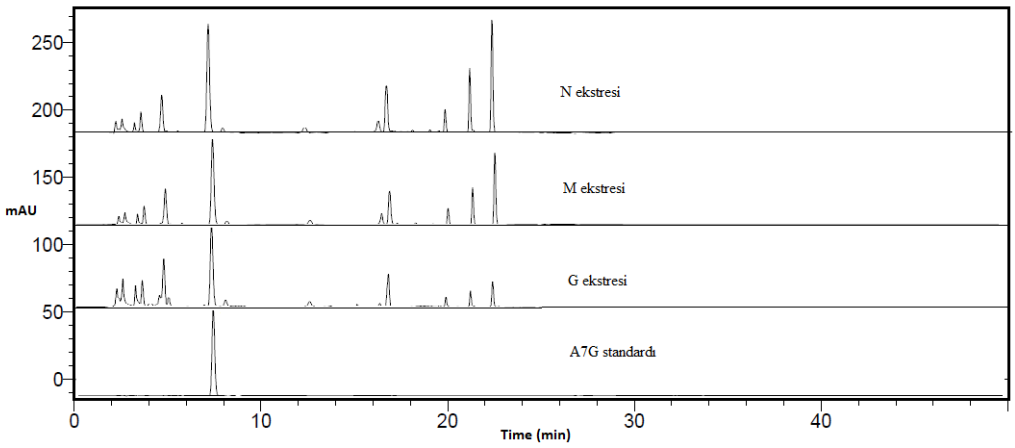
6.6 HPLC-PDA Yönteminin Validasyon Çalışmaları Bulguları

Bandırma bölgesinden ilk yıl toplanan bitkinin çiçek kısımları kullanılarak büyük ölçekte G, M ve N ekstreleri hazırlanmıştır. Bu üç ekstrenin A7G içerikleri geliştirilen HPLC-PDA yöntemi ile analiz edilmiştir ve yöntem valide edilmiştir. ICH yönergelerine göre, HPLC-PDA yöntemi kesinlik, seçicilik, doğruluk, tespit limiti,

tayin limiti, sağlamlık ve doğrusallık açısından geliştirilmiş ve validasyonu gerçekleştirilmiştir [93].

6.6.1 Seçicilik

Analitleri belirlemek için analitik yöntemlerin dizayn edilmesi, birincil doğrulama parametresi olarak seçiciliği ele alarak başlar. Seçicilik, bozunma ürünleri, matris bileşenleri ve safsızlıklar gibi mevcut olması beklenen bileşenlerin varlığında analiti değerlendirme yeteneğidir ve bu da tespit ve seçici belirleme olaylarıyla ilişkilidir. Kısa sürede analit piklerinin nominal koşullar altında girişimden arınmış olduğunu ve ölçüldüğünü gösterir, bu da analitik yöntemin güvenilirliği hakkında bir fikir verir [118]. Sunulan çalışmada seçiciliği değerlendirmek için; çözücü olarak metanol ve asetonitril, plasebo, mobil faz, referans standart, G, M, N ekstreleri sisteme enjekte edilmiştir. G, M, N ekstre piklerinin arasında iyi bir ayrım elde edilmiş ve tutulma süreleri %7,5 ± 1,5 olarak gerçekleşmiştir. Bu pikin tutulma süresinin ve şeklinin birçok denemede tutarlı olduğu görülmüştür. Ayrıca, ekstrelerin kromatografik pikleri sırasıyla 0,9, 1,9 ve 2,5 ile iyi bir rezolüsyon göstermiştir. Özetle, geliştirilen HPLC-PDA numunelerdeki standardı uygun şekilde tanımlayabilmiştir. Ekstrelerin ve standardın kromatogramı Şekil 6.5'te de görüldüğü gibi, geliştirilen analitik yöntem ekstrelerde herhangi bir girişim olmaksızın A7G pikinin doğru ve spesifik bir şekilde ölçülmesini sağlamıştır.



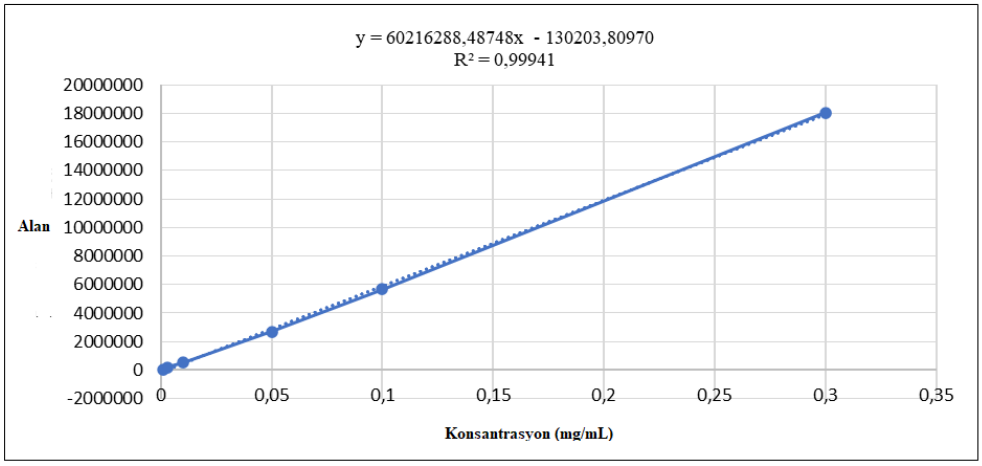
Şekil 6.5: G, M ve N ekstrelerine ait HPLC kromatogramı.

6.6.2 Kalibrasyon eğrisi ve doğrusallık

Analitik bir prosedürdeki doğrusallık, numunedeki analit konsantrasyonuna doğrudan orantılı bir yanıt üretme kabiliyetini ifade eder [119]. Doğrusal bir kalibrasyon

eğrisinin varlığı, doğrulanmış bir analitik aralıkta deney performansının olumlu bir göstergesidir [120]. Doğrusallık, analitik yöntemin çeşitli konsantrasyonlarda doğru sonuçlar sağlamasına, tartım ve analiz sırasında oluşabilecek olası analit kayıplarının olup olmadığını belirlemesine ve doğru ölçümlerin elde edilebileceği üst ve alt sınırları belirleyerek yöntemin dinamik aralığını belirlemesine olanak tanır. Sonuç olarak, analitik bir yöntemin güvenilirliği büyük ölçüde kalibrasyon eğrisinin doğrusallığına bağlıdır.

Bu çalışmada, yöntemin doğrusallığı altı A7G konsantrasyon seviyesinde (0,001, 0,003, 0,01, 0,05, 0,1, 0,3 mg/mL) analitik eğri değerlendirilerek belirlenmiştir (Şekil 6.6).



Şekil 6.6: A7G standardının kalibrasyon eğrisi.

Regresyon denklemi (6.1) için A7G kalibrasyon eğrisi 0,9994'lük r değeri ile belirlenen aralığın üzerinde doğrusal olduğu görülmektedir.

$$y = 60216288{,}48748x - 130203{,}80970 \tag{6.1}$$

Ayrıca, her konsantrasyonun bağıl standart sapması (RSD) %0,1'den düşük, yani kabul edilebilir maksimum sınırdan (%2,0) daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 6.8). Kalibrasyon eğrisinin regresyon değeri (r^2) 0,999'dan büyüktü. Dolayısıyla, bu yöntemin seçilen aralıkta doğrusal olduğu sonucuna ulaşıldı ve geliştirilen bu yöntemin uygun olduğu görülmektedir.

Tablo 6.8: A7G standardlarının konsantrasyon ve alanları.

Konsantrasyon (mg/mL)	Ortalama A7G alanı (n=6)	RSD (%)
0,001	50802	0,02
0,003	193924	0,01
0,01	531827	0,01
0,05	2678585	0,10
0,1	5663502	0,05
0,3	18040485	0,03

6.6.3 Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Analitiksel bir gürültüden güvenilir bir şekilde ayırt edilebilen bir analitik sinyal üretmek için yeterli analit konsantrasyonu mevcut olmalıdır ve bu sinyal bir analitin yokluğunda üretilmektedir [121]. Bu nedenle, LOD ve LOQ, analitik yöntemde en küçük konsantrasyonların güvenilir bir şekilde ölçülmesini sağlar. Mevcut çalışmada, LOD ve LOQ değerleri, A7G doğrusallığında kesişim ve eğim değerleri ile bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış ve sırasıyla 0,033 µ/mL ve 0,1 µ/mL olarak bulunmuştur.

6.6.4 Doğruluk ve geri kazanım

Doğruluğun uygunluğu, analitik yöntemin güvenilir ve inandırıcı sonuçlar ürettiğini gösterir. Analitik süreçteki olası hata kaynaklarının belirlenmesini ve ele alınmasını sağlayarak yanlış sonuçlar elde etme riskini azaltır. Özetle, doğruluk parametresinin analitik doğrulaması, analitik yöntemlerin güvenilirliğini ve kalitesini sağlamak için temeldir.

Mevcut çalışmada, her bir ekstrenin gerikazanım veya doğruluğu, bulunan orijinal miktardan ve hesaplanan miktardan elde edilmiştir. A7G ekstrelerdeki üç farklı konsantrasyonda (%80, %100 ve %120) incelenmiş ve örneklerin %98,24 ile %101,85 arasında gerikazanım değerleri elde edilmiştir (Tablo 6.9). Sonuçlar ICH yönergelerinin limitleri (95%-105%) dahilinde bulunmuştur. Bu nedenle doğruluk çalışmasının sonuçları, yöntemin doğru ve kesin sonuçlar ürettiğini değerlendirmek ve doğrulamak için sistematik bir yaklaşım sağlamış ve analitik yöntemin genel başarısına ve kabulüne katkıda bulunmuştur.

Tablo 6.9: Gerikazanım çalışması bulguları.

Konsantrasyon	Deneysel A7G içerikleri	RSD (%)	Geri Kazanım (%)
Ekstre- G %80	1,500 ± 0,004 mg/mL	0,27	101,54
Ekstre -G %100	1,847 ± 0,000 mg/mL	0,03	99,98
Ekstre -G %120	2,247 ± 0,003 mg/mL	0,16	101,36
Ekstre -M %80	3,949 ± 0,002 mg/mL	0,07	99,61
Ekstre -M %100	4,956 ± 0,000 mg/mL	0,01	99,99
Ekstre -M %120	5,842 ± 0,002 mg/mL	0,04	98,24
Ekstre -N %80	11,852 ± 0,006 mg/g	0,05	101,85
Ekstre -N %100	14,546 ± 0,004 mg/g	0,03	100,00
Ekstre -N %120	17,220 ± 0,002 mg/g	0,01	98,65

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

6.6.5 Sağlamlık

Sağlamlık parametresinin birincil amacı, yöntemdeki deneysel zayıflıkları belirlemek ve ölçmek, kritik faktörlerin öngörülmesini ve kontrol edilmesini sağlamaktır. Yani, çalışma koşullarının bozulmamış bir aralıkta kalmasını sağlamaktadır [118].

Mevcut çalışmada, N ekstresinin analiz sonuçları, değişmeyen yöntem verisi olarak kullanılmıştır. Tablo 6.10'daki sonuçların farkının yüzde olarak dahil olduğu sağlamlık testlerinin verileri gösterilmiştir. ICH yönergelerine göre, fark %2'den az olmalıdır. Bu nedenle, kurulan yöntemin sağlamlığı ICH yönergelerini karşılamıştır. Yöntem, pH, kolon sıcaklığı ve gradyan sistemindeki değişikliklerden etkilenmemiştir ve sonuçlar normal kullanım sırasında güvenilirliğini göstermektedir.

Tablo 6.10: Sağlamlık çalışması bulguları.

Normal Metod Pik Alanı	Değişiklik	Fark (%)
786299	Sıcaklık değiştirilmiş metot (50°C) 799273	1,6
	Sıcaklık değiştirilmiş metot (30°C) 796888	1,3
	pH değiştirilmiş metot (%1.0 orto-fosforikasit) 798619	1,5
	Gradient sistem değiştirilmiş metod 794678	1,1

6.6.6 Kesinlik

Kesinlik, homojen bir numunenin birden fazla örneklemesine tutarlı bir şekilde bir prosedür uygulandığında, bireysel test sonuçları arasındaki uyum derecesi olarak tanımlanır [118]. Yüksek kesinlik, yöntemin tutarlı bir şekilde benzer sonuçlar üretmesini sağlar ve bu da güvenilirlik için temeldir. Çalışmalarımızda, tekrarlanabilirlik ve ara hassasiyet çalışmaları bu kapsamda yürütülmüştür. Hassasiyet, yöntemin performansının güvenilir olmasını ve deneysel koşullardaki değişikliklerden büyük ölçüde etkilenmemesini sağlamak için esastır.

Kesinlik çalışması verileri Tablo 6.11'de sunulmuştur. Ayrıca, deney sonuçları arasında önemli farklılıklar elde edilmemiştir ve bu da geliştirilen yöntemin hassasiyetinin tatmin edici olduğunu göstermektedir.

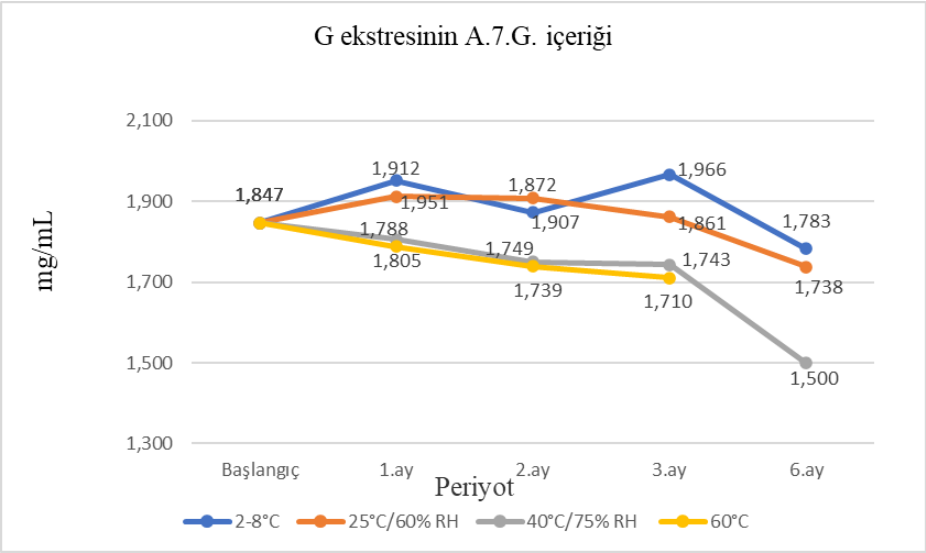
Tablo 6.11: Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışması bulguları.

Tekrarlanabilirlik		
Konsantrasyon Analist-1	**Ortalama**	**RSD (%)**
G ekstresi 100%	1,888 ± 0,001 mg/mL	0,03
M ekstresi 100%	4,951 ± 0,005 mg/mL	0,11
N ekstresi 100%	14,576 ± 0,004 mg/g	0,04
Arakesinlik		
Konsantrasyon Analist-1, Analist-2, Analist-3	**Ortalama**	**RSD (%)**
G ekstresi 100%	1,482 ± 0,008 mg/mL	0,52
M ekstresi 100%	4,315 ± 0,011 mg/mL	0,24
N ekstresi 100%	17,248 ± 0,032 mg/g	0,19

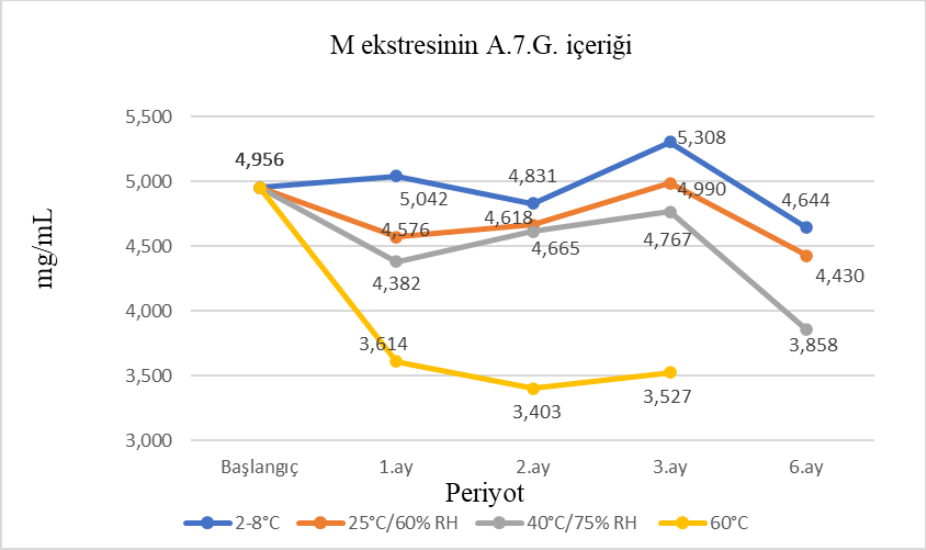
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3)

6.7 Ekstrelerin Stabilite Çalışmaları Bulguları

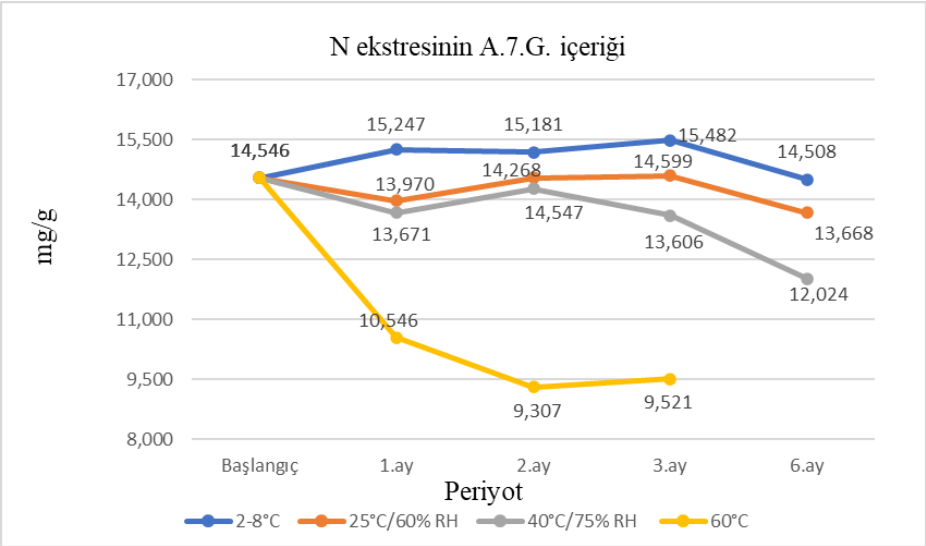
İlk yıl Bandırma bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan ve validasyon çalışmalarında kullanılan G, M, N ekstrelerinin 2-8°C, 25°C/60% RH, 40°C/75% RH ve 60°C sıcaklık koşulları altındaki A7G içeriğindeki değişiklikler Şekil 6.7, Şekil 6.8 ve Şekil 6.9'da sunulmaktadır.



Şekil 6.7: Farklı sıcaklıklar altında G ekstresinin A7G içeriğinin stabilitesi.



Şekil 6.8: Farklı sıcaklıklar altında M ekstresinin A7G içeriğinin stabilitesi.



Şekil 6.9: Farklı sıcaklıklar altında N ekstresinin A7G içeriğinin stabilitesi.

Flavonoitler, yararlı biyo-fonksiyonlara sahip doğal polifenolik bileşiklerdir. Ancak, termal ve diğer faktörlere karşı duyarlılık ve kimyasal kararsızlığa sahiptirler [124]. Sıcaklığın artması flavonoitlerin bozulmasına neden olabilir [46]. Uzun vadeli termal kararlılık koşulları altında, *M. recutita* ekstrelerindeki A7G'nin aglikona dönüştüğü için A7G miktarında önemli bir azalma gözlemlenmektedir [33].

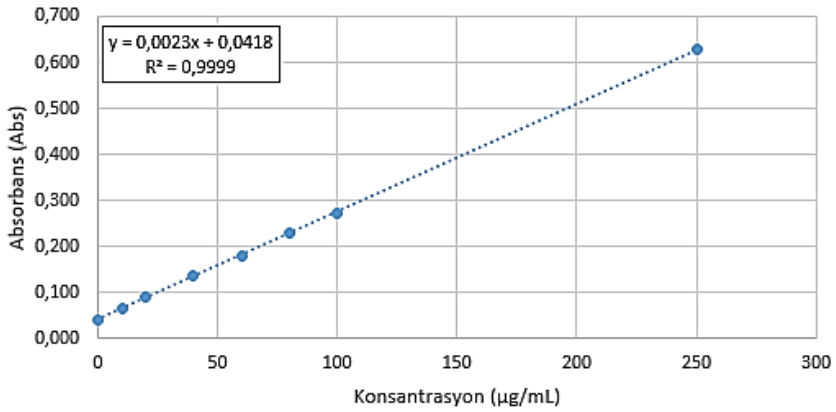
Stabilite sonuçları değerlendirildiğine, sıcaklık A7G üzerinde önemli bir rol oynamış ve sıcaklığın artması üç ekstrenin de A7G içeriğini olumsuz yönde etkilemiştir. 2-8°C'deki ve 25°C/%60 RH koşulundaki sonuçlar stabil olmakla birlikte, 2-8°C koşulunda daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. 40°C/%75 RH ve 60°C koşullarında, özellikle 60°C'de A7G miktarında belirgin azalmalar gözlemlenmiştir. Artan sıcaklığın etkisiyle üç ekstre için en kötü stabilite koşulu 60 °C olmuştur. Özetle, yapılan stabilite çalışmaları üç ekstre için en stabil depolama koşulunun 2-8°C olduğunu göstermiştir.

6.8 Ekstrelerin Spektrofotometrik Yöntemle Tayin Edilen Total Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarları

Fenolik bileşikler, bitkilerde ve bitki kaynaklı ürünlerde antioksidan aktivitenin ana kaynağını temsil eden fitokimyasalların ana grubunu oluşturur. Flavonoitler, doğal olarak var olan fenolik bileşiklerin en kapsamlı grubunu oluşturur ve hem serbest hallerinde hem de glikozitler olarak çeşitli bitki kısımlarında bulunmaktadır [125]. Birçok çalışma, *M. recutita* ekstrelerinin antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik ve

toplam flavonoit bileşikleri arasında doğrusal pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmektedir.

Toplam fenolik madde miktar tayini için gallik asit kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 6.10'da verilmiştir.



Şekil 6.10: Gallik asidin UV-VIS mikroplaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

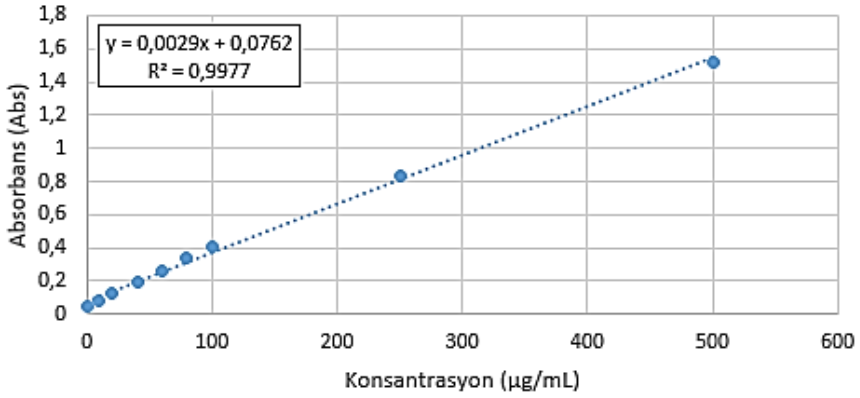
Bandırma ve İstanbul bölgelerinde yetiştirilen bitkilerden hazırlanan ekstrelerdeki toplam fenolik bileşik miktarlarına ait analiz sonuçları Tablo 6.12'de verilmektedir. M ve N ekstreleri için en yüksek fenolik içerik Arnavutköy bölgesinde sırasıyla %0,25 ve %4,39 oranlarında elde edilmiştir. G ekstresi için en yüksek fenolik içerik ikinci yıl Balıkesir bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan ekstrede %0,50 olarak elde edilmiştir.

Tablo 6.12: Ekstrelerin toplam fenolik miktarları.

Örnekler	**Toplam Fenolik Miktarları**		
	G ekstresi % (a/a)	**M ekstresi % (a/a)**	**N ekstresi % (a/a)**
Bandırma/Balıkesir (1.yıl)	0,43 ± 0,03	0,14 ± 0,02	2,70 ± 0,27
Bandırma/Balıkesir (2.yıl)	0,50 ± 0,09	0,17 ± 0,01	3,27 ± 0,28
Arnavutköy/ İstanbul	0,40 ± 0,03	0,25 ± 0,09	4,39 ± 0,58

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Toplam flavonoit madde miktar tayini için kuersetin kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 6.11'de verilmiştir.



Şekil 6.11: Kuersetinin UV-VIS mikroplaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Bandırma ve İstanbul bölgelerinde yetiştirilen bitkilerden hazırlanan ekstrelerdeki toplam flavonoit bileşik miktarlarına ait analiz sonuçları Tablo 6.13'te verilmektedir. G, M ve N ekstreleri için en yüksek flavonoit içeriklerine Arnavutköy örneklerinde sırasıyla % 0,25, %0,10 ve %2,10 oranlarında elde edilmiştir.

Tablo 6.13: Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları.

Örnekler	Toplam Flavonoit Miktarları		
	G ekstresi % (a/a)	M ekstresi % (a/a)	N ekstresi % (a/a)
Bandırma/Balıkesir (1.yıl)	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,00	1,06 ± 0,08
Bandırma/Balıkesir (2.yıl)	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,01	1,17 ± 0,01
Arnavutköy/ İstanbul	0,25 ± 0,05	0,10 ± 0,02	2,10 ± 0,14

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Literatürde tıbbi papatyadan elde edilen ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içeriklerinin belirlendiği bir çok çalışma yer almaktadır. Tarantilis ve arkadaşları, farklı sıcaklıklarda hazırlanan sulu *M. recutita* çiçek ekstrelerinin toplam fenolik içeriklerinin %0,06 ile %0,02 arasında değiştiğini gözlemlemiştir [126]. Aynı bitkinin metanollü ekstresinin toplam fenolik içeriği Selvam ve arkadaşları tarafından %0,12, toplam flavonoit içeriği ise %23,10 olarak tespit edilmiştir [127]. Başka bir çalışmada, metanollü *M. recutita* çiçek ekstrenin toplam fenolik içeriği Elmastaş ve arkadaşları tarafından %0,03 olarak bulunmuştur [128]. Haghi ve arkadaşları, etanollü *M. recutita* ekstrenin toplam fenolik içeriğinin %2,43 olduğunu ve toplam flavonoit içeriğinin ise %4,95 olduğunu bildirmişlerdir [122]. Freitas ve arkadaşları, hidro-alkollü *M. recutita* çiçek ekstrenin toplam flavonoit içeriğini %4,11 olarak belirlemişlerdir [129].

Literatürde, çalışmalarda kullanılan ekstrelerin hazırlandığı çözücü ve ekstre oranı ile benzer olarak elde edilmiş ekstrenin kullanıldığı bir çalışma yapılmamış olup, farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri hem daha yüksek hem de daha düşük değerler olmak üzere değişken sonuçlar göstermektedir.

6.9 Ekstrelerin LC-HRMS Bulguları

Bitkilerin ikincil metabolitleri olan fenolik bileşikler, hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Ayrıca fenolik bileşikler kozmetik, ilaç ve gıda ürünlerinde doğal boya ve koruyucu madde vb. olarak kullanılabilir. Fenolik bileşiklerin önemli antioksidan etkileri de mevcuttur [130].

G, M ve N ekstreleri, fenolik madde içerikleri açısından Bezmialem Vakıf Üniversitesi İLMER'de bulunan LC-HRMS cihazı ile analiz edilmiştir. İLMER Kütüphanesi'nde bulunan bileşiklerin alıkonma süreleri ve hedef iyonları karşılaştırılarak bileşikler tanımlanmıştır. G ekstreleri A7G, klorojenik asit, hispidulin 7-glikozit, herniarin, apigenin-7-O-açil glikozit ve apigenin bileşiklerini majör olarak içermektedir. M ekstreleri A7G, klorojenik asit, hispidulin 7-glikozit, herniarin ve apigenin bileşiklerini majör olarak içermektedir. N ekstreleri askorbik asit, klorojenik asit, luteolin 7-glikozit, A7G, hispidulin 7-glikozit, herniarin, apigenin-7-O-açil glikozit, apigenin ve kastisini majör olarak içermektedir. Ekstrelerin içerdikleri fenolik bileşiklerin miktarları Tablo 6.14'te sunulmuştur

Tablo 6.14: LC-HRMS bulgularına göre G, M, N ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin miktarları.

No	Fenolik Bileşikler	G ekstresi (mg/mL)			M ekstresi(mg/mL)			N ekstresi (mg/g)			m/z	Polarite	Tutulma süresi/dk
		BN1	BN2	AR	BN1	BN2	AR	BN1	BN2	AR			
1	(-)-Epigallokateşin	0,02	0,02	0,01	-	-	-	-	0,05	-	307.1	Pozitif	1.99
2	Askorbik asit	-	-	-	0,38	0,03	0,48	0,55	1,29	0,50	175.0	Negatif	2.14
3	Fumarik asit	-	-	0,13	-	0,27	0,26	-	1,71	-	115.0	Negatif	2.14
4	Klorojenik asit	0,96	0,96	0,35	0,28	0,66	0,48	1,00	3,11	1,71	353.1	Negatif	2.21
5	(-)-Epikateşin gallat	0,01	-	0,01	-	-	0,01	-	-	-	441.1	Negatif	2.34
6	Verbaskosit	0,01	0,01	0,01	-	0,01	-	-	0,01	-	623.2	Negatif	2.83
7	Kafeik asit	0,10	0,03	0,04	0,09	0,05	0,02	0,25	0,43	0,08	179.0	Negatif	3.12
8	2,5 Dihidrobenzoik asit	0,04	0,13	-	0,05	-	0,01	0,25	-	-	153.0	Negatif	3.50
9	6-OH-Luteolin-7-glikozit	0,03	-	0,03	0,01	0,03	0,02	0,13	0,20	0,20	463.1	Negatif	3.55
10	(+)-*trans* taxifolin	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	-	-	303.1	Negatif	3.74
11	Luteolin-7-rutinozit	0,03	0,04	-	0,01	0,02	0,01	0,03	0,11	0,03	593.2	Negatif	3.77
12	Naringin	-	0,01	0,01	-	0,01	0,01	0,05	-	0,06	579.2	Negatif	3.96
13	Vanilik asit	-	0,02	0,04	-	0,05	0,03	-	0,37	0,43	167.0	Negatif	4.04
14	Kuersitrin	-	-	0,01	-	0,01	0,02	-	-	0,05	447.1	Negatif	4.08
15	Luteolin 7-glikozit	0,15	0,19	0,05	0,08	0,09	0,05	0,22	0,77	0,33	447.1	Negatif	4.10
16	Rutin	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	-	0,02	609.1	Negatif	4.33
17	Hiperosit	0,06	0,04	0,02	0,02	0,03	0,03	0,07	0,07	0,13	463.1	Negatif	4.45
18	Dihidrokamferol	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	-	0,01	287.1	Negatif	4.73
19	A7G	0,80	0,64	0,48	2,10	1,30	1,16	5,14	15,0	11,94	431.1	Negatif	4.86
20	Hispidulin 7-glikozit	1,99	1,40	1,14	1,45	0,91	0,42	3,87	7,08	7,12	461.1	Negatif	4.90
21	Ellagik asit	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	301.0	Negatif	4.99
22	Herniarin	0,67	0,49	0,19	2,35	1,66	0,88	5,87	18,3	7,08	177.1	Pozitif	5.50
23	Kuersetin	0,02	0,05	0,03	0,10	0,01	0,01	0,07	0,01	0,02	301.0	Negatif	5.58
24	Salisilik asit	0,03	0,01	0,01	0,07	0,05	0,03	0,16	0,39	0,09	137.0	Negatif	5.65
25	Naringenin	-	0,01	0,01	-	0,01	0,01	-	0,02	0,05	271.1	Negatif	5.65

Tablo 6.14 (devam): LC-HRMS bulgularına göre G, M, N ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin miktarları.

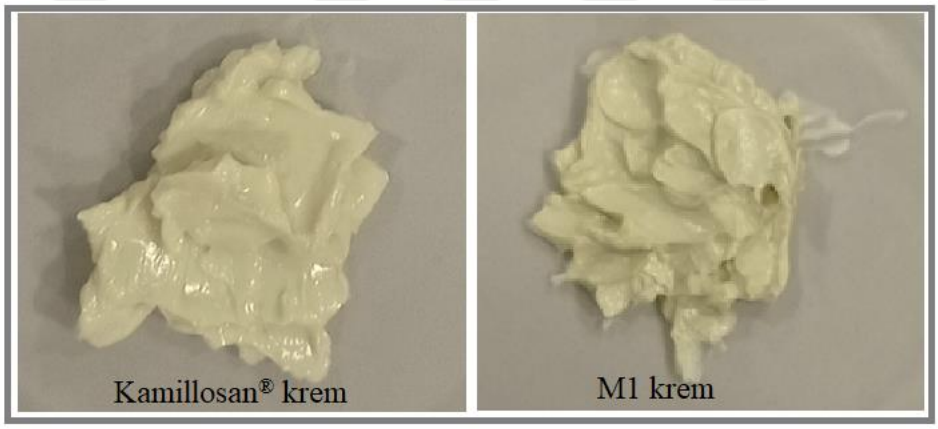
No	Fenolik Bileşikler	G ekstresi (mg/mL)			M ekstresi(mg/mL)			N ekstresi (mg/g)			m/z	Polarite	Tutulma süresi/dk
		BN1	BN2	AR	BN1	BN2	AR	BN1	BN2	AR			
26	Luteolin	0,03	0,04	0,04	0,03	0,05	0,01	0,07	0,21	0,08	285.0	Negatif	5.73
27	Apigenin 7-O-açil glikozit	0,33	0,18	0,18	0,69	0,30	0,24	2,01	3,53	3,37	473.1	Negatif	5.90
28	3'-O-Metil kuersetin	0,05	0,02	0,02	0,02	0,01	-	0,05	-	0,04	315.1	Negatif	6.04
29	Apigenin	0,18	0,24	0,32	0,34	0,40	0,48	0,74	2,69	4,06	269.0	Negatif	6.08
30	Hispidulin	0,04	0,01	0,02	0,05	0,02	0,02	0,13	0,10	0,11	301.1	Pozitif	6.11
31	Krizoeriol	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,07	0,12	0,14	299.1	Negatif	6.11
32	Sirsillinol	0,01	0,01	-	0,07	0,08	-	-	0,53	-	343.1	Negatif	6.49
33	Penduletin	0,02	0,02	-	0,10	0,11	-	0,07	0,83	-	343.1	Negatif	6.51
34	Kastisin	0,39	0,08	0,06	-	0,48	-	3,21	5,02	2,16	375.1	Pozitif	6.52
35	Sirsimaritin	0,07	-	-	-	-	-	0,26	-	-	313.1	Negatif	6.57
36	Pinosembrin	0,01	-	-	0,02	-	-	-	-	-	255.1	Negatif	6.63
37	Isosakuranetin	0,02	-	-	0,04	-	-	0,13	-	-	285.1	Negatif	6.70
38	Kafeik asit fenil ester	0,01	-	-	0,01	0,01	0,01	0,01	-	-	283.1	Negatif	6.82
39	Chrysin	0,03	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,19	0,01	0,01	253.1	Negatif	6.92
40	Acacetin	0,01	-	-	0,02	-	-	0,05	-	-	283.1	Negatif	7.23
41	Apigenin 7-metilat	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-	-	283.1	Negatif	7.23
42	Quillaik asit	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	485.3	Negatif	7.32
43	Sarsasapogenin	-	-	-	-	-	-	-	0,71	-	417.3	Pozitif	8.35
44	Sclareol	-	-	0,01	-	-	-	-	0,01	-	273.3	Pozitif	8.61

BN1: Bandırma 1. yıl, BN2: Bandırma 2. yıl, AR: Arnavutköy

6.10 Formüle Edilen Topikal Ürünlerin Fiziko-Kimyasal Karakterizasyonu ve Stabilitesine Ait Bulgular

6.10.1 M ekstresini içeren topikal ürünün fiziko-kimyasal karakterizasyonu ve stabilitesine ait bulgular

Referans Kamillosan® kremin (Lot no: 326670) A7G içeriğine eşdeğer olarak Arnavutköy bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan M ekstresini içeren krem (M1) formüle edilmiştir ve stabilitesi 6 ay boyunca 25°C/%60 RH ve 40°C/%75 RH sıcaklık koşullarında takip edilmiştir. Formüle edilen M1 krem ve referans Kamillosan Krem® için başlangıç A7G içerikleri 0,63 mg/g olarak analiz edilmiştir. Ürünlere ait görseller Şekil 6.12'de verilmektedir.



Şekil 6.12: Kamillosan® krem ve M1 kreme ait görseller.

Organoleptik bir test (koku, renk, görünüm, vb.) topikal ürünü hızlı bir şekilde karşılaştırmak ve fazların ayrılmadığından, depolama sırasında renk/koku değişimi olmadığından emin olmak için çok önemlidir. M1 kremi, karakteristik bir papatya ekstresi kokusuna ve hafif kahverengi-yeşilimsi krem rengine sahiptir. Üretimden sonra faz ayrımı gözlemlenmemiştir. pH değeri ilaç moleküllerinin stabilitesini, yarı katı ürünlerin reolojik davranışını ve ürünlerdeki koruyucuların etkinliğini etkileyebilir [131]. M1 kremin pH'ı 6,31 olarak ölçülmüştür.

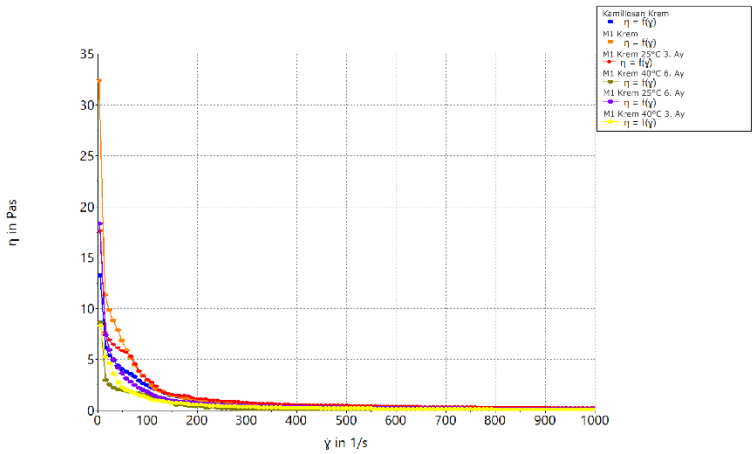
M1 kremin stabilite değerlendirmesi görünüş, pH, reolojik davranış ve A7G'nin miktar tayini testlerini içermektedir. Sonuçlar Tablo 6.15'te sunulmuştur.

Tablo 6.15: M1 kremin başlangıç ve stabilite analizlerine ait bulgular.

Periyot	Görünüş	pH	A7G içerik (mg/g)
Başlangıç	Hafif kahverengi-yeşilimsi krem	6,31	0,63±1,32 (%100,0)
25°C/%60 RH 3.ay	Hafif kahverengi-yeşilimsi krem	6,35	0,65±0,09 (%103,2)
25°C/%60 RH 6.ay	Hafif kahverengi-yeşilimsi krem	6,33	0,60±0,24 (%95,2)
40°C/%75 RH 3.ay	Hafif kahverengi-yeşilimsi krem	6,40	0,64±0,09 (%101,6)
40°C/%75 RH 6.ay	Hafif kahverengi-yeşilimsi krem	6,44	0,55±0,22 (%87,3)

A7G içerikleri ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Reoloji, bir maddenin bir zorlayıcı kuvvet karşısında deformasyonuna ve akışına neden olan mekanik özelliklerini, yani reolojik özelliklerini inceleyen bir disiplindir [132]. Kamillosan® krem ve M1 kremin viskozitesi yukarıda açıklandığı (Bölüm 5.14.3) gibi ölçülmüştür. Viskoziteler, Şekil 6.13'te görüldüğü gibi sonuçların plato oluşturduğu sabit kaldığı kayma hızlarında (düşük, orta ve yüksek) değerlendirilmiştir.



Şekil 6.13: M ekstresini içeren kremin (M1) viskozite profili.

M1 kremin başlangıç ve stabilite periyotlarında sergilemiş olduğu üç farklı kayma hızındaki viskoziteleri, Kamillosan® kremin sonuçları ile birlikte Tablo 6.16'da sunulmuştur.

Tablo 6.16: Kamillosan® krem ve M1 kremin üç farklı kayma hızındaki viskozitelerine ait bulgular.

Ürün	Kamillosan® krem	M1 krem	M1 krem (25°C/ %60 RH)	M1 krem (40°C/ %75 RH)	M1 krem (25°C/ %60 RH)	M1 krem (40°C/ %75 RH)
Periyot	**Başlangıç**		**3.ay**		**6.ay**	
Kayma Hızı (1/sn)	**Viscosity (η; Pas)**					
15	6,18±0,09	13,12±5,38	13,54±9,20	3,59± 1,50	6,55±1,25	3,04±0,18
500	0,40±0,02	0,29±0,07	0,48± 0,04	0,18± 0,02	0,29±0,02	0,03±0,01
1000	0,21±0,01	0,13±0,04	0,25± 0,01	0,09± 0,01	0,13±0,01	0,01±0,01

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

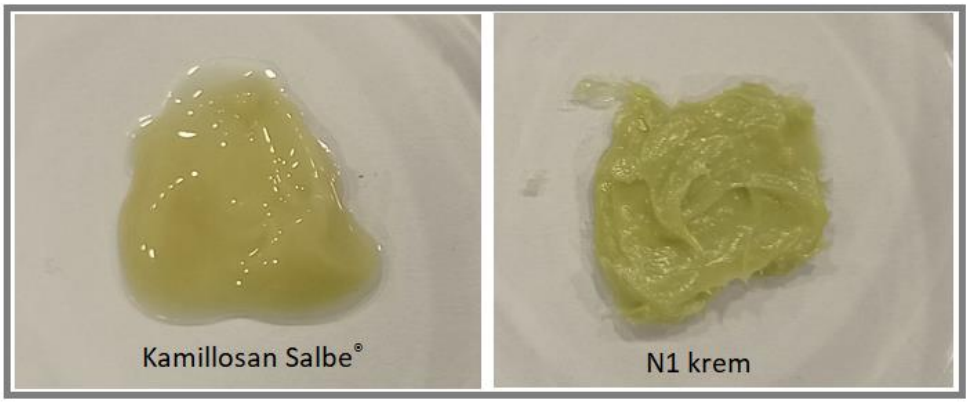
Tablo 6.16 ve Şekil 6.13'te görüldüğü gibi, M1 ürününün başlangıç viskozitesi düşük kayma geriliminde daha yüksektir ve her ikisi de bir plato göstermektedir. Orta ve yüksek kayma hızlarında, viskozite değerleri birbirine yaklaşmış ve grafikte örtüşmüştür. Hem test ürünü hem de referans ürün, artan kayma hızıyla birlikte azalan viskozite ve kayma incelmesi davranışı göstermektedir. 40°C/%75 RH'deki 3. ay stabilite sonuçlarında, M1 ürününün viskozitesinin başlangıca kıyasla azaldığı görülmektedir. 25°C/%60 RH ve 40°C/%75 RH'de 6. Ay stabilite sonuçlarında M1 ürününün viskozitesinin başlangıca kıyasla azaldığı ve anlamlı bir fark olduğu gözükmektedir (Two-way ANOVA, Multiple comparisons, ($P < 0.05$), GraphPad Prism 8.0.). Fakat ürünün görünüşü üzerinde etkisi gözlemlenmemiştir.

Formüle edilen M1 kremin 6 aylık stabilite sonuçları incelendiğinde, 25°C/%60 RH'de A7G içeriği % 4,8 azalmış ve majör bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca pH ve görünüş olarak stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. 40°C/%75 RH'de ise A7G içeriğinde sıcaklık artışı ile %12,7 düşüş gözlemlenmiştir. pH ve görünüş açısından stabilitesini korumuş ve viskozitesinde düşme gözlemlenmiştir. Fakat ürünün görünüşünde bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu bulgulara dayanarak iki ortamda da M1 kremin stabil olduğu, fakat en iyi saklama koşulunun 25°C/%60 RH olduğu belirlenmiştir.

6.10.2 N ekstresini içeren topikal ürünün fiziko-kimyasal karakterizasyonu ve stabilitesine ait bulgular

Referans Kamillosan Salbe® merhem (Lot no: 327601) ürününün A7G içeriğine eşdeğer olarak Arnavutköy bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan N ekstresini içeren krem (N1) formüle edilmiştir ve stabilitesi 6 ay boyunca 25°C/%60 RH ve 40°C/%75 RH sıcaklık koşullarında takip edilmiştir. Formüle edilen N1 krem ve

referans Kamillosan Salbe® merhem için başlangıç A7G içerikleri 0,56 mg/g olarak analiz edilmiştir. Ürünlere ait görseller Şekil 6.14'te verilmektedir.



Şekil 6.14: Kamillosan Salbe® ve N1 kreme ait görseller.

N1 krem, karakteristik bir papatya ekstresi kokusuna ve kahverengi-yeşilimsi krem rengine sahiptir. Üretimden sonra faz ayrımı gözlemlenmemiştir. N1 kremin pH'ı 6,21 olarak ölçülmüştür.

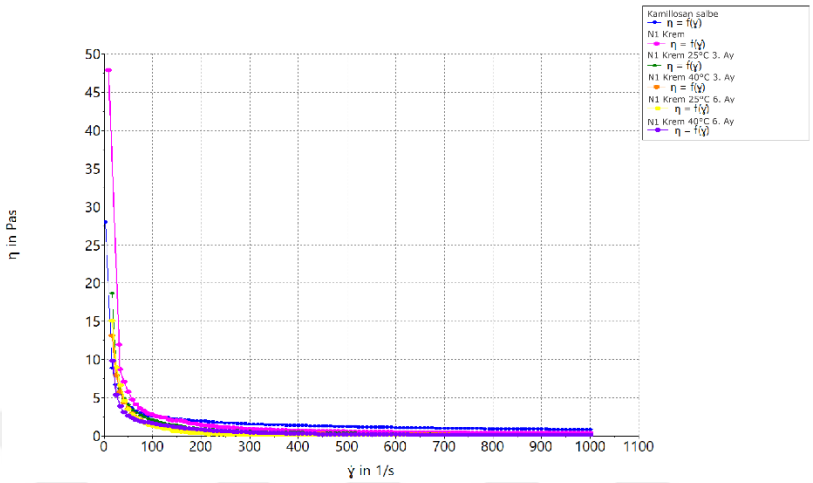
N1 kremin stabilite değerlendirmesi görünüş, pH, reolojik davranış ve A7G'nin miktar tayini testlerini içermektedir. Sonuçlar Tablo 6.17'de sunulmuştur.

Tablo 6.17: N1 kremin başlangıç ve stabilite analizlerine ait bulgular.

Periyot	Görünüş	pH	A7G içerik (mg/g)
Başlangıç	Kahverengi-yeşilimsi krem	6,21	0,56 ± 7,10 (%100,0)
25°C/%60 RH 3.ay	Kahverengi-yeşilimsi krem	6,12	0,55 ± 0,10 (%98,2)
25°C/%60 RH 6.ay	Kahverengi-yeşilimsi krem	5,91	0,51 ± 0,20 (%91,1)
40°C/%75 RH 3.ay	Kahverengi-yeşilimsi krem	5,90	0,53 ± 0,10 (%94,6)
40°C/%75 RH 6.ay	Kahverengi-yeşilimsi krem	5,62	0,42 ± 0,17 (%75,0)

A7G içerikleri ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Kamillosan Salbe® ve N1 kremin viskozitesi yukarıda açıklandığı (Bölüm 5.14.3) gibi ölçülmüştür. Viskoziteler, Şekil 6.15'de görüldüğü gibi sonuçların plato oluşturduğu sabit kaldığı kayma hızlarında (düşük, orta ve yüksek) değerlendirilmiştir.



Şekil 6.15: N ekstresini içeren kremin (N1) viskozite profili.

N1 kremin başlangıç ve stabilite periyotlarında sergilemiş olduğu üç farklı kayma hızındaki viskoziteleri, Kamillosan® kremin sonuçları ile birlikte Tablo 6.18'de sunulmuştur.

Tablo 6.18: Kamillosan Salbe® merhem ve N1 kremin üç farklı kayma hızındaki viskozitelerine ait bulgular.

Ürün	Kamillosan Salbe®	N1 krem	N1 krem (25°C/ %60 RH)	N1 krem (40°C/ %75 RH)	N1 krem (25°C/ %60 RH)	N1 krem (40°C/ %75 RH)
Periyot	**Başlangıç**		**3.ay**		**6.ay**	
Kayma Hızı (1/sn)	**Viscosity (η; Pas)**					
15	10,67±1,56	37,80±11,20	17,88±1,13	12,17±1,68	13,22±2,69	14,56±4,10
500	1,03±0,54	0,59±0,01	0,36±0,02	0,28±0,02	0,21±0,20	0,30±0,16
1000	0,93±0,06	0,36±0,01	0,16±0,07	0,17±0,01	0,10±0,10	0,13±0,08

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=3).

Tablo 6.18 ve Şekil 6.15'de görüldüğü gibi, N1 ürününün başlangıç viskozitesi düşük kayma geriliminde daha yüksektir ve her ikisi de bir plato göstermektedir. Orta ve yüksek kayma hızlarında, viskozite değerleri birbirine yaklaşmış ve grafikte örtüşmüştür. Hem test ürünü hem de referans ürün, artan kayma hızıyla birlikte azalan viskozite ve kayma incelmesi davranışı göstermektedir. 40°C/%75 RH'deki 3. ve 6. Ay stabilite sonuçlarında, N1 ürününün viskozitesinin başlangıca kıyasla azaldığı

görülmektedir. N1 krem ise başlangıç viskozite değerleri ve 25°C/60% RH'deki, 40°C/75% RH'deki 3. ay viskozite değerlerinde azalma görülmekte olup aralarında anlamlı bir fark görülmektedir. Ancak 25°C/60% RH'de ve 40°C/75% RH'de 3. ay ve 6. ay viskoziteleri arasında anlamlı fark görülmemiştir. (Two-way ANOVA, Multiple comparisons, (P >0.05), GraphPad Prism 8.0.).

Formüle edilen N1 kremin 6 aylık stabilite sonuçları incelendiğinde, 25°C/%60 RH'de A7G içeriği % 8,9 azalmış ve majör bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca pH ve görünüş olarak stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. 40°C/%75 RH'de ise A7G içeriğinde sıcaklık artışı ile %25'lik bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu sıcaklıkta görünüş açısından stabilitesini korumuş, fakat pH değeri 5,62'ye kadar düşmüştür. Ayrıca reolojik olarak viskozitesinde düşme gözlemlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak 40°C/%75 RH'de koşulunda N1 ürününün 6. Ay sonunda fiziko-kimyasal olarak stabil olmadığı anlaşılmaktadır. Bu bulgulara dayanarak, 40°C/%75 RH koşulunda N1 kremin stabilitesinin çok iyi olmadığı, 25°C/%60 RH saklama koşulunda ürünün stabil olduğu belirlenmiştir.

6.11 Referans ve Test Ürünlerin *In-Vitro* Salım Profillerinin Karşılaştırılmasına Ait Bulgular

In vitro salım testleri, bir dozaj formundan ilacın salım özelliklerini incelemek, ilacın *in vitro* performansı hakkında bilgi sağlamak ve diğer ürünlerle karşılaştırmaya olanak sağlamak için kullanılmaktadır. Farmasötik alanda, bu testler dozaj formlarının geliştirilmesi ve kalite kontrolü için çok önemlidir ve ilacın potansiyel *in vivo* etkinliği hakkında fikir vermektedir [133]. Literatürde çoğunlukla apigenin yüklü bileşikler içeren ürünlerin *in vitro* salımını değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır [103, 134]. Literatür araştırmalarında, daha önce bu çalışmada kullanılan *M. recutita* ekstrelerini içeren topikal ürünlerin ve referans Kamillosan® topikal ürünlerinin *in vitro* A7G salımını değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

6.11.1 M1 krem ve Kamillosan® kremin *in-vitro* salım profillerinin karşılaştırılmasına ait bulgular

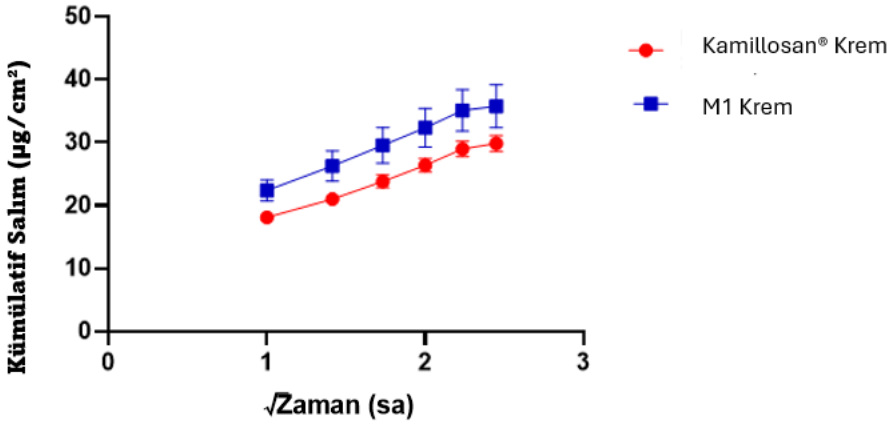
Referans ürün Kamillosan® Krem ve M1 kremin analizi için *in vitro* salım çalışmaları kapsamında, HPLC analizinden sonra zamanın kareköküne (Higuchi kinetiği) karşı elde edilen kümülatif A7G miktarlarını (µg) içeren bulgular Tablo 6.19'da verilmiştir.

Tablo 6.19: Kamillosan® Krem ve M1 kremden salınan A7G'nin kümülatif miktarları.

Süre (Saat)	Kamillosan® Krem µg/cm²	M1 Krem µg/cm²
1	18,11 ± 0,44	22,41 ± 1,67
2	21,01 ± 0,75	26,26 ± 2,43
3	23,82 ± 0,75	29,56 ± 2,82
4	26,42 ± 1,10	32,36 ± 3,08
5	28,99 ± 1,23	35,09 ± 3,31
6	29,87 ± 1,27	35,76 ± 3,41

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=6).

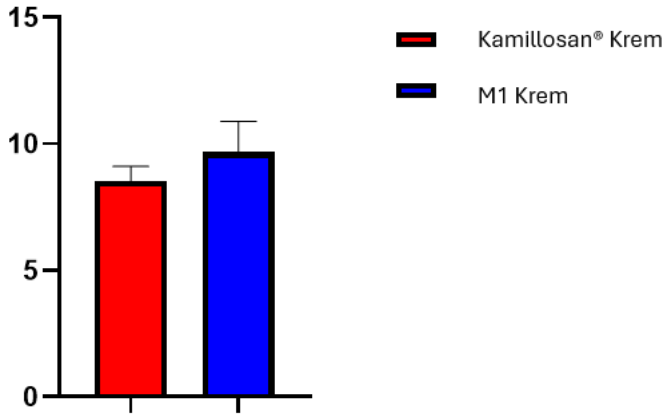
Kamillosan® krem ve M1 kremin Franz difüzyon hücreleri ve diyaliz membranı kullanılarak yapılan *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen profillerden, formüle edilmiş M1 kreminin salım değeri 35,76±3,41 µg/cm² olarak belirlenirken, Kamillosan® kremin 6. saat sonundaki salım değeri 29,87±1,27 µg/cm² olarak belirlenmiştir (Eşleştirilmemiş t testi (P>0,05), GraphPad Prism 8.0.1). Sonuçlar ortalamalar ± standart sapmalar (n=6) olarak ifade edilmiştir. Test kremin A7G kümülatif salım miktarının Kamillosan® kremden biraz hızlı olmakla birlikte anlamlı bir fark yoktur. Birim alandan geçen A7G miktarına göre M1 ve referans Kamillosan® kremin *in vitro* salım profilleri Şekil 6.16'da sunulmuştur.



Şekil 6.16: M1 Krem ve Kamillosan® kremin salım profilleri.

Salım hızı sabiti (k) değerlerinin birbirine yakın olması, etken maddenin her iki üründe de difüzyon hızlarının benzer olduğu anlamına gelmektedir. Salım hızı sabiti (k) M1 krem için 9,67±1,22, Kamillosan krem® ise 8,53±0,58 olarak olarak hesaplanmıştır (Eşleştirilmemiş t testi (P>0,05), GraphPad Prism 8.0.1). Sonuçlar ortalamalar ± standart sapmalar (n=6) olarak ifade edilmiştir. M1 kreminin A7G salım hız sabiti

Kamillosan krem®'den biraz hızlı olduğu, fakat aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Kamillosan® krem ve formüle edilmiş M1 kremin *in vitro* salım testi sonucunda hesaplanan salım hızı sabitleri (k) Şekil 6.17'de sunulmuştur.



Şekil 6.17: M1 Krem ve Kamillosan® kremin salım hızı sabitleri.

6.11.2 N1 krem ve Kamillosan Salbe® merhemin in-vitro salım profillerinin karşılaştırmasına ait bulgular

Referans ürün Kamillosan Salbe® merhem ve N1 kremin analizi için *in vitro* salım çalışmaları kapsamında, HPLC analizinden sonra zamanın karekköküne (Higuchi kinetiği) karşı elde edilen kümülatif A7G miktarlarını (µg) içeren bulgular Tablo 6.20'de verilmiştir.

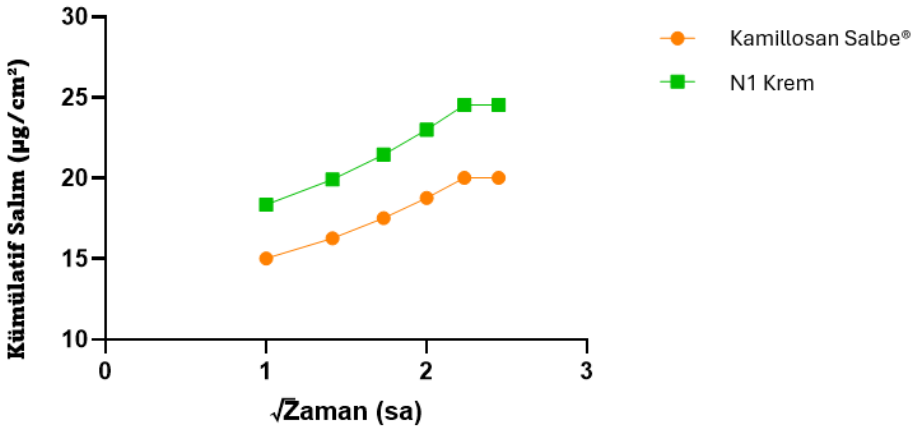
Tablo 6.20: Kamillosan Salbe® merhem ve N1 kremden salınan A7G'nin kümülatif miktarları.

Süre (Saat)	Kamillosan Salbe® µg/cm²	N1 Krem µg/cm²
1	15,02 ± 0,01	18,36 ± 0,06
2	16,28 ± 0,01	19,92 ± 0,07
3	17,52 ± 0,01	21,46 ± 0,06
4	18,77 ± 0,01	23,00 ± 0,06
5	20,03 ± 0,01	24,53 ± 0,06
6	20,02 ± 0,01	24,55 ± 0,06

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmaktadır (n=6).

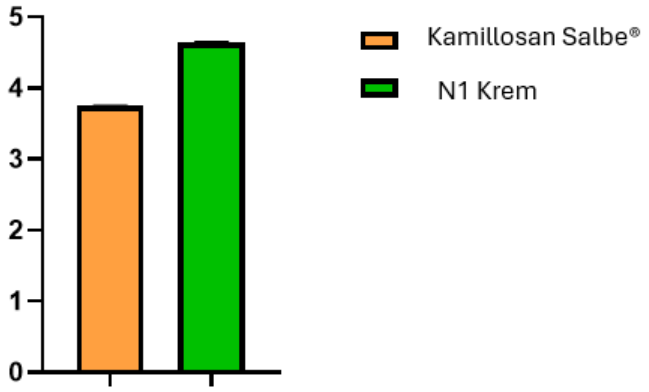
Kamillosan Salbe® ve N1 kremin Franz difüzyon hücreleri ve diyaliz membranı kullanılarak yapılan *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen profillerden, formüle edilmiş N1 kreminin salım değeri 24,55±0,06 µg/cm² olarak belirlenirken, Kamillosan Salbe® merhemin 6. saat sonundaki salım değeri 20,02±0,01 µg/cm² olarak belirlenmiştir (Eşleştirilmemiş t testi (P>0,05), GraphPad Prism 8.0.1).

Sonuçlar ortalamalar ± standart sapmalar (n=6) olarak ifade edilmiştir. Test kremin A7G kümülatif salım miktarının Kamillosan Salbe® merhemden biraz hızlı olduğu, fakat aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Birim alandan geçen A7G miktarına göre N1 ve referans Kamillosan Salbe® merhemin *in vitro* salım profilleri Şekil 6.18'de sunulmuştur.



Şekil 6.18: N1 krem ve Kamillosan Salbe® merhemin salım profilleri.

Salım hızı sabiti (k) N1 krem için 4,64±0,01, Kamillosan Salbe® merhemin ise 3,76±0,01 olarak olarak hesaplanmıştır (Eşleştirilmemiş t testi (P>0,05), GraphPad Prism 8.0.1). Salım hızı sabiti (k) değerlerinin birbirine yakın olması, etken maddenin her iki üründe de difüzyon hızlarının benzer olduğu anlamına gelmektedir. Sonuçlar ortalamalar ± standart sapmalar (n=6) olarak ifade edilmiştir. N1 kreminin A7G salım hızının Kamillosan Salbe®'den çok az hızlı, fakat aralarında anlamlı bir olmadığı görülmektedir. Kamillosan Salbe® merhem ve formüle edilmiş N1 kremin *in vitro* salım testi sonucunda hesaplanan salım hızı sabitleri (k) Şekil 6.19'da sunulmuştur.

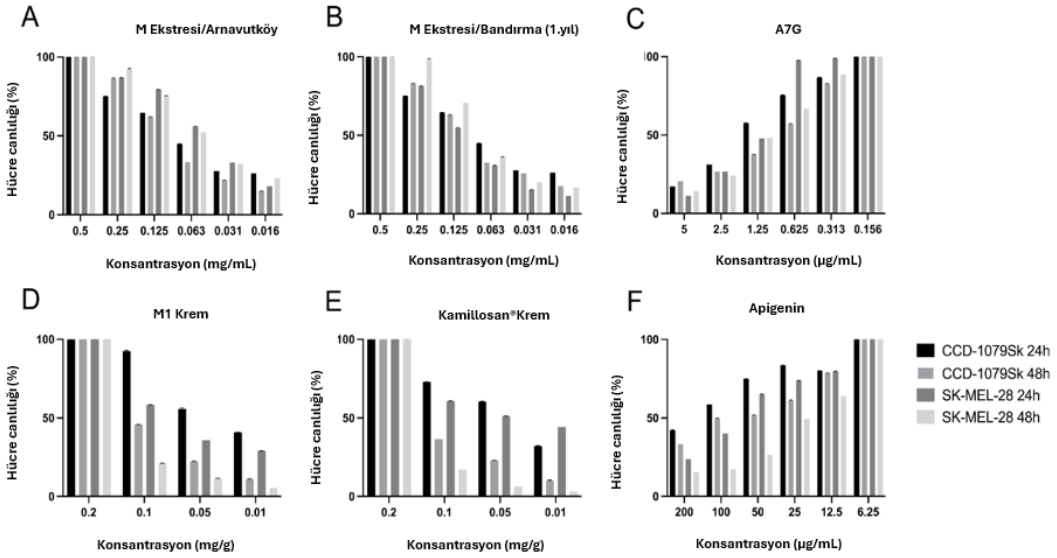


Şekil 6.19: N1 krem ve Kamillosan Salbe® merhemin salım hızı sabitleri.

6.12 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

6.12.1 Sitotoksisite çalışmalarına ait bulgular

Arnavutköy ve Bandırma bölgelerinden ilk yıl toplanan bitkilerden hazırlanan M ekstreleri, A7G, apigenin, M1 krem ve referans Kamillosan® kremin SK-MEL-28 tümör hücreleri ve CCD-1079Sk tümör olmayan hücrelere karşı sitotoksik aktivitesi 24 ve 48 saat boyunca MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı grafikleri değerlendirildiğinde (Şekil 6.20 A, B), ekstrelerin 0,5 mg/mL konsantrasyonda toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. 0,031 mg/mL konsantrasyonda, hücre canlılığı hem hücre hatlarında hem de periyotlarda %50'nin altına düşmüştür. Ekstre ve krem formülasyonlarının konsantrasyonları, içerdikleri A7G'ye göre dengelenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde hiçbir etki gözlemlenmemiştir. Bu, ekstrelerin içerdiği farklı bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, ekstre örnekleri arasında büyük farklar gözlenmedi. M1 krem örneği ayrıca 48 saatte kanser hücre hattına karşı canlılık üzerinde daha büyük bir etkiye sahipti. Yüksek konsantrasyonlarda krem örneklerinde, ekstre örneklerinde olduğu gibi, canlılık üzerinde olumlu bir etki gözlemlenmiştir. Şekil 6.20C, A7G'nin farklı konsantrasyonlarda sağlıklı ve kanser hücre hatlarına karşı toksisitesini göstermektedir. En yüksek hücre ölümü 5 µg/mL konsantrasyonunda gözlemlendi. Konsantrasyon azaldıkça hücre canlılığı artmıştır. Krem formülasyonlarında 0,01 mg/g konsantrasyonu, 48 saatte kanser hücre canlılığını CCD-1079Sk'dan daha fazla azaltmıştır (Şekil 6.20 D, E). Hücrelere DMSO'daki A7G ve apigenin çözeltileri uygulanırken (Şekil 6.20 F), krem ve ekstre örnekleri mumlu kağıtla uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (n=3) olarak ifade edilmiştir. Uygulama yöntemine bağlı olarak farklılıklar gözlemlemek mümkündür.



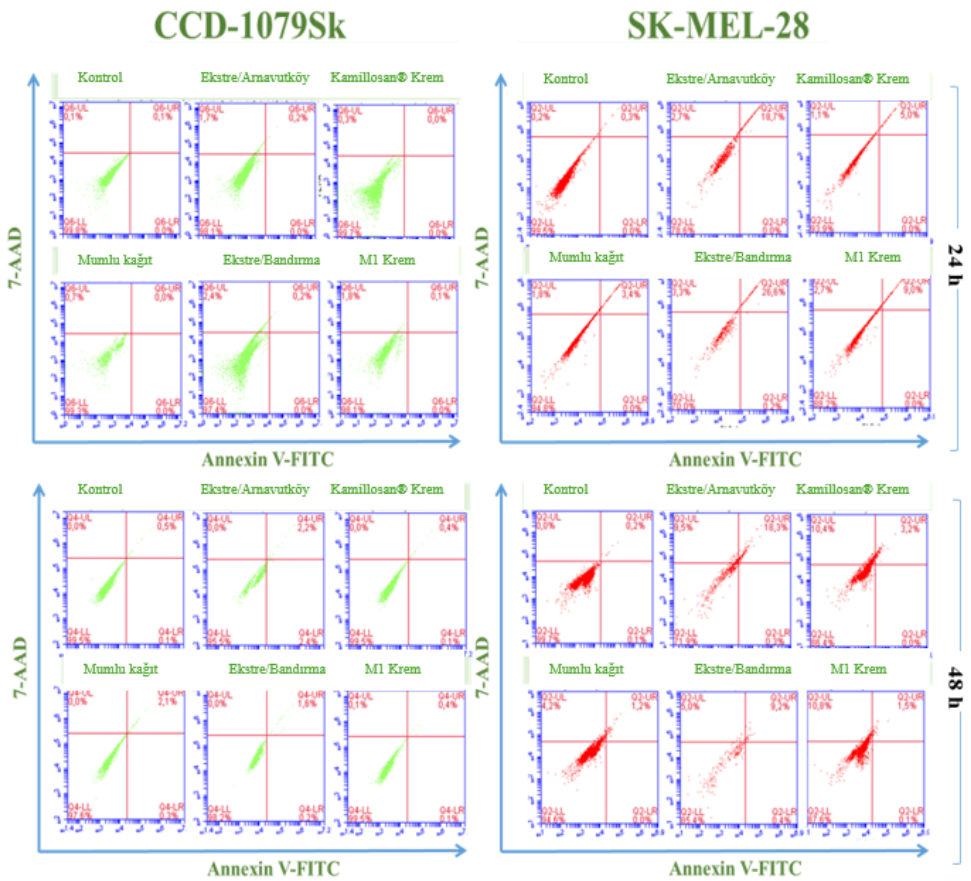
Şekil 6.20: Örneklerin CCD-1079Sk ve SK-MEL-28 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik muamelesi sonra canlılığı.

M. recutita çiçek ekstrelerinin SK-MEL hücreleri üzerindeki sitotoksisitesi bir yayında araştırılmıştır. Bu çalışmada, 0,8 mg/mL konsantrasyonunda sitotoksik etki gözlenmemiştir [135]. Mevcut çalışmadaki en yüksek doz olan 0,5 mg/mL konsantrasyonunda sitotoksik etki gözlenmemiştir. Sonuçlar önceki çalışmalarla tutarlıdır. *M. recutita* çiçek ekstrelerinin melanom hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur. Özellikle, B16F10 melanom hücre hatları üzerinde yürütülen araştırmalar, *M. recutita* ekstrelerinin doza bağlı bir şekilde hücre ölümüne yol açan önemli sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir [136]. *M. recutita,* diğer kanser tipleri üzerindeki etkileri açısından da incelenmiştir. Örneğin, hepatosellüler karsinom hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışma, papatya ekstrelerinin anti-proliferatif etkilere sahip olduğunu ve hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını bulmuştur [137]. Ek olarak, *M. recutita*'nın 5-florourasil ile kombinasyonunun antitümör aktivitesini artırdığı ve kemoterapinin yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir [138].

Bu bulgular, *M. recutita* ekstrelerinin melanom ve diğer kanserler üzerindeki potansiyel terapötik etkilerini vurgulamaktadır. Ayrıca, bu etkilerin mekanizmalarını ve klinik uygulamalarını açıklamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu da göstermektedir.

6.12.2 Apoptoz analizine ait bulgular

CCD-1079Sk ve SK-MEL-28 hücrelerine karşı Annexin V-FITC ve 7-aminoactinomycin-D çift boyama yöntemi ile Flow sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, Arnavutköy ekstresinin Balıkesir'e kıyasla biraz daha düşük toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir; bu fark, 24 saatlik inkübasyon sonrası toplam apoptoz/nekroz hücre popülasyonunda CCD-1079Sk hücreleri için yaklaşık %1,9 ve %2,6, SK-MEL-28 hücreleri için ise %21,4 ve %30,1 olarak gözlemlenmiştir. Buna göre, Kamillosan® krem ve M1 krem'in A7G için sabit konsantrasyonda (0,63 mg/g) 24 saat ve 48 saat inkübasyondan sonra CCD-1079Sk hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Ancak, Kamillosan® krem ve M1 krem ile kanser hücrelerinin tedavisinin apoptotik/nekrotik hücre sayısını artırdığı bulunmuştur. M1 test kremi grubu, SK-MEL-28 hücrelerinde sırasıyla 24 ve 48 saat boyunca %11,7 ve %12,4 toplam apoptotik/nekrotik hücre popülasyonu oluşturmuştur. Sonuçlar Şekil 6.21'de gösterilmiştir.



Şekil 6.21: Örneklerin 24 ve 48 saatlik muamelesi sonrası CCD-1079Sk ve SK-MEL-28 hücrelerindeki apoptoz analizi.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

M. recutita çiçek kısımları EMA monografına göre şişkinlik ve minör spazmlar gibi minör mide-bağırsak şikayetlerinin semptomatik tedavisinde, soğuk algınlığı semptomlarının giderilmesinde, ağız ve boğazdaki iltihapların ve minör ülserlerin tedavisinde, anal ve genital bölgedeki cilt ve mukoza tahrişlerinin adjuvan terapisinde, derinin hafif iltihaplanması (güneş yanığı), yüzeysel yaralar ve minör çıbanların tedavisinde geleneksek olarak kullanılmaktadır [12]. Bu tez kapsamında Bandırma/Balıkesir bölgesinde yetiştirilen *M. recutita* bitkisinin çiçek kısımları kullanılarak EMA monografında yer alan, farklı çözücü sistemlerine ve oranlarına sahip 14 farklı katı ve sıvı ekstreler hazırlanmıştır. Bu ekstrelerin her birinin A7G içerikleri HPLC-PDA yöntemi ile analiz edilmiştir. Ekstrelerin A7G içerikleri ve EMA monografında belirtilen uygulama yolu ve endikasyonları göz önünde bulundurularak üç farklı ekstre (G, M, N ekstreleri) seçilmiştir. Bu ekstrelerden G ekstresi oral, inhalasyon, oromukozal, kutanöz ve banyo katkı maddesi olarak direkt ekstre formunda kullanıma sahiptir. M ve N ekstreleri ise kutanöz olarak yarı-katı formda kullanılmaktadır.

Daha büyük ölçekte bu üç ekstre (G, M, N) tekrar hazırlanmıştır. Bu ekstrelerin A7G içerikleri likit G ekstresi için 1,679 mg/mL, likit M ekstresi için 4,161 mg/ mL, katı N ekstresi için 14,451 mg/g olarak analiz edilmiştir. Bu üç ekstrenin A7G içeriklerinin belirlenmesinde kullanılan ve geliştirilen HPLC-PDA yöntemi valide edilmiştir. ICH yönergelerine göre, HPLC-PDA yöntemi kesinlik, seçicilik, doğruluk, tespit limiti, tayin limiti, sağlamlık ve doğrusallık açısından geliştirilmiş ve validasyonu gerçekleştirilmiştir [93]. İlk yıl Bandırma bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan ve validasyon çalışmalarında kullanılan G, M, N ekstrelerinin 2-8°C, 25°C/60% RH, 40°C/75% RH ve 60°C sıcaklık koşulları altındaki A7G içeriğindeki değişiklikler takip edilmiştir. Flavonoitler, yararlı biyo-fonksiyonlara sahip doğal polifenolik bileşiklerdir.

Ancak, termal ve diğer faktörlere karşı duyarlılık ve kimyasal kararsızlığa sahiptirler [124]. Sıcaklığın artması flavonoidlerin bozulmasına neden olabilir [46]. Stabilite sonuçları değerlendirildiğinde, sıcaklık A7G üzerinde önemli bir rol oynamış ve sıcaklığın artması üç ekstrenin de A7G içeriğini olumsuz yönde etkilemiştir. 2-8°C'deki sonuçlar 25°C/%60 RH'ye göre biraz daha iyidir. 40°C/%75 RH ve 60°C koşullarında, özellikle 60°C'de A7G miktarında belirgin azalmalar gözlemlenmiştir. Artan sıcaklığın etkisiyle üç ekstre için en kötü saklama koşulu 60 °C ve en stabil saklama koşulu 2-8°C olarak belirlenmiştir.

Daha sonraki yılda, Bandırma/Balıkesir ve Arnavutköy/İstanbul bölgelerinde yetiştirilen *M. recutita*'nın çiçek kısımlarından bu üç ekstre hazırlanmıştır. İkinci yıl Bandırma bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan G, M, N ekstrelerinin A7G içerikleri sırasıyla 2,212 mg/mL, 3,760 mg/mL ve 11,378 mg/g olarak belirlenmiştir. Arnavutköy bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan G, M, N ekstrelerinin A7G içerikleri ise sırasıyla 3,171 mg/mL, 6,434 mg/mL ve 21,820 mg/g olarak belirlenmiştir.

Ayrıca bu bitkilerin uçucu yağları elde edilmiş ve içerikleri GC-FID/MS yöntemi ile belirlenmiştir. Nem ve A7G içerikleri analiz edilmiştir. Bitki materyalleri uçucu yağ verimi, nem içeriği ve A7G içerikleri açısından EP *M. recutita* çiçek monografında yer alan limitler dahilinde bulunmuştur [28].

Ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. İlk yıl Bandırma bölgesinden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin fenolik içerikleri sırasıyla %0,43, % 0,14 ve % 2,70 olarak, ikinci yıl Bandırma bölgesinden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin fenolik içerikleri sırasıyla %0,50, % 0,17 ve % 3,27 olarak, Arnavutköy bölgesinden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin fenolik içerikleri sırasıyla %0,40, % 0,25 ve % 4,39 olarak tespit edilmiştir. İlk yıl Bandırma bölgesinden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin flavonoit içerikleri sırasıyla %0,09, % 0,06 ve % 1,06 olarak, ikinci yıl Bandırma bölgesinden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin flavonoit içerikleri sırasıyla %0,12, % 0,06 ve % 1,17 olarak, Arnavutköy bölgesinden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin flavonoit içerikleri sırasıyla %0,25, % 0,10 ve % 2,10 olarak tespit edilmiştir.

Bandırma ve İstanbul örneklerinden elde edilen G, M ve N ekstrelerinin fenolik madde içeriklerinin fitokimyasal taraması LC-HRMS cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Ekstrelerin fenolik içeriklerinde kalitatif olarak çok büyük farklıklar olmamakla birlikte, genel olarak A7G, klorojenik asit, hispidulin 7-glikozit, herniarin, apigenin-7-O-açil glikozit ve apigenin bileşiklerini majör olarak içermekteydi.

Arnavutköy bölgesinde yetiştirilen bitkiden elde edilen ekstrenin A7G içeriğinin, toplam fenolik ve toplam flavonoit içeriklerinin daha yüksek olması nedeniyle bu bölgeden toplanan bitkiden hazırlanan M ve N ekstreleri kullanılarak iki farklı topikal ürün formüle edilmiştir. G ekstresi, tek başına çözelti formunda ürün olarak kullanılmaktadır.

Referans Kamillosan® kremin A7G içeriğine eşdeğer olarak Arnavutköy bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan M ekstresini içeren krem (M1) formüle edilmiştir ve stabilitesi 6 ay boyunca 25°C/%60 RH ve 40°C/%75 RH sıcaklık koşullarında takip edilmiştir. Formüle edilen M1 krem ve referans Kamillosan Krem® için başlangıç A7G içerikleri 0,63 mg/g olarak analiz edilmiştir. Formüle edilen M1 kremin 6 aylık stabilite sonuçları incelendiğinde, 25°C/%60 RH'de A7G içeriği % 4,8 azalmış ve majör bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca pH, görünüş ve reolojik olarak stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. 40°C/%75 RH'de ise A7G içeriğinde sıcaklık artışı ile %12,7 düşüş gözlemlenmiştir. pH ve görünüş açısından stabilitesini korumuş ve reolojik olarak viskozitesinde düşme gözlemlenmiştir. Fakat ürünün görünüşünde bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu bulgulara dayanarak iki ortamda da M1 kremin stabil olduğu, fakat en iyi saklama koşulunun 25°C/%60 RH olduğu belirlenmiştir.

Referans Kamillosan Salbe® merhemin A7G içeriğine eşdeğer olarak Arnavutköy bölgesinden toplanan bitkiden hazırlanan N ekstresini içeren yağlı bir krem (N1) formüle edilmiştir ve stabilitesi 6 ay boyunca 25°C/%60 RH ve 40°C/%75 RH sıcaklık koşullarında takip edilmiştir. Formüle edilen N1 krem ve referans Kamillosan Salbe® için başlangıç A7G içerikleri 0,56 mg/g olarak analiz edilmiştir. Formüle edilen N1 kremin 6 aylık stabilite sonuçları incelendiğinde, 25°C/%60 RH'de A7G içeriği % 8,9 azalmış ve majör bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca pH, görünüş ve reolojik olarak stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. 40°C/%75 RH'de ise A7G içeriğinde sıcaklık artışı ile %25'lik bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu sıcaklıkta görünüş açısından stabilitesini korumuş, fakat pH 5,62'ye kadar düşmüştür. Ayrıca reolojik olarak viskozitesinde düşme gözlemlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak 40°C/%75 RH'de koşulunda N1 ürününün 6. Ay sonunda fiziko-kimyasal olarak stabil olmadığı anlaşılmaktadır. Bu bulgulara dayanarak, 40°C/%75 RH koşulunda N1 kremin

stabilitesinin çok iyi olmadığı, 25°C/%60 RH saklama koşulunda ürünün stabil olduğu belirlenmiştir.

Kamillosan® krem ile M1 kremin ve Kamillosan Salbe® merhem ile N1 kremin *in vitro* salım profilleri karşılaştırılmıştır. *In vitro* salım testleri, bir dozaj formundan ilacın salım özelliklerini incelemek, ilacın *in vitro* performansı hakkında bilgi sağlamak ve diğer ürünlerle karşılaştırmaya olanak sağlamak için kullanılmaktadır. Farmasötik alanda, bu testler dozaj formlarının geliştirilmesi ve kalite kontrolü için çok önemlidir ve ilacın potansiyel *in vivo* etkinliği hakkında fikir vermektedir [133].

Kamillosan® krem ve M1 kremin Franz difüzyon hücreleri ve diyaliz membranı kullanılarak yapılan *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen profillerden, M1 kremin salım değeri 35,76 µg/cm^2 olarak belirlenirken, Kamillosan® kremin 6. saat sonundaki salım değeri 29,87 µg/cm^2 olarak belirlenmiştir. M1 kremin A7G kümülatif salım miktarının Kamillosan® kremden biraz hızlı olduğu ortaya çıkmış fakat anlamlı bir fark elde edilmemiştir. M1 kremin daha hızlı salınımı nedeniyle *in vivo* çalışmalarda referans üründen daha etkili olması beklenmektedir. Salım hızı sabiti (k) değerlerinin birbirine yakın olması, etken maddenin her iki üründe de difüzyon hızlarının benzer olduğu anlamına gelmektedir. Salım hızı sabiti (k) M1 krem için 9,67, Kamillosan krem® ise 8,53 olarak olarak hesaplanmıştır. M1 kreminin A7G salım hızının Kamillosan krem®'den biraz hızlı, fakat aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Kamillosan Salbe® ve N1 kremin *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen profillerden, formüle edilmiş N1 kreminin salım değeri 24,55 µg/cm^2 olarak belirlenirken, Kamillosan Salbe® merhemin 6. saat sonundaki salım değeri 20,02 µg/cm^2 olarak belirlenmiştir. N1 kremin A7G kümülatif salım miktarı Kamillosan Salbe® merhemden biraz hızlıdır. Salım hızı sabiti (k) N1 krem için 4,64, Kamillosan Salbe® merhemin ise 3,76 olarak olarak hesaplanmıştır. N1 kreminin A7G salım hızının Kamillosan Salbe®'den çok az hızlı, fakat aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Ek olarak, M1 kremin fiziko-kimyasal olarak N1 kremine göre daha stabil olması nedeniyle, Bandırma ve İstanbul bölgelerinden elde edilen M ekstrelerinin ve M ekstresini içeren topikal kremin (M1) hücre canlılığı profili ve apoptotik etkisi, fibroblast (CCD-1079Sk) ve melanom (SK-MEL-28) hücre kültürleri üzerinde

değerlendirilmiştir. *In vitro* sitotoksisite ve apoptoz sonuçları, Balıkesir örneğinden elde edilen ekstrenin SK-MEL-28'de İstanbul örneğinden elde edilen ekstreden daha yüksek bir toksisite ve apoptotik orana sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Kamillosan® kremle karşılaştırıldığında, formüle edilmiş M1 kreminin melanom hücre hatları için biraz daha toksik olduğu bulunmuştur.

M. recutita bitkisini içeren fitofarmasötik ürünler ülkemizde yok denecek kadar az ve mevcut ürünler ise kalite kontrol analizleri gerçekleştirilmeden tüketicinin kullanımına sunulmaktadır. Bu nedenle, bitkinin çiçeklerinin gıda, kozmetik ve ilaç sanayiinde değerlendirilmesi, ülke ekonomisine kazandırılması, ürüne dönüştürülmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle yerli bitkisel kaynaklarımızın doğru, etkin ve ekonomik getirisi yüksek kullanımı, bitkilerin bu bölümlerinin sanayiiye kazandırılması ile mümkündür. Bu tezin ana hedefi ülkemiz için büyük ekonomik öneme sahip *M. recutita* bitkisinin çiçeklerinden yüksek katma değerli, standardize edilmiş, yerli ekstre ve bu ekstreden fitofarmasötik ürünler elde etmektir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar kapsamında, ekstrelerin EMA monografına göre hazırlanması ekstrelerin güvenilirliğine katkı sağlamıştır. Ekstrelerin A7G içeriklerinin geliştirilmiş ve valide edilmiş HPLC-PDA yöntemi ile standardize edilmesi ve farklı sıcaklıklar altındaki stabilitesinin takibi sonrasında uygun saklama koşulunun belirlenmesi ile kalitesinin sürdürülebilirliği sağlanmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik ve flavanoit içeriklerinin belirlenmesi, fenolik bileşenlerinin aydınlatılması ekstrelerin sahip olduğu etkinliklerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Böylece elde edilene ekstreler ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde, fitofarmasötik ürünlerin geliştirilmesinde kaliteli, etkili ve güvenilir birer hammadde olarak kullanılabilecektir. Aynı zamanda geliştirilen ve valide edilen HPLC-PDA yöntemi ekstrelerinin kalite kontrolünde güvenli bir şekilde kullanılabilecektir.

Bir patent araştırmasına göre, cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere firmaların *Matricaria* türlerini içeren çeşitli formülasyonların geliştirildiği görülmektedir. Bu, *Matricaria*'ya dayalı yeni ilaçların önümüzdeki yıllarda ilaç pazarına ulaşma olasılığını düşündürmektedir [13]. Ayrıca, literatürde daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, *M. recutita* ekstresini içeren topikal ürünlerin A7G içeriklerinin *in vitro* salım profillerini inceleyen yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, formüle edilen topikal ürünlerin *in-vitro* çalışmalar ile etkinliği desteklenmiştir. Fiziko-kimyasal özelliklerinin farklı sıcaklıklar altında takip edilmesi ile kalite sürekliliğinin sağlanması için gerekli olan uygun saklama koşulları belirlenmiştir.

Tezde yapılan çalışmalar ile elde edilen bilimsel veriler ülkemizin, önemli tıbbi bitkilerinden olan bu değerli ihracat potansiyeli yüksek hammaddelerin ve ürünlerin ekonomiye kazandırılması ve hammaddenin sürdürülebilir hale dönüştürülmesi için bilimsel temel oluşturacaktır. *M. recutita* bitkisinden hazırlanan standardize ekstreler ve bu ekstrelerden hazırlanan fitofarmasötik ürünlerin hem iç pazarda hem de dış pazarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] **Firenzuoli, F., & Gori, L.** (2007). Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 4*(1), 37-40.

[2] **Faydaoğlu, E., & Sürücüoğlu, M. S.** (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty, 11*(1), 52-67.

[3] **Göktaş, Ö., & Gıdık, B.** (2019). Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2*(1), 145-151.

[4] **Acıbuca, V., & Bostan Budak, D.** (2018). Dünya'da ve Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 33*(1), 37-44.

[5] **Erenler, R., Yilmaz, S., Akşit, H., Sen, O., Gene, N., Elmastas, M., & ark.** (2014). Antioxidant activities of chemical constituents isolated from *Echinops orientalis* Trauv. *Records of Natural Products, 8*(1), 32-36.

[6] **Singh, O., Khanam, Z., Misra, N. & Srivastava, M. K.** (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews, 5*(9), 82-95.

[7] **Ali, A., Tabanca, N., Raman, V., Avonto, C., Yang, X., Demirci, B., Khan, I. A., & ark.** (2023). Chemical compositions of essential oils from German, Roman, and Chinese chamomile flowers and their biological activities against three economically important insect pests. *Records of Natural Products, 17*(4), 595-614.

[8] **Franz, C., Müller, E., Pelzmann, H., Hardh, K., Halva, S., & Ceylan, A.** (1985). Influence of ecological factors on yield and essential oil of camomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert syn, *Matricaria chamomilla* L.). *Acta Horticulturae, 188*, 157-162.

[9] **Cemek, M., Kağa, S., Şimşek, N., Büyükokuroğlu, M. E., & Konuk, M.** (2008). Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Natural Medicines, 62*(3), 284-293.

[10] **Mavandi, R. A. P. P.** (2020). Agricultural and biochemical of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Research in Medicinal and Aromatic Plants* (ss. 135-170). İksad yayınevi, Adıyaman.

[11] **Miguel, F. G., Cavalheiro, A. H., Spinola, N. F., Ribeiro, D. L., Barcelos, G. R. M., Antunes, L. M. G., Berretta, A. A., & ark.** (2015). Validation of a RP-HPLC-DAD method for Chamomile (*Matricaria recutita*) preparations and assessment of the marker, Apigenin-7-glucoside, safety and anti-inflammatory effect. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015*(1), 828437.

[12] **EMA/HMPC.** (2015). *European Union Herbal Monograph on Matricaria recutita L. Flos.* 10.08.2024, https://www.ema.europa.eu/en/documents/

annual-report/ annexes - 2015-annual-report-european-medicines-agency_en.pdf.

[13] **Dos Santos, D. S., Barreto, R. D. S. S., Serafini, M. R., Gouveia, D. N., Marques, R. S., de Carvalho Nascimento, L., Guimaraes, A. G., & ark.** (2019). Phytomedicines containing *Matricaria* species for the treatment of skin diseases: A biotechnological approach. *Fitoterapia*, *138*, 104267.

[14] **Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı.** (2021). *Papatya (Matricaria chamomilla, Chamaemelum nobile) Tarımı ve Endüstrisi Fizibilite Raporu*. Isparta: Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı.

[15] **Dadkhah, A., Kafi, M., & Rasam, G.** (2010). The effect of planting date and plant density on growth traits, yield quality and quantity of Matricaria (*Matricaria chamomilla*). *Journal of Horticultural Sciences*, *23*, 2.

[16] **Sharifi-Rad, M., Nazaruk, J., Polito, L., Morais-Braga, M. F. B., Rocha, J. E., Coutinho, H. D. M., Sharifi-Rad, J., & ark.** (2018). *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Microbiological Research*, *215*, 76-88.

[17] **Rolnik, A., & Olas, B.** (2021). The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 3009.

[18] **Inceer, H.** (2019). The genus *Matricaria* L. (Asteraceae) in Turkey. *Biodiversity: Research and Conservation*, *54*(1), 1-6.

[19] **Özcan, M., & İnceer, H.** (2022). Stem anatomical survey of the genera *Matricaria* and *Tripleurospermum* (Asteraceae) from Turkey with its taxonomical and ecological implications. *Botanica Serbica*, *46*(1), 143-151.

[20] **Inceer, H., & Bal, M.** (2019). Morphoanatomical study of *Matricaria* L. (Asteraceae) in Turkey. *Botanica Serbica*, *43*(2), 151-159.

[21] **Kew Royal Botanic Gardens Plants of the World Online:*Matricaria* L.** (2024). 05/08/2024, https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30012949-2.

[22] **Imerı, A., Zhurı, N., & Ismaılı, H.** (2022). Biological data of *Matricaria chamomilla* L. perspectives and promising future. *Acta Biologica Turcica*, *35*(3), 4-1.

[23] **Zorlu, N. (2022).** *Türkiye Florasında Doğal Yayılış Gösteren Matricaria Chamomilla L. ve Tripleurospermum Decipiens Bornm. Türlerinin Biyolojik Aktivitelerinin in Vitro, in Siliko incelenmesi ve Biyoaktif Fitokimyasallarının Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi).

[24] **Bizimbitkiler**:***Matricaria recutita.*** (2013). 05/08/2024, http://www.bizimbitkiler.org.tr.

[25] **Demirezer, L., Ersöz, T., Saraçoğlu, İ, Şener, B., Köroğlu, A., & Yalçın, F.** (2017). *Matricaria recutita* L. In *FFD Monografları-Bitkiler ve Etkileri*. (3. Ed., ss. 669-675). Akademisyen Kitapevi, Ankara.

[26] **Wu, H., Yang, K., Dong, L., Ye, J., & Xu, F.** (2022). Classification, distribution, biosynthesis, and regulation of secondary metabolites in *Matricaria chamomilla*. *Horticulturae*, *8*(12), 1135.

[27] **Davis, P. H.** (1988). *Matricaria* L. In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Cilt 10, pp. 163). Edinburgh University Press, Edinburg.

[28] **European Pharmacopoeia Commission.** (2019). ⟨0404⟩ Matricariae flos. *European Pharmacopeia 10.0*. EDQM.

[29] **Pirzad, A., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, S. A., Sharifi, R. S., & Hassani, A.** (2011). Effects of irrigation regime and plant density on essential oil composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla*). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 17*(2), 107-118.

[30] **Arslan, D., Bayraktar, Ö. V., Temel, M., & Bayram, E.** (2019). Economical analysis of chamomile (*Matricaria recutita* L.) cultivars, flower yields which are obtained from different sowing times and row spacing. *Journal of Agricultural Sciences, 25*(2), 129-136.

[31] **Benković-Lačić, T., Orehovec, I., Mirosavljević, K., Benković, R., Ćavar Zeljković, S., Štefelová, N., Salopek-Sondi, B. & ark.** (2023). Effect of drying methods on chemical profile of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Flowers. *Sustainability, 15*(21), 15373.

[32] **Böttcher, H., Günther, I., Franke, R., & Warnstorff, K.** (2001). Physiological postharvest responses of Matricaria (*Matricaria recutita* L.) flowers. *Postharvest Biology and Technology, 22*(1), 39-51.

[33] **Srivastava, J. K., & Gupta, S.** (2009). Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. *Molecular and Cellular Pharmacology, 1*(3), 138.

[34] **Letchamo, W.** (1996). Developmental and seasonal variations in flavonoids of diploid and tetraploid Camomile liqulate florets. *Journal of Plant Physiology, 148*(6), 645-651.

[35] **Imeri, A., & Zhuri, N.** (2022). General consideration of *Matricaria Chamomilla* L. *Acta Scientific Agriculture, 6*(6), 34-37.

[36] **Gosztola, B., Sárosi, S., & Németh, Ť.** (2010). Variability of the essential oil content and composition of chamomile (*Matricaria recutita* L.) affected by weather conditions. *Natural Product Communications, 5*(3), 465-70.

[37] **Url-1.** <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/174156/nutrients>. (Erişim Tarihi: 29.07.2024).

[38] **Chauhan, E. S., & Aishwarya, J.** (2018). Nutraceutical analysis of *Marticaria recutita* (Chamomile) dried leaves and flower powder and comparison between them. *International Journal of Phytomedicine, 10*(2), 111-4.

[39] **Telesinski, A., Grzeszczuk, M., Jadczak, D., & Zakrzewska, H.** (2012). Fluoride content and biological value of flowers of some chamomile (*Matricaria recutita* L.) cultivars. *Journal of Elementology, 17*(4), 703-712.

[40] **Hassanain, M. A., Abd-Ella, E. M., & Rady, M. M.** (2006). Response of growth, flowering, oil yield and chemical composition of *Matricaria chamomilla* L. plants to some micronutrient foliar applications. *Journal of Agricultural and Environmental Sciences Alexandria University Egypt, 5,* 2.

[41] **Gogoasa, I., Jurca, V., Alda, L. M., Velciov, A., Rada, M., Alda, S., Gergen, I., & ark.** (2013). Mineral content of some medicinal herbs. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 17*(4), 65- 67.

[42] **Cozma, A., Velcıov, A., Mıhuţ, C., Duma-Copcea, A., Rotarıu, L., Okros, A., Rada, M. & ark.** (2021). Evaluation of some essential mineral elements from different infusions of medicinal plants. *Research Journal of Agricultural Science, 53*(2), 83.

[43] **Başgel, S., & Erdemoğlu, S. B.** (2006). Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Science of The Total Environment, 359*(1-3), 82-89.

[44] **Amıragai, M. E., & Koç, A.** (2016). Ekim zamanı ve azot uygulamalarının mayıs papatyasının (*Matricaria chamomilla* L.) verim ve uçucu yağ üretimine etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *47*(1), 31-34.

[45] **Şahin, H., Tunç, R., & Subaşı, F. Ş.** (2023). Chamazulene content and hypoglycemic potential of *Matricaria chamomilla* L. samples collected from six different localities of Diyarbakır/Türkiye. *Commagene Journal of Biology*, *7*(2), 107-112.

[46] **Švehlíková, V., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Needs, P. W., Piacente, S., Kroon, P. A., & Bao, Y.** (2004). Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry*, *65*(16), 2323-2332.

[47] **Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I.** (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, *44*, 437-445.

[48] **Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C., & ark.** (2013). Infusion and decoction of wild german chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, *136*(2), 947-954.

[49] **Schilcher, H., Imming, P., & Goeters, S.** (2005). Active chemical constituents of *Matricaria chamomilla* L. syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Chamomile Industrial Profiles*, *4*, 55-76.

[50] **Ramata-Stunda, A., Boroduskis, M., Pastare, L., Berga, M., Kienkas, L., Patetko, L., Nakurte, I., & ark.** (2024). *In vitro* safety and efficacy evaluation of a *Juniperus communis* callus culture extract and *Matricaria recutita* processing waste extract combination as a cosmetic ingredient. *Plants*, *13*(2), 287.

[51] **Duan, X., Li, J., Cui, J., Li, H., Hasan, B., & Xin, X.** (2022). Chemical component and *in vitro* protective effects of *Matricaria chamomilla* (L.) against lipopolysaccharide insult. *Journal of Ethnopharmacology*, *296*, 115471.

[52] **Catani, M. V., Rinaldi, F., Tullio, V., Gasperi, V., & Savini, I.** (2021). Comparative analysis of phenolic composition of six commercially available chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) extracts: Potential biological implications. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), 10601.

[53] **Kim, J., Seo, C., Kwon, J., Kim, W., & Kim, J.** (2021). Development and Validation of HPLC-UV Based Quantitative Analytical Method for Apigenin-7-O-glucoside in *Matricaria chamomilla* Extract. *Food Supplements and Biomaterials for Health*, *1*(3), e30.

[54] **Petruľová-Poracká, V., Repčák, M., Vilková, M., & Imrich, J.** (2013). Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. *Food Chemistry*, *141*(1), 54-59.

[55] **Franke, R., & Schilcher, H.** (2006). Relevance and use of chamomile (*Matricaria recutita* L.). In *I. International Symposium on Chamomile Research, Development and Production* (Vol 1, ss. 29-43). Acta Horticulturae, Presov.

[56] **Url-2.** *<http://kimyakongreleri.org/K2014/4kozmetik-s004.pdf>*. (Erişim Tarihi: 28.07.2024).

[57] **Ezzat, S. M., El Bishbishy, M. H., El Kersh, D. M., Zayed, A., Salem, M. A., & Salama, M. M.** (2021). Herbal cosmeticology. In *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders* (ss. 129-168). Academic Press, Cambridge.

[58] **El Mihyaoui, A., Esteves da Silva, J. C., Charfi, S., Candela Castillo, M. E., Lamarti, A., & Arnao, M. B.** (2022). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): a review of ethnomedicinal use, phytochemistry and pharmacological uses. *Life*, *12*(4), 479.

[59] **Bahmani, M., Saki, K., Golshahi, H., Rafieian-Kopaei, M., Abdali, N., Adineh, A., Bahmani, F., & ark.** (2015). Ethnobotanical and therapeutic uses of camomille. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *7*(1), 640-5.

[60] **Stanojevic, L. P., Marjanovic-Balaban, Z. R., Kalaba, V. D., Stanojevic, J. S., & Cvetkovic, D. J.** (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *19*(8), 2017-2028.

[61] **Sarkic, A., & Stappen, I.** (2018). Essential oils and their single compounds in cosmetics-A critical review. *Cosmetics*, *5*(1), 11.

[62] **GEMAŞ AŞ.** (2024). RxMediaPharma® İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.

[63] **Url-3.** *<https://cache.pressmailing.net/content/00a3a24d-0e3a-4160-be82-90e7d8400398/Pressemappe_Kamillos~%20100%20Jahre%20jung.pdf>*. (Erişim Tarihi: 22.07.2024).

[64] **Asadi, Z., Ghazanfari, T., & Hatami, H.** (2020). Anti-inflammatory effects of *Matricaria chamomilla* extracts on BALB/c mice macrophages and lymphocytes. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, *19*(S1), 63-73.

[65] **Shipochliev, T., Dimitrov, A., & Aleksandrova, E.** (1981). Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Veterinarno-meditsinski Nauki*, *18*(6), 87-94.

[66] **Al-Hindawi, M. K., Al-Deen, I. H., Nabi, M. H., & Ismail, M. A.** (1989). Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *26*(2), 163-168.

[67] **Tomić, M., Popović, V., Petrović, S., Stepanović-Petrović, R., Micov, A., Pavlović-Drobac, M., & Couladis, M.** (2014). Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides-rich matricaria oil in a rat model of inflammation. *Phytotherapy Research*, *28*(5), 759-766.

[68] **Shoara, R., Hashempur, M. H., Ashraf, A., Salehi, A., Dehshahri, S., & Habibagahi, Z.** (2015). Efficacy and safety of topical *Matricaria chamomilla* L.(chamomile) oil for knee osteoarthritis: a randomized controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, *21*(3), 181-187.

[69] **Maschi, O., Cero, E. D., Galli, G. V., Caruso, D., Bosisio, E., & Dell'Agli, M.** (2008). Inhibition of human cAMP-phosphodiesterase as a mechanism of the spasmolytic effect of *Matricaria recutita* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(13), 5015-5020.

[70] **Seifi, A., Changizi, S., Khori, V., Hossini, F., Davarian, A., Jand, Y., Nanvabashi, F., & ark.** (2017). Hydro-alcoholic extract of *Matricaria recutita* exhibited dual anti-spasmodic effect via modulation of Ca^{2+} channels, NO and PKA2-kinase pathway in rabbit jejunum. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *7*(4), 334.

[71] **Tabaraei, Y., & Khalili, H.** (2018). The effect of inhalation of *Matricaria chamomile* essential oil on patients' anxiety before esophagogastroduodenoscopy. *Govaresh*, *22*(4), 232-238.

[72] **Ghamchini, V. M., Salami, M., Mohammadi, G. R., Moradi, Z., Kavosi, A., Movahedi, A., Aryaeefar, M. R. & ark.** (2019). The effect of chamomile tea on anxiety and depression in cancer patients treated with chemotherapy. *Journal of Young Pharmacists*, *11*(3), 309.

[73] **Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V. L., & Arnason, J. T.** (2007). Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the γ-aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *85*(9), 933-942.

[74] **Amsterdam, J. D., Li, Y., Soeller, I., Rockwell, K., Mao, J. J., & Shults, J.** (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral *Matricaria recutita* (chamomile) extract therapy for generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *29*(4), 378-382.

[75] **Shivananda Nayak, B., Sivachandra Raju, S., & Chalapathi Rao, A. V.** (2007). Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. *Journal of Wound Care*, *16*(7), 298-302.

[76] **Longo, R. E., & São Dimas, J.** (2011). Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. *Cirugia Bucal*, *16*(6), 716-21.

[77] **Jarrahi, M.** (2008). An experimental study of the effects of *Matricaria chamomilla* extract on cutaneous burn wound healing in albino rats. *Natural Product Research*, *22*(5), 422-427.

[78] **Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., & Kvetnaya, A. S.** (2008). Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against Helicobacter pylori. *Phytotherapy Research*, *22*(2), 252-253.

[79] **Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D.** (2007). *Matricaria recutita.* In *Herbal medicines* (pp. 389-393). Pharmaceutical Press, Chicago.

[80] **Özdemir, M. (2019).** *Matricaria chamomilla L. (mayıs papatyası) bitkisi üzerinde farmakope araştırmaları ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları* (Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi).

[81] **İlkimen, H., & Gülbandılar, A.** (2018). Lavanta, ada çayı, kekik ve papatya ekstrelerinin antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, *48*(4), 241-246.

[82] **Del Carmen Romero, M., Valero, A., Martín-Sánchez, J., & Navarro-Moll, M. C.** (2012). Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine*, *19*(6), 520-523.

[83] **Sebai, H., Jabri, M. A., Souli, A., Hosni, K., Rtibi, K., Tebourbi, O., Sakly, M. & ark.** (2015). Chemical composition, antioxidant properties and hepatoprotective effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract against alcohol-induced oxidative stress in rat. *General Physiology and Biophysics*, *34*(3), 263-75.

[84] **Srivastava, J. K., & Gupta, S.** (2007). Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(23), 9470-9478.

[85] **Mehmood, M. H., Munir, S., Khalid, U. A., Asrar, M., & Gilani, A. H.** (2015). Antidiarrhoeal, antisecretory and antispasmodic activities of *Matricaria chamomilla* are mediated predominantly through K^+-channels activation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*, 1-9.

[86] **Karbalaei, D. S., & Nourafshan, A.** (2009). Antiulcerogenic effects of *Matricaria chamomilla* extract in experimental gastric ulcer in mice. *İranian Journal of Medical Sciences*, *34*(3), 198-203.

[87] **Awaad, A. A., El-Meligy, R. M., Zain, G. M., Safhi, A. A., Al Qurain, N. A., Almoqren, S. S., Al-Saikhan, F. I., & ark.** (2018). Experimental and clinical antihypertensive activity of *Matricaria chamomilla* extracts and their angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Phytotherapy Research*, *32*(8), 1564-1573.

[88] **Bijak, M., Saluk, J., Tsirigotis-Maniecka, M., Komorowska, H., Wachowicz, B., Zaczyńska, E., Pawlaczyk, I., & ark.** (2013). The influence of conjugates isolated from *Matricaria chamomilla* L. on platelets activity and cytotoxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *61*, 218-229.

[89] **Hernandez-Ceruelos, A., Madrigal-Bujaidar, E., & De La Cruz, C.** (2002). Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicology Letters*, *135*(1-2), 103-110.

[90] **Roberts, R. E., Allen, S., Chang, A. P. Y., Henderson, H., Hobson, G. C., Karania, B., Alexander, S. P. H., & ark.** (2013). Distinct mechanisms of relaxation to bioactive components from chamomile species in porcine isolated blood vessels. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *272*(3), 797-805.

[91] **Hajaji, S., Alimi, D., Jabri, M. A., Abuseir, S., Gharbi, M., & Akkari, H.** (2018). Anthelmintic activity of Tunisian chamomile (*Matricaria recutita* L.) against Haemonchus contortus. *Journal of Helminthology*, *92*(2), 168-177.

[92] **European Pharmacopoeia Commission.** (2019). ⟨1544⟩ Matricariae Liquid Extract. *European Pharmacopeia 10.0*. EDQM.

[93] **EMA/HMPC.** (2023). *ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures,* 10.08.2024, https://www.ema.europa.eu/en/documents/ scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical -procedures-step -5-revision-1_en.pdf.

[94] **Salim, M., Saeed, A., Iqbal, M., Khan, B. A., Khan, N., Rabbani, I., Rasul, A., & ark.** (2022). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, total phenolic and flavonoid contents in various weed plants associated with wheat crops. *Brazilian Journal of Biology*, *82*, e256486.

[95] **Siddhant Srivastava, Najeebullah Najeebullah** (2024) Herbal Vanishing Creams: A Comprehensive Review of Natural Ingredients, Formulation Techniques, and Therapeutic Applications in Skincare. *Interantional Journal of Scientific Research in Engineering and Management*, *8*(2), 28499.

[96] **Uddin, M. F., Ullah, M. K., Ahmed, M. A., Samreen, S., & Habeeb, H.** (2019). Preparation and Evaluation of Polyherbal Vanishing Cream of Ethanolic Extract of Crude Drugs. *International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, *4*(04), 63-67.

[97] **Url-4.** *<https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/67653mod_resource / content/0/12.HAFTA_Dudak %20boyası%2C%20Yağsız%20krem %2C%20 Temizleyen%20krem.pdf>*. (Erişim Tarihi: 29.07.2024).

[98] **Url-5.** *<https://www.majistraleczader.org/formul-detay.php?grup=1&id= 134>*. (Erişim Tarihi: 29.07.2024).

[99] **Url-6.** *<https://www.slideserve.com/halden/yari-kati-la-ek-ller>*. (Erişim Tarihi: 29.07.2024).

[100] **Url-7.** *<file:///C:/Users/mcicek/Downloads/handbook-of-cosmetic-science-and-technology-third-edition%20(1).pdf >*. (Erişim Tarihi: 29.07.2024).

[101] **Mezger, T. G.** (2006). Flow behavior and viscosity. In *The Rheology Handbook* (2nd edition, pp. 19-72). Vincentz Network, Hannover.

[102] **FDA.** (2022). *Draft Guidance on Adapalene.* 30.07.2024, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_021753.pdf.

[103] **Adnan, M., Afzal, O., Altamimi, A. S., Alamri, M. A., Haider, T., & Haider, M. F.** (2023). Development and optimization of transethosomal gel of apigenin for topical delivery: *In-vitro, ex-vivo* and cell line assessment. *International Journal of Pharmaceutics, 631*, 122506.

[104] **EMA/CHMP.** (2018). *Draft guideline on quality and equivalence of topical products.* 30.07.2024, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-and-equivalence-topical-products_en.pdf.

[105] **Şenol, H., Çağman, Z., Gençoğlu Katmerlikaya, T., & Sinan Tokalı, F.** (2023). New anthranilic acid hydrazones as fenamate isosteres: synthesis, characterization, molecular docking, dynamics & *in silico* adme, *in vitro* anti-inflammatory and anticancer activity studies. *Chemistry & Biodiversity*, *20*(8), e202300773.

[106] **Ersen, B. C., Dağ, A., Sancakli, B., Ozgen, P. S. O., Yalcin, E. K., & Avci, B.** (2024). Glycopolymeric Photoactive Micelles for Glucose Transporter-Targeted Synergistic Combination Therapy. *ACS Applied Polymer Materials*, *6*(7), 4149-4163.

[107] **Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G.** (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *40*(4), 043101.

[108] **Orav, A., Raal, A., & Arak, E.** (2010). Content and composition of the essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from some European countries. *Natural Product Research*, *24*(1), 48-55.

[109] **Başer, K. H. C., Özek, T. E. M. E. L., Demirci, B. E. T. Ü. L., & Duman, H.** (2000). Composition of the essential oil of *Prangos heyniae* H. Duman et MF Watson, a new endemic from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, *15*(1), 47-49.

[110] **Hanoğlu, D. Y., Hanoğlu, A., Demirci, B., & Başer, K. H. C.** (2023). The essential oil compositions of *Teucrium* spp. belonging to the section *Polium* Schreb.(Lamiaceae) growing in Cyprus. *Records of Natural Products*, *17*(1), 113-124.

[111] **Altintas, A., Kosar, M., Kirimer, N., Baser, K. H. C., & Demirci, B**. (2006). Composition of the essential oils of *Lycium barbarum* and L. *ruthenicum* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*, *42*(1), 24-25.

[112] **Salehi, A., & Hazrati, S.** (2017). How essential oil content and composition fluctuate in German chamomile flowers during the day?. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *20*(3), 622-631.

[113] **Bettray, G., & Vömel, A.** (1992). Influence of temperature on yield and active principles of *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. under controlled conditions. In *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, XXIII IHC 306* (pp. 83-87). IS Acta Horticulturae, Budapeşte-Floransa.

[114] **Formisano, C., Delfine, S., Oliviero, F., Tenore, G. C., Rigano, D., & Senatore, F.** (2015). Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). *Industrial Crops and Products*, *63*, 256-263.

[115] **Baghalian, K., Abdoshah, S., Khalighi-Sigaroodi, F., & Paknejad, F.** (2011). Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, *49*(2), 201-207.

[116] **Afzali, S. F., Shariatmadari, H., Hajabbasi, M. A., & Moatar, F.** (2007). Salinity and drought stress effects on flower yield and flavonol-O-glycosides in Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *23*(3), 382-390.

[117] **Gosztola, B., Varga, L., Németh, É., Sárosi, S., & Szabó, K.** (2009). Effect of the year on the flavonoid and chlorogenic acid content of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Horticulture-Kertgazdasag*, *41*(3), 72-78.

[118] **Mehmet, G., & Sibel, A. O.** (2011). The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, *5*(1), 1-21.

[119] **Tiwari, P., & Singh, B. K.** (2016). HPLC: a modern approach of development and validation. *World Journal of Pharmaceutical Research*, *5*, 1616-31.

[120] **Moosavi, S. M., & Ghassabian, S.** (2018). Linearity of calibration curves for analytical methods: A review of criteria for assessment of method reliability. In *Calibration and Validation of Analytical Methods-A Sampling of Current Approaches* (ss. 109-127). Intechopen, UK.

[121] **Armbruster, D. A., & Pry, T.** (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews*, *29*(1), S49.

[122] **Haghi, G., Hatami, A., Safaei, A., & Mehran, M.** (2014). Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *9*(1), 31-37.

[123] **Redaelli, C., Formentini, L., & Santaniello, E.** (1981). Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of apigenin and its glucosides in flowers of *Matricaria chamomilla* and chamomile extracts. *Planta Medica*, *42*(07), 288-292.

[124] **Liu, W. N., Shi, J., Fu, Y., & Zhao, X. H.** (2019). The stability and activity changes of apigenin and luteolin in human cervical cancer Hela cells in response to heat treatment and Fe^{2+}/Cu^{2+} addition. *Foods*, *8*(8), 346.

[125] **Sulaiman, C. T., & Balachandran, I.** (2012). Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *74*(3), 258-260.

[126] **Sotiropoulou, N. S., Megremi, S. F., & Tarantilis, P.** (2020). Evaluation of antioxidant activity, toxicity, and phenolic profile of aqueous extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) prepared at different temperatures. *Applied Sciences*, *10*(7), 2270.

[127] **Lavanya, J., Periyar Selvam, S., Jeevitha Priya, M., Jacintha, P., & Aradana, M.** (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of selected medicinal plants against human oral pathogens. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *8*(9), 71-78.

[128] **Elmastas, M., Çinkiliç, S., & Aboul-Enein, H. Y.** (2015). Antioxidant capacity and determination of total phenolic compounds in daisy (*Matricaria chamomilla,* Fam. Asteraceae). *World Journal of Analytical Chemistry*, *3*(2), 9-14.

[129] **Pereira, S. V., Reis, R. A. S., Garbuio, D. C., & Freitas, L. A. P.** (2017). Dynamic maceration of *Chamomilla recutita* (L.) Rauscher inflorescences: optimal conditions for flavonoids and antioxidant activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *28*(1), 111-117.

[130] **De Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M.** (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food chemistry*, *338*, 127535.

[131] **Ueda, C. T., Shah, V. P., Derdzinski, K., Ewing, G., Flynn, G., Maibach, H., Yacobi, A., & ark.** (2009). Topical and transdermal drug products. In *Pharmacopeial Forum* (ss. 750-764). Rockville, ABD.

[132] **Url-8.** *<https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/15128/mod_resource/content/0/DERS-3.pdf >*. (Erişim Tarihi: 05.08.2024).

[133] **Çobanoğlu, E., & Şenel, S.** (2023). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerinin incelenmesinde kullanılan *in vitro* salım testi yöntemlerine genel bir bakış. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, *43*(1), 78-98.

[134] **Yadav, S., Yadav, A., Shukla, A. K., Kori, M. L., & Lodhi, S.** (2022). Formulation preparation and evaluation of Apigenin ointment for anti-inflammatory and wound healing activietis. *Advance Pharmaceutical Journal*, *7*(4), 113-120.

[135] **Sak, K., Nguyen, T. H., Ho, V. D., Do, T. T., & Raal, A.** (2017). Cytotoxic effect of chamomile (*Matricaria recutita*) and marigold (*Calendula officinalis*) extracts on human melanoma SK-MEL-2 and epidermoid carcinoma KB cells. *Cogent Medicine*, *4*(1), 1333218.

[136] **Jo, J. B., Kim, M. U., Lee, E. H., Kim, Y. J., Cho, E. B., Kang, I. K., & Cho, Y. J.** (2018). Whitening effect of extracts from *Matricaria chamomilla* L. with B16F10 melanoma cells. *Journal of Applied Biological Chemistry*, *61*(3), 267-273.

[137] **Al-Dabbagh, B., Elhaty, I. A., Elhaw, M., Murali, C., Al Mansoori, A., Awad, B., & Amin, A.** (2019). Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *BMC Research Notes*, *12*(1), 3.

[138] **Sah, A., Naseef, P. P., Kuruniyan, M. S., Jain, G. K., Zakir, F., & Aggarwal, G.** (2022). A comprehensive study of therapeutic applications of chamomile. *Pharmaceuticals*, *15*(10), 1284.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Mahmut ÇİÇEK

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2012, Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2015, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Tezli Yüksek Lisans Programı, "Kiral Organokatalizör Sentezi ve Uygulamaları"

DENEYİMLER:

- Albafarma İlaç / Kalite Kontrol Analisti
- Avis İlaç / Ar-Ge Formülasyon Geliştirme Uzman Yardımcısı
- Santafarma İlaç / Ar-Ge Formülasyon Geliştirme Uzmanı
- Bilim İlaç / Ar-Ge Formülasyon Geliştirme Kıdemli Uzmanı

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR:

- **Çiçek, M., Aydilek N., Ulusoy Ş., İnal, E., Akbal-İnan H., Dağ, A., Çağman, Z., Özsoy, Y., & Kartal, M.** (2024). Cytotoxic activity and evaluation of *in vitro* release of apigenin 7-O-glucoside from the topical pharmaceutical formulation containing *Matricaria Recutita* L. flower extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, 81*(3), 483-501.
- **Çiçek, M., Aydilek N., Ulusoy Ş., İnal, E., Akbal-İnan H., Özsoy, Y., & Kartal, M.** (2024). *In vitro* release and physicochemical characterization of topical cream formulation containing *Matricaria recutita* L. flower extract. *14th International Cosmetic Conference*, February 15-18, Antalya, Türkiye.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **İnal, E., Nath, E. O., Abudayyak, M., Ulusoy, Ş., İnan, H. A., Çiçek, M., & Kartal, M.** (2023). Chemical composition of different parts of the *Vitex agnus-castus* L. essential oils and their *in-vitro* cytotoxic activities. *Records of Natural Products, 17*(5), 904-917.
- **Ulusoy, Ş., İnal, E., Küpeli Akkol, E., Çiçek, M., Kartal, M., & Sobarzo-Sánchez, E.** (2024). Evaluation of the anti-obesity effect of *Sambucus nigra* L. (elderberry) and *Vitex agnus-castus* L. (chasteberry) extracts in high-fat diet-induced obese rats. *Frontiers in Pharmacology, 15*, 1410854.