

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PAPATYA İÇEREN KOZMETİKLERDE  
APIGENİN MİKTAR TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ecem SERİM**

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı**

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ**

**HAZİRAN 2017**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PAPATYA İÇEREN KOZMETİKLERDE  
APIGENİN MİKTAR TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ecem SERİM  
(150505104)**

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı**

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ**

**HAZİRAN 2017**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150505104 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Ecem SERİM, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "PAPATYA İÇEREN KOZMETİKLERDE APİGENİN MİKTAR TAYİNİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Doç. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

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

**Prof. Dr. Armağan ÖNAL** .....  
İstanbul Üniversitesi

**Teslim Tarihi** : **08.05.2017**  
**Savunma Tarihi** : **02.06.2017**



*Biricik Aileme,*

## **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.

Ecem Serim

İmza

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans ders döneminden bu yana üstün bilgi birikimini benimle paylaşan, tez çalışmasını yapmama imkan sağlayan değerli Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının her aşamasında bilgi birikimi ile beni yönlendiren, her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen, hoşgörü gösteren ve çok emeği geçen değerli danışmanım Doç. Dr. Şerife Evrim TEKKELİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu zaman zarfında yardım ve katkılarını esirgemeyen Eczacılık Fakültesindeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez sürem boyunca hayatımın her anında olduğu gibi beni teşvik edip maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan başta annem ve babam Nazmiye-Yakup SERİM'e, dedem Mehmet SERİM'e, abim Onur SERİM'e ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2017

Ecem Serim  
(Kimyager)

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

BEYAN.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	viii
TABLO LİSTESİ .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY .....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Papatya.....	3
2.2. Flavonoidler .....	6
2.2.1. Flavonoller .....	7
2.2.2. Flavanoller.....	9
2.2.3. İzoflavonlar .....	9
2.2.4. Antosiyanidinler .....	10
2.2.5. Flavanonlar.....	10
2.2.6. Flavonlar .....	10
2.3. Apigenin (APG) .....	10
2.3.1. Antikanserojenik, antitümör ve antimetastaz etkileri.....	11
2.3.2. Antioksidan etkileri .....	13
2.3.3. Antiviral, antifungal, antibakteriyel etkileri .....	13
2.3.4. Antiinflamatuvar etkileri .....	13
2.3.5. Cilt üzerine etkileri .....	14
2.3.6. Analiz Yöntemleri .....	15
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>20</b>
3.1. APG İçin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesinde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler, Preparatlar, Cihazlar ve Ekipman .....	20
3.1.1. Tez çalışması süresince kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler... 20	
3.1.2. Çözeltiler .....	20
3.1.3. Preparatlar .....	21
3.1.4. Aletler ve diğer gereçler .....	21
3.2. APG'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi.....	22
3.3. Validasyon .....	23
3.3.1. Yöntemin seçiciliği .....	23

3.3.2. Tayin ve gözlenebilme sınırı .....	23
3.3.3. Doğrusallık .....	23
3.3.4. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik.....	23
3.3.5. Çözelti stabilitesi .....	24
3.3.6. Doğruluk.....	24
3.3.7. Sağlamlık.....	24
3.4. Papatya Türlerine Ait Ekstreler İçeren Kozmetik Ürünlerde APG Analizi..	24
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>26</b>
4.1. APG'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analiz Sonuçları .....	26
4.1.1. Dedeksiyonun belirlenmesi .....	26
4.1.2. Kromatografik koşulların belirlenmesi .....	26
4.2. Yöntem Validasyonu .....	27
4.2.1. Seçicilik .....	27
4.2.2. Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD) .....	28
4.2.3. Doğrusallık .....	28
4.2.4. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik.....	31
4.2.5. Çözelti stabilitesi .....	31
4.2.6. Doğruluk.....	32
4.2.7. Sağlamlık.....	33
4.3. Kozmetik Ürünlerden APG Analizi Öncesi Numune Hazırlama .....	33
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>44</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>50</b>



## KISALTMALAR

<b>APG</b>	: Apigenin
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>DAD</b>	: Diod Array Dedektör
<b>DMF</b>	: Dimetilformamid
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik Asit
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>HPTLC</b>	: Ultraperformanslı İnce Tabaka Kromatografisi
<b>ICH</b>	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
<b>İTK</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>LOD</b>	: Gözlenebilme Sınırı
<b>LOQ</b>	: Tayin Sınırı
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit (Endotoksin)
<b>MS</b>	: Kütle Spektrometresi
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>RSD</b>	: Bağlı Standart Sapma
<b>SD</b>	: Standart Sapma
<b>SDS</b>	: Sodyumdodesil sülfat
<b>SPE</b>	: Katı Faz Ekstraksiyonu
<b>UHPLC</b>	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>UHPLC-MS/MS</b>	: Ultraperformanslı Sıvı Kromatografisi- Tandem Kütle Spektrometrisi
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1</b> : APG içeren bitkiler .....	11
<b>Tablo 4.1</b> : APG'nin 0,2–20 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.....	30
<b>Tablo 4.2</b> : Aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	31
<b>Tablo 4.3</b> : Oda sıcaklığında, otomatik numune örnekleyicisi ve buzdolabında bekletilen APG standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları .....	32
<b>Tablo 4.4</b> : Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları .....	32
<b>Tablo 4.5</b> : Numune hazırlama yöntemleri.....	37
<b>Tablo 4.5</b> : Numune hazırlama yöntemleri (devam) .....	38
<b>Tablo 4.5</b> : Numune hazırlama yöntemleri (devam) .....	39
<b>Tablo 4.5</b> : Numune hazırlama yöntemleri (devam) .....	40
<b>Tablo 4.6</b> : Geliştirilen yöntemeye ait kromatografik parametreler.....	41

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : <i>Matricaria chamomilla</i> .....	3
Şekil 2.2 : <i>Matricaria chamomilla</i> türünün içerdiği sekonder metabolitler.....	5
Şekil 2.3 : Flavonoidlerin genel yapısı.....	6
Şekil 2.4 : Flavonoidlerin biyosentezi.....	7
Şekil 2.5 : Flavonollerin genel yapısı.....	7
Şekil 2.6 : Rutin-kersetinin biyosentezi .....	8
Şekil 2.7 : Flavanollerin genel yapısı.....	9
Şekil 2.8 : İzoflavonların genel yapısı.....	9
Şekil 2.9 : Flavonların genel yapısı.....	10
Şekil 2.10 : APG'nin kimyasal formülü.....	10
Şekil 4.1 : APG'nin spektrumu .....	26
Şekil 4.2 : Boş deneme, 8 µg/mL standart APG çözeltisi, saç bakım serumu ve şampuan 1'e ait kromatogramlar.....	27
Şekil 4.2 : Boş deneme, 8 µg/mL standart APG çözeltisi, saç bakım serumu ve şampuan 1'e ait kromatogramlar (devam) .....	28
Şekil 4.3 : APG'nin 0,2–20 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	29

## PAPATYA İÇEREN KOZMETİKLERDE APİGENİN MİKTAR TAYİNİ

### ÖZET

İnsan bitki ilişkisi tarih öncesi dönemlerde başlamış olup insanlar bitkilerin tedavi edici gücünden binlerce yıldır faydalanmaktadırlar. Bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitler en az primer metabolitler kadar önemli olup birçok sektörde hammadde olarak kullanılmaktadırlar. Sekonder metabolitler arasında önemli bir yeri olan flavonoidlerin flavonlar grubundan apigeninin sitotoksik, antimitojenik, antioksidan, antiviral, antifungal, antibakteriyel ve başta antiinflamatuar etki olmak üzere cilt üzerinde çeşitli etkileri olduğu bilinmektedir. Kimyasal adı 5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiren-4-on dur. Apigenin birçok bitki türünde bulunmakla birlikte en yaygın olarak *Matricaria chamomilla* L. (Alman papatyası) ve diğer papatya türlerinde bulunmaktadır. Apigenin doğada glikozitleri şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

Cilt üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle birçok kozmetik preparatta *Matricaria türlerine* ait ekstrelelere rastlanmaktadır. Bu tez çalışmasında papatya içeren kozmetik ürünlerdeki apigenin varlığını araştırmak ve miktarını tayin edebilmek için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde durgun faz olarak C 18 kolon (250 mm x 4,5 mm x 5,6 µm), mobil faz olarak etanol: su (70:30, h/h) 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. İzokratik elüsyon uygulanmıştır. UV dedektörle 225 nm de çalışılmış, kolon ısı 25°C de sabitlenmiştir. Enjeksiyon hacmi 50 µL'dir. Apigenine ait pik 4,15 ± 0,4 dakikada gözlenmektedir. Yöntem ICH (International Conference on Harmonization) kriterlerine göre doğrusal, gözlenebilir, sınırlı, tayin sınırı, seçicilik, hassasiyet, sağlamlık, doğruluk ve kesinlik parametreleri çerçevesinde valide edilmiştir. Gözlenebilir ve tayin sınırı değerleri sırasıyla 0,060 ve 0,2 µg/mL olup doğrusal aralık 0,2-20 µg/mL'dir. Aynı ve farklı günlerde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri % 1,64 den küçüktür. Alıkonma (Retansiyon) zamanı 4,15 ± 0,4 dakikadır. Geliştirilen ve valide edilen yöntem 13 farklı tip, toplamda 15 adet kozmetik ürünün (vücut yağı, yüz ve vücut nemlendirici-temizleyici kremler, diş macunu, şampuan, saç kremi, makyaj temizleyici) analizine uygulanmıştır. Numune hazırlama için katı faz ekstraksiyonu tekniği uygulanmış ve C 18 kartuşlarla çalışılmıştır. Kozmetik ürünlerde geri kazanım % 81,6 – 93,4 arasındadır.

Yöntemin apigenin içirme potansiyeli olan kozmetiklerdeki analizlerde rutin olarak kullanılabilmesi, kalite kontrol ve standardizasyon sağlayabileceği ve benzer analitik yöntemleri geliştirme açısından da ışık tutacağı öngörülmektedir.

## DETERMINATION OF APIGENIN IN COSMETIC FORMULATIONS CONTAINING CHAMOMILE

### SUMMARY

The relationship between humans and plants has been started since prehistoric times and humans benefit from the therapeutic effects of plants for thousands of years. The secondary metabolites that are produced by plants are important almost primary metabolites, besides they are used in various areas as raw materials. It is known that apigenin, which is a flavonone as a member of a sub group of the important secondary metabolite type flavonoids, has antimutagenic, antioxidant, antiviral, antifungal, antibacterial effects and various effects on skin mainly antienflammatory effect. Its chemical name is 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-4H-1-benzopyren-4-one. Apigenin is found in so many plant species most widely in *Matricaria chamomilla* L. and other chamomile species. In nature we observe apigenin as gylcoside forms.

Due to the positive effects on skin we observe *Matricaria species* in various cosmetic formulations. In this thesis a new high performance liquid chromatography method has been devepoled in order to investigate the existance and amount of apigenin in cosmetic products. In the method C 18 column (250 mm x 4,5 mm x 5,6  $\mu$ m) were used as the stationary phase, ethanol: water (70:30, v/v) mixture was used as mobile phase with 1 mL/min flow rate. Isocratic elution was applied. The research was conducted with UV dedection at 225 nm wavelenght and column temperature was stabilized at 25 °C. The injection volume was 50  $\mu$ L. The peak that belongs to apigenin was observed at  $4,15 \pm 0,4$  min. The method was validated according to ICH criteria in terms of linearity, limit of dedection, limit of quantitation, selectivity, sensitivity, robustness, accuracy and precision. Limit of dedection and limit of quantitation values were 0,060 ve 0,2  $\mu$ g/mL respectively, linearity range was 0,2-20  $\mu$ g/mL. The relative standard deviation values of intra and interdays analyses were less than 1,64 %. The retention time was  $4,15 \pm 0,4$  minutes. The developed method was applied to the analysis of 13 different, totally 15 cosmetic products (body oil, face and body moisturising and cleaning creams, tooth paste, shampoo, hair cream, make up remover). Solid phase extraction technique was applied for sample preparation with C 18 cartridges. The recovery values for cosmetic products were between 81,6 – 93,4 %.

It is foreseen that the method will be able to be used in order to carry out routine analysis, quality control and standardization of apigenin and will give light the way for developing similarly new analytical methods.

## 1. GİRİŞ

Tarih öncesi dönemden bu yana bitkiler her zaman hayatımızın daimi bir üyesi olmuştur. Irak'ta bulunan Şanidar mağarasında yapılan kazılarda 60 bin yıl öncesine ait mezarda civanperçemi, kanarya otu, mor sümbül, peygamber çiçeği gibi bitki türleri bulunmuş olup insanların bitkilerle ilişkisine ilk örnek teşkil etmektedir [1]. 19. yüzyılda *Papaver somniferum* L.'dan morfin alkaloidinin izole edilmesiyle bitkilerdeki aktif maddeler üzerine araştırmalar başlamış glikozitler, saponinler gibi birçok madde keşfedilmiştir [2]. Günümüzde bitkiler tekstilden gıdaya, kozmetikten ilaç sanayisine kadar birçok sektörde kullanılmaktadır.

Eşsiz coğrafi yapısı, geniş yüzölçümü, yüksek tarım potansiyeli sebebiyle binlerce yıldır birçok uygarlığın kurulduğu Türkiye'de 12 bin civarı bitki türünün üçte biri endemiktir [3]. Compositae familyasında olan papatya, ülkemizde başta Marmara ve Ege bölgelerinde yetişmekte olup en çok bilinen iki çeşit tarafından temsil edilmektedir: *Matricaria chamomilla* L. (Alman papatyası) ve *Chamaemelum nobile* L. (Romen papatyası). *Matricaria chamomilla* içerdiği zengin etken maddeler sebebiyle analjezik, antienflamatuar, antimikrobiyal, sedatif gibi birçok aktivite gösterir [4-7]. İlaveten başta saç rengini sarartması ve saçı güçlendirmesiyle saç bakım ürünlerinde ve cilt üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle de diğer kozmetik preparatlarda kullanılmaktadır [8].

*Matricaria chamomilla* başta olmak üzere *Allium sativum* L., *Allium graveolens* L., *Matricaria spicata* L. ve *Petroselinum crispum* L. gibi diğer bazı türlerde de bulunan apigenin (APG) bir flavondur [9-11]. Antikanserojenik, antioksidan, antibakteriyel, antifungal gibi bir çok aktivite göstermektedir [12-15]. Papatya içeren birçok kozmetik preparatın antienflamatuar, antioksidan ve saç uzamasını hızlandırıcı vb. etkileri APG içermesine dayanmaktadır [16].

Bu çalışmada yaygın bulunan papatya içeren kozmetik ürünlerin içeriğindeki (vücut yağı, yüz ve vücut nemlendirici-temizleyici kremler, diş macunu, şampuan, saç kremi, makyaj temizleyici) APG maddesinin diğer bileşenlerle girişim yapamayacak şekilde seçici ve ng/mL düzeyinde hassas analizini sağlayacak bir yüksek

performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmek ve valide etmek amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak papatya içerdiği iddia edilen kozmetik ürünlerin analizlerinin rutin laboratuarlarda hızlı ve kolay bir şekilde yapılması sağlanacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Papatya

Bitki familyaları içerisinde yaklaşık bin cins içermesiyle en zengin familya Asteraceae (Compositae)'dir ve Türkiye'de 130 cinsi bulunur [17]. Asteraceae (Compositae) familyasından olan papatya eski çağlardan beri kullanılan 12 şifalı ottan biri olup *Anthemis nobilis* L. (syn. *Chamaemelum nobile*) ve *Matricaria chamomilla* (syn. *Matricaria recutita*, *Chamomilla recutita*) bilinen en yaygın türlerdir [4,5].



Şekil 2.1 : *Matricaria chamomilla*

Türkiye'de *Matricaria* cinsinin *Matricaria chamomilla*, *Matricaria inodora* ve *Matricaria aurea* olmak üzere 3 yabancı türü bulunmaktadır.

*Matricaria chamomilla* 15-60 cm uzunluğunda, çok dallı tek yıllık otsu bitkidir. Çiçeğinin tıbbi amaçla kullanılabilmesi için sonbahar'da ekilip mayıs-haziran ayları arasında toplanması gerekmektedir [18].

*Matricaria chamomilla* başta seskiterpenler, flavonoidler, kumarinler ve poliasetilenler olmak üzere 120 tane sekonder metabolit bileşikler içerir [5, 6, 19]. *Matricaria chamomilla* türünün içerdiği başlıca kumarinler umbelliferon ve



herniarin, flavonoidler ise apigenin, apigenin-7-O-glikozit, luteolin, luteolin-7-O-glukozit, kersetin, rutin ve naringenindir [5, 6, 20, 21].

*Matricaria chamomilla* çiçeklerinden ve çiçek başlarından elde edilen mavi renkli uçucu yağın ana bileşenleri poliin,  $\beta$ -farnesen, farnezol,  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -bisabolol oksitler A ve B, kamazulen ve  $\alpha$ -pinen'dir [5,6]. Kamazulen (matricin genellikle chamazulene dönüşür) su buharı distilasyonu sırasında açığa çıkan bir bileşiktir ve ayrıca yağın mavi rengi seskiterpenlerden kaynaklıdır [6]. Owlie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Matricaria chamomilla* türünden elde edilen uçucu yağın antibakteriyel ve antioksidan etkiler gösterdiği belirlenmiştir [22].

Papatyanın içerdiği bileşikler sebebiyle,

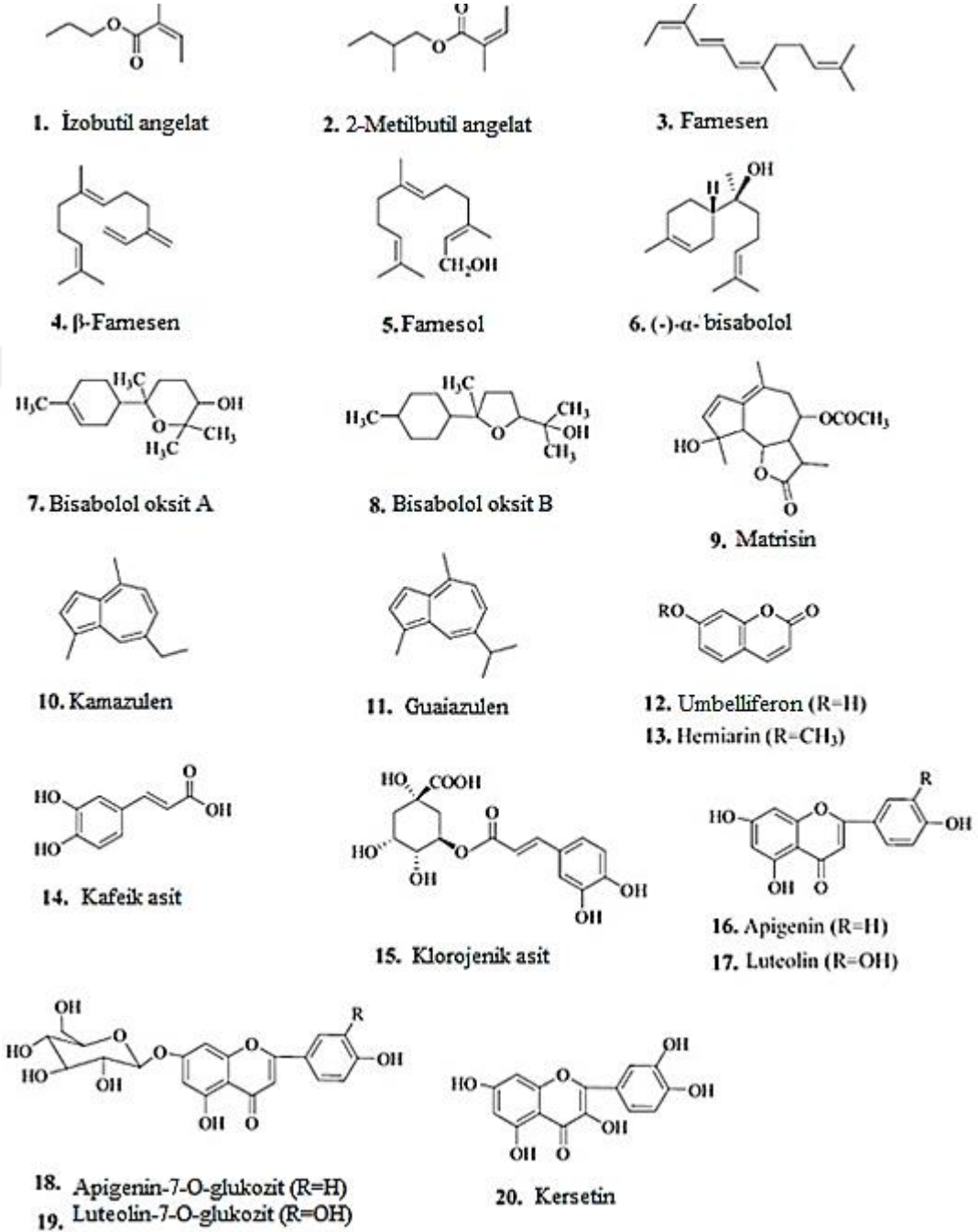
- Analjezik
- Antikanser
- Antienflamatuar
- Antimikrobiyal
- Antistres
- Antispazmodik
- Sedatif
- Antioksidan
- Gastrointestinal bozukları önleyici vb. bir çok aktivite gösterdiği görülmüştür [4-7].

APG ve glikozitleri antienflamatuar etki başta olmak üzere antikanser, antimikrobiyal etki,  $\alpha$ -bisabolol ise antiseptik, antiülseratif, antispazmodik ve antienflamatuar aktivite gösterir [6, 7, 23].

Papatya terapötik etkileri sebebiyle çok eski çağlarda beri kullanılmıştır. Eski Yunanlılar'ın eritem tedavisinde ezilmiş papatya çiçeklerini kullandıkları görülmüştür. Yüzyıllardır cilt tahrişlerinin ve yaralarının tedavisinde, egzamada, romatizmal ağrılarda, oftalmolojik enfeksiyonlarda, insomniada ve çeşitli gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır [5, 6].

Günümüzde de hem sedatif hem analjezik olarak hem de topikal uygulama yoluyla deri enflamasyonlarında kullanılmaktadır [19].

*Matricaria chamomilla* türünün antikanser aktivite göstermesine referans aktif bileşenlerinden biri olan APG ile yapılan çalışmalardır. Deri, prostat, yumurtalık gibi kanser çeşitleri üzerine yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde apoptozu indükleyip, gelecek vadede antitümör aktivite göstermiştir [5].



**Şekil 2.2** *Matricaria chamomilla* türünün içerdiği sekonder metabolitler.

Papatyanın topikal uygulanması sonucu içerdiği flavonoidlerin, insan gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada derinin hipodermis katmanına kadar ulaştığı görülmüştür. % 0,5 hidrokortizon ile papatyadan elde edilen kremin atopik dermatit

tedavisinde karşılaştırıldığı kısmen çift-kör randomize bir çalışmada 2 haftalık tedaviden sonra papatya kreminin tedavide hafif bir üstünlük sağladığı gözlenmiştir [5]. Yapılan diğer klinik çalışmalarda da atopik dermatit ve mukozit tedavilerinde pozitif sonuçlar görülmüştür [24]. Dermabrazyon yöntemiyle dövme silme yapılan hastaların yara iyileşmesinin papatya uygulamasıyla 15. günde kontrol grubuna kıyasla daha hızlı yaraları iyileşmiştir [21].

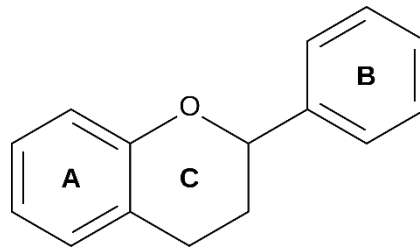
Bebeklerde kolik tedavisinde papatyanın rezene gibi diğer şifalı bitkilerle kombinasyon halinde çayının plasebo ile karşılaştırıldığı klinik çalışmalarda papatya içeren çayın bebeklerin büyük kısmında koliği ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [24].

Hem dinlendirici ve hem de tıbbi etkileri nedeniyle eski çağlardan beri tüketilen papatya çayı dünyanın en popüler bitki çaylarından birisidir. Günümüzde Dünya çapında bir milyondan fazla bardak papatya çayı tüketildiği öngörülmektedir [25]. Papatya çiçeklerinin uyku bozukluklarında ve enflamatuar hastalıkların giderilmesinde faydalı olmasının sebebinin özellikle apigeninin benzodiazepin reseptörlerine bağlanmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [5, 25].

Depresif geçen menstruasyon dönemlerinde tok karnına bir bardak *Anthemis nobilis* L. türü papatyanın demlenerek içilmesinin faydalı etkileri ortaya konmuştur [23]. Papatya kozmetik ürünlerde antienflamatuar ve yatıştırıcı etkileri sebebiyle sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca saçlara ışıltılar katmak için saç bakım sprelerinde de bulunmaktadır [8].

## 2.2 Flavonoidler

Flavonoidler sekonder metabolitlerin en önemli üyelerinden olup neredeyse tüm yeşil bitkilerin tohum, yaprak, çiçek, kabuk ve köklerinde bulunurlar. Şimdiye kadar 6000 üzerinde yapısı aydınlatılan flavonoidlerin temel yapıları C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> şeklindedir [26].



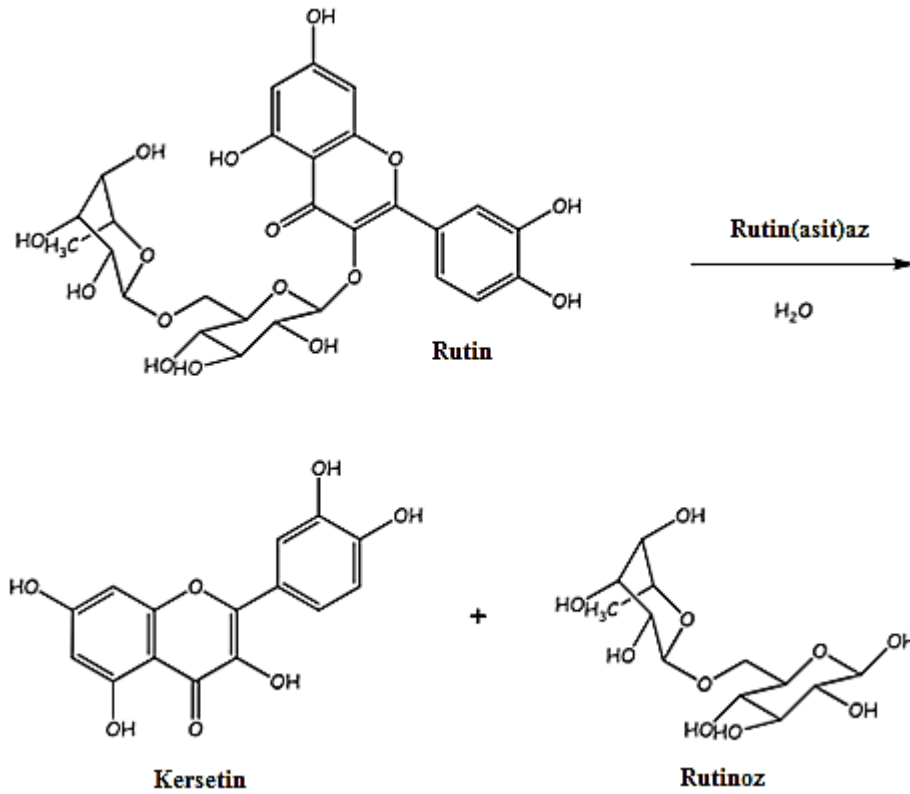
Şekil 2.3 : Flavonoidlerin genel yapısı.



Kersetin, rutin, mirsetin ve kamferol önemli flavonollerden olup çay, kırmızı şarap, elma, domates, kiraz ve soğanda bulunurlar [28].

Kersetin serbest radikallerin oksidasyonunu inhibe ettiği için güçlü antioksidan olarak sınıflandırılmıştır [36]. Kolon kanseri hücrelerinde apoptotik mekanizma ile hücre ölümünü uyarmaktadır [37]. Apoptozu düzenlemesindeki rolü, antimutajenik ve antiproliferatif etkileri nedeniyle kanser önleme için cazip bir bileşik olmuştur. Ancak güncel çalışmaların sonuçlarına bakıldığında kanser önlemede kersetinin sınırlı etkileri vardır ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır [36].

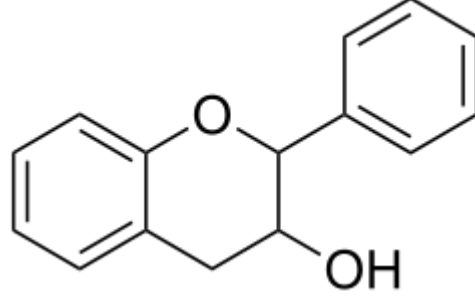
Rutin, kersetinin bir glikozitidir [40]. Yapılan çalışmada rutinün serbest radikalleri daha etkin temizlediği görülmüş olduğundan dolayı daha kuvvetli antioksidan aktivite gösterir [38]. Ayrıca rutin, kersetin ve hesperidinin antienflamatuar etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada rutinün en iyi antienflamatuar etkiyi gösterdiği, akabinde kersetin olduğu görülüp hesperidinin antienflamatuar aktivite göstermediği anlaşılmıştır [39].



**Şekil 2.6 :** Rutin-kersetin biyosentezi.

### 2.2.2 Flavanoller

Flavan-3-ol (IUPAC: 2-fenil-3,4-dihidro-2H-kromen-3-ol) temel yapısında olan kateşin, epikateşin, epigallo kateşin gallatı içeren yeşil çay, kakao ve elmada bulunan flavonoidlerin başka bir sınıfıdır [28].

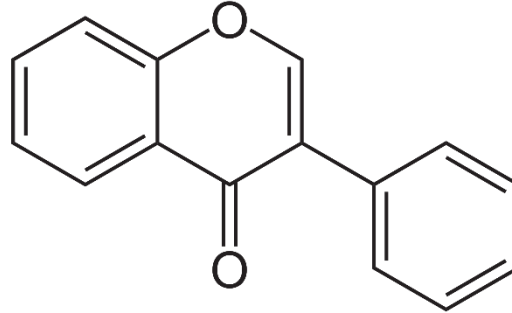


Şekil 2.7 : Flavanollerin genel yapısı.

Kateşinlerin invitro çalışmalarda yüksek konsantrasyonda antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür [41]. İlaveten kateşinlerin antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral, antiaging etkileri vardır [42].

### 2.2.3 İzoflavonlar

Fabaceae familyasının üyelerinin birçoğu önemli miktarda izoflavon içerir. Soya fasulyesi, yeşil fasulye ve diğer fasulye türlerinde “Genistein ve Daidzein” bulunmaktadır [28].



Şekil 2.8 : İzoflavonların genel yapısı.

Genistein, ilk olarak 1899 yılında *Genista tinctoria* L. türünden izole edilen anjiyogenez inhibitörü ve fitoöstrojendir. Genistein diğer birçok isoflavonoid gibi serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltıp antioksidan aktivite gösterir [43].

### 2.2.4 Antosiyanidinler

Siyanidin bu gruba ait olup kiraz ve böğürtlende sıkça rastlanır [28].

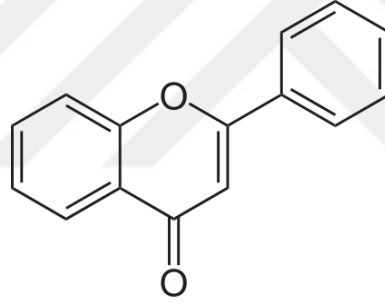
Yapılan rat çalışmalarında siyanidin, bazı artritik türlerinde düşük dozlarda olsa dahi şişmeyi önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [44]. Böylelikle enflamasyon azalır antiinflamatuvar etki göstermiş olur. İlaveten antioksidan etkileri olup DNA hücre hasarını engeller [20].

### 2.2.5 Flavanonlar

Hesperidin ve naringenin flavanonların en önemli bileşikleri olup greyfurt ve portakalda sıkça bulunurlar [28].

### 2.2.6 Flavonlar

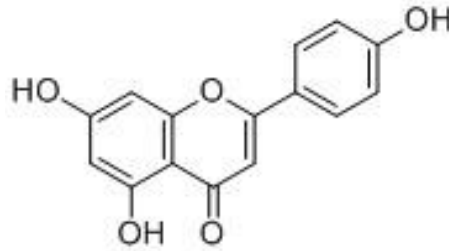
Apigenin, krisin ve luteolin en önemli örnekleri olmakla beraber *Thymus serpyllum* L. ve *Petroselinum crispum* L. türlerinde bolca bulunurlar [28].



Şekil 2.9 : Flavonların genel yapısı.

### 2.3 Apigenin

$C_{15}H_{10}O_5$  kapalı formülüne sahip molekül ağırlığı 270,24 g/mol olan sarı renkli bir flavondur. Kimyasal olarak 4',5,7-trihidroksiflavon veya 5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiren-4-on olarak bilinir.



Şekil 2.10 : APG'nin kimyasal formülü.

Normal şartlarda sarı katı kristaller halinde bulunur. Erime noktası 345-350°C olup -20°C de saklanması önerilir. Suda hemen hemen hiç çözünmemekle beraber metanolde çok az çözünür. Etanolde, DMSO da, DMF de ve 1:8 DMF:PBS (pH=7,2) karışımlarında çözünürlükleri sırasıyla 0,3; 15; 25 ve 0,1 mg/mL dir. Metanolde 267, 296 ve 336 nm de, etanolde 225 ve 325 nm lerde maksimum absorpsiyon gösterir.

APG en çok Asteraceae familyasından *Matricaria chamomilla* (Alman papatyası) çiçeklerinde bulunmakla beraber *Apium graveolens* (kereviz) yaprağında, *Allium sativum* L. (sarımsak) ve *Petroselinum crispum* L. (maydanoz) türlerinde de bolca bulunmaktadır [9-11]. Bitkilerin yaprak kısmında daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir [45].

**Tablo 2.1 :** APG içeren bitkiler.

Bitkilerin Latince Adları	Halk Dilinde Adları
<i>Achillea millefolium</i> L.	Civanperçemi
<i>Apium graveolens</i> L.	Kereviz
<i>Camellia sinensis</i> L.	Çay
<i>Chamaemelum nobile</i> L.	Romen Sarı Papatya
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Kişniş
<i>Digitalis purpurea</i> L.	Yüksük Otu
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Meyan
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Keten Tohumu
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Alman Papatyası
<i>Mentha spicata</i> L.	Nane
<i>Petroselinum crispum</i> L.	Maydanoz

### 2.3.1 Antikanserojenik, antitümör ve antimutajenik etkileri

Gupta ve arkadaşlarının insan prostat kanseri hücrelerinde farklı dozlarda APG kullanarak yaptıkları çalışmada apigeninin düşük toksisite göstererek vücuttaki anormalleşmiş hücrelerin ölümünü uyardığı gözlemlenmiştir [46].

APG akciğer melanom metastazını, tümör hücrelerinin endotel hücreler ile ilişkisini negatif yönde etkileyerek engeller [47]. Caltagirone ve arkadaşlarının yaptığı in vivo çalışmada ise APG doza bağımlı bir şekilde akciğer tümör koloni sayılarını azaltarak antitümör aktivite göstermiştir [48].



Geliştirilecek apigeninli tedavi yöntemiyle meme kanseri riskinin azalabileceğinden Siddique ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bahsedilmiştir [49]. Söz çalışmada oral kontraseptif olarak kullanılan etinil östradiol ile farklı dozlarda APG tedavileri karşılaştırılmış olup apigeninli tedavilerde DNA replikasyon endekslerinde belirgin bir artışla beraber kromozomal sapmalarda önemli ölçüde azalma olmuştur. Böylelikle etinil östradiol tedavisinde sıkça görülen kromozomal bozukluklar gibi yan etkilerin APG içeren tedavilerde çok az görülmesi geliştirilecek tedavi yöntemleriyle kanser oluşma riskinin azalabileceği ihtimalinin olduğu varsayılmıştır [50].

APG'nin kemoprentetif ajan olarak anlamlı derece de etkinliği olduğu insan epidermal hücre tahlilinden alınan örneklerle in vitro çalışmalarda gözlemlenmiştir [12].

Deri tümörü gelişimini engellediği Wei ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada gözlenmiştir. Farelerde dimetil benzantrasen ile başlatılan 12-O-Tetradekanoilforbol-13-asetat ile uyarılan deri tümöründe apigeninin topik uygulanması sonucu tümörün gelişimi inhibe edilmiştir [51].

APG'nin UV B ışınları ile oluşturulan fare deri kanser hücrelerine COX-2 ekspresyonunu engellemek yoluyla önleyici aktivite gösterdiği görülmektedir [52]. Bir başka çalışmada ise fare keratonizitleri UV B ile uyarılmış COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiği ancak insan keratonizitlerinde inhibe etmediği görülmüş olup bu farkın genetik farklılardan kaynaklandığı düşünülmektedir [53].

Kiraly ve arkadaşları apigeninin hem normal epidermisteki COX-2 düzeyini hem de tümör taşıyan farelerin nontümör epidermisindeki profilerasyonunu azaltarak COX-2 düzeyini düşürdüğü görülmüşlerdir [54].

Jangdey ve arkadaşları tarafından in vitro yapılan çalışmada APG'nin cilt kanseri üzerinde etkili olduğu ve başarıyla geliştirilebileceği sonucuna varılmıştır [55].

İlaveten doğal bir APG türevi olan protoapigenone, in vitro ve in vivo olarak apigenine göre 10 kat daha fazla anti-tümör aktivitesi göstermiştir [56].

### 2.3.2 Antioksidan etkileri

Raskovic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada apigeninin başarılı bir hepatoprotektif ajan olarak kullanılabileceği belirtilmiş olup söz konusu çalışmada apigenin, parasetamole bağlı hepatotoksisite de sıçanlarda lipid peroksidasyon düzeyini inhibe edip antioksidan savunma mekanizmalarını önemli ölçüde artırmıştır [13].

APG eritrositlerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidatif hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olup eritrositlerin antioksidan aktivitesini artırır [57].

### 2.3.3 Antiviral, antifungal, antibakteriyel etkileri

Terbinafin ile karşılaştırılmalı yapılan çalışmada apigeninin antifungal ajan olarak yan etki gözlenmeden kullanılacabileceği görülmüştür [14].

APG doza bağımlı olarak FMDV enfeksiyonunu (şap hastalığını) inhibe ederek antiviral aktivite göstermiştir [58].

*Streptococcus pneumonia* (pnömokok) menenjit, orta kulak iltihabı, sinüzit ve toplum kökenli pnömoniye neden olan bir bakteri türüdür ve vakaların yaklaşık %50'sinde görülür [59]. Başlıca amoksisilin, azitromisin gibi etken maddelerle tedavi edilir. Ancak antibiyotiklere karşı giderek artan direnç bilim adamlarını farklı etken maddeler arayışına itmiştir. *Streptococcus pneumoniae* enfekte edilen iki grup fareyle (1. grup 80 mg/kg APG ve 2. grup DMSO kontrol grubu) yapılan çalışmada APG ile tedavi edilen 1. grup farelerin akciğerlerindeki bakteri kolonizasyonu belirgin ölçüde azalmıştır. Yine aynı çalışmada apigeninin *S. Pneumoniae* türünün en önemli virülans faktörü olan PLY (Pneumolisin)'nin hemoliz, sitolitik aktivitesini inhibe edebilmesiyle birlikte PLY kaynaklı insan alveoler epitellerinde hücre hasarını hafifletebildiği görülmüştür [15].

### 2.3.4 Antienflamatuar etkileri

Arsic ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada topikal APG uygulaması sonucu antienflamatuar etkinlik gözlenmekle beraber yan etkiye rastlanmamıştır [60].

Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise farelerde lipopolisakkaritler ile uyarılan akciğer dokularında APG ön tedavisi ile akciğer dokusu nötrofillerinin azalıp koruyucu etkinlik sağlanmasıyla birlikte APG'nin akut akciğer hasarını azaltıp antienflamatuar etkinlik gösterdiği görülmüştür [61].

Yine yapılan başka bir çalışmada APG'nin anti enflamatuar etkinliği şu şekilde gözlenmiştir: Lipopolisakkaritler ile indüklenen fare makrofajları COX-2 ve nitrik oksit sentaz-2 aktivitelerini inhibe etmiştir [62].

### 2.3.5 Cilt üzerine etkileri

Krizantemden elde edilen APG'nin 9 gün boyunca topikal olarak normal murin derisine uygulanması sonucu derinin epidermal geçirgenlik bariyeri homeostazını iyileştirdiği görülmekle beraber APG hem filagrin hem de lipid üretimini artırdığı için atopik dermatit tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür [63]. Çünkü atopik dermatitte filagrin ekspresyonu azalmakla beraber geçirgenlik bariyeri bozulur. APG serum immünoglobulin (IgE) seviyesinin yükselmesini baskılayarak atopik dermatit semptomlarını hafifletir [64].

Chamomile ekstratlarından elde edilen APG'den lipozomal ve nonlipozomal iki krem türü oluşturulup kontakt dermatiti olan hastalara uygulanmıştır. Lipozomal tür krem daha etkin olmakla beraber her iki tür kremde iyileşme gözlenip herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır [60].

Antifungal etkisinin gözlemlendiği çalışmanın cilt üzerine olan etkisini anlamak adına daha detaylıdırılırsa: Çalışmada A, B, C, D, E ve F olmak üzere her biri 5 hayvandan (erkek Swiss albino fare) oluşan altı deney grubu bulunmaktadır. A grubu hariç diğer gruplara üç gün boyunca östradiol ile immünsüpresyon uygulanmıştır. Akabinde farelerin belirli kısmı traş edilip *T. mentagrophytes* kültürleri ile traş edilen bölgeye enfeksiyon verilmiştir. A ve B gruplarına kontrol grupları olması için tedavi verilmemiştir. C grubuna referans ilaç olan terbinafin 5 mg g<sup>-1</sup>, D ve E gruplarına sırasıyla *Terminalia chebula* L. türünden elde edilen ekstrattan 2,5 ve 5 mg/g uygulanmıştır. Test merhemi *Terminalia chebula* türünün kökünden izole edilen APG'dir. 25 ve 50 mg test ekstratı 10 g petrol jölesinde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. F grubuna ise 0,2 g petrol jölesi uygulanmıştır (Petrol jölesinin tedavide bir etkinliğinin olup olmadığını araştırmak hedeflenmiştir). A' da 26. günde spontan iyileşme olurken B de 32. günde spontan iyileşme gözlemlenmiştir. C ve E gruplarında tedavinin 2. gününden itibaren iyileşme başlamış ve 12. günde tamamen iyileşme olup yeni tüyler çıkmıştır. D grubunda ise 3. günden itibaren iyileşme olup 16. günde iyileşme sonlanmıştır. F grubu ise placebo grupları gibi iyileşme gösterdiği için petrol jölesinin tedavide bir etkinliği olmadığı gözlemlenmiştir. İlaveten

terbinafin de % 45 yan etki görülürken, APG'nin her iki konsantrasyonunda da yan etki oluşmamıştır [14].

Malign melanom diğer kanser türlerine göre az görülmekle beraber cilt kanserinin en tehlikeli türüdür. UV ışık maruziyeti ve derideki pigmentasyon oranı düşüklüğü sebebiyle beyaz tenli nüfusta görülme oranı daha fazladır. Zhao ve arkadaşlarının birden fazla etkiler (apoptoz, göç ve istila potansiyeli vb.) göz önüne alınarak yaptığı in vitro çalışmada APG'nin melanom hücrelerinin çoğalmasını etkili bir şekilde bastırdığı görülmüştür [65].

### 2.3.6 Analiz Yöntemleri

Nielsen ve Dragsted'in yaptığı çalışmada idrarda HPLC ile APG tayini gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada yüksek miktarda APG içerdiği için insanlara maydanoz yedirilip 24 saat sonra idrar numuneleri toplanmıştır. Numuneler 10 mL b-glukurodinaz ve 50 mL arilsülfataz ile enzimatik hidrolize uğrattılıp ardından katı faz ekstraksiyonu (SPE) uygulanmıştır. Asetonitril mobil faz olarak kullanılmış UV dedektör ile (350 nm) APG tayini gerçekleştirilmiştir [66].

Cai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada DMSO içerisinde çözüldürülen (2 mg/mL) stok çözeltisinden yine DMSO ile seyreltilen % 0,2 APG çözeltisi 2 hafta boyunca farelere uygulanmıştır. Ardından farelerin plazma, karaciğer ve gastrointestinal mukozaları toplanıp UV dedektör ile 336 nm de 0,1 M amonyum asetat içinde %55 metanol ile 0,27 mM etilen diamintetraasetik asit (EDTA) mobil fazları ile C 18 kolonda HPLC'de APG tayini yapılmıştır [67].

Dong ve arkadaşları *Matricaria chamomilla* ekstratını oral yoldan farelere verip sonra fare plazmasında metanol ve % 0,2 fosforik asit mobil fazlarında C 18 kolonda 350 nm fotodiod array dedektör (DAD) ile HPLC'de APG tayin etmişlerdir [68].

Yapılan başka bir çalışmada ise *Matricaria chamomilla* çiçeklerinin sulu ekstresi poliamid kolona aktarıldı. Ardından kolon önce su ile yıkanıp ekstrat etanol karışımı kolondan geçirildi. Toplanan fraksiyonlar toluen:metiletilketon:metanol (50:35:15) mobil fazlığında silika jel ile ince tabaka kromatografisi (İTK) uygulanıp APG izole edilmiştir [69].

Almeida ve arkadaşları *Tanacetum parthenium* bitkisinininden APG izole etmişlerdir. Bitki etanol:su (9:1) maserasyonu ile ekstrakte edilip vakum altında çözücüsü

uçurulmuştur. Ardından heksan:etilasetat (6:4) karışımı kullanarak silika jel üzerinde kolon kromatografisi uygulanıp ters faz HPLC yöntemiyle DAD ile 220 nm metanol:H<sub>2</sub>O (75:25) mobil fazı ile APG elde edilmiştir [70].

Sıçanlara antioksidan etkisinden dolayı uygulanmış *Erigeron breviscapus* L. ekstresinde APG'nin de dahil olduğu 12 biyoaktif bileşen ultraperformanslı sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometrisi (UHPLC-MS/MS) ile sıçan plazmasında analiz edilmiştir. Bileşenler plasma numunelerinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve proteinlerin çöktürülmesi teknikleriyle izole edilmiş ve C 18 kolon (2,1 mm x 50 mm, 1,8 mm) ile asetonitril: % 0,1 formik asitli mobil fazla ayırma gerçekleştirilmiştir. Çok fazla analit olduğundan 0,3 mL/dak. gibi yavaş bir elsyonla iyi bir ayırma gücüne ulaşılmıştır. Dedeksiyon olarak da tandem MS kullanılmasıyla 2,0 ng/mL gibi hassas düzeyde bir tayin sınırı elde edilmiştir. Bu alışmayla APG'nin de dahil olduğu tüm analitlerin farmakokinetik incelemesi yapılmıştır [71].

Yine bir UHPLC-MS/MS metoduyla Brezilya'nın Amazon bölgesinde yetişen 6 tıbbi bitkinin içeriğindeki fenolik bileşenler analiz edilmiştir. Toplamda 24 farklı bileşenin analiz edildiği çalışmada analitler arasında APG'nin de yer almaktadır. Ters faz kromatografisi kullanılmış ve C 18 kolon (2,1 x 50 mm, 1,8 mm) ile asetonitril: % 0,1 asetik asitli mobil fazla 0,8 akış hızı ve gradient elüsyon uygulamasıyla ayırma gerçekleştirilmiştir [72].

Massimo ve arkadaşları tarafından zeytin yağının içeriğindeki APG'nin de aralarında bulunduğu polifenolik yapılar DAD dedektörlü HPLC ile analiz edilmiştir. Analitler arasında bulunan diğer flavon luteolindir. Geliştirilen yöntem 20 farklı ticari üründe uygulanmıştır. C 18 kolon ve metanol:su karışımı mobil faz ile ters faz HPLC kullanılmıştır. Analizin tamamlanması 65 dakika sürmektedir. Kromatografiden önce numuneler heksanda çözülmüş ve metanol: su karışımına ekstre edilmiştir. Bu yöntem içinde apigenin 0,096 ng/mL düzeyinde tayin sınırına sahiptir [73].

*Matricaria recutita* L. bitkisinin kurutulmuş çiçeklerinden oluşan, piyasada satılan papatya aylarının içeriğini araştıran bir çalışmada yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) kullanılmış ve APG 7-O-glikozitlerinin miktarları belirlenmiştir. Bu miktarları ilgili çayın kalitesinin bir göstergesi olarak belirtmişlerdir. Yaprakların etanol ekstresi kullanılmıştır [25].

Wu ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir kapiler elektroforez yönteminde DAD dedektör kullanarak *Flos chrysanthemi* ve *Flos chrysanthemi indici* droglarında bulunan tıbbi etkili bazı flavonların analizleri yapılmıştır. Bitkilerin metanol ekstresi ile çalışılmıştır. Analitler arasında linarin, luteolin-7-O-glikozit, epikateşin, kateşin, diosmetin, luteolin, APG ve kamferol yer almaktadır. Tampon olarak pH 9,6 da 20 mmol/L sodyum borat-50 mmol/L sodyum fosfat kullanılmıştır. 15 kV gerilim uygulanmış ve 30 dakikada analiz gerçekleştirilmiştir. APG için 53 µg/mg düzeyinde bir hassasiyet gözlenmiştir [74].

İnsan plazmasında 5 flavonoidin (luteolin-7-glikozit, rutin, APG-7-glikozit, kersetin and baicalein) analizi için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. İnternal standart olarak kateşin kullanılmıştır. C 18 kolonda gradient elüsyonla % 0,1 asetik asit + metanol: asetonitril: asetik asit (90: 10: 1, h/h) mobil fazı ile ayırma gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. APG 7-O-glikozit için tayin sınırı 5 µg/mL dir. Numune hazırlama amacıyla plazma proteinleri çöktürme ve sıvı-sıvı ekstraksiyon beraber kullanılmıştır. Dedeksiyon 280 nm de gerçekleştirilmiştir [75].

Bazı Compositae türlerindeki linarin, luteolin, klorojenik asit ve APG flavonoidleri UV dedeksiyonlu HPLC ile analiz edilmiştir. Ayırma C 18 kolonda (2,1 mm x 250 mm, 1,9 µm) %1 lik formik asit ve asetonitril karışımından oluşan mobil fazda gradient elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 254 nm de yapılmıştır. Bu türlerin çiçek, yaprak ve kök kısımları incelenmiş ve APG'nin ortalama olarak 0,16-0,18 g/100 g düzeyinde bulunduğu saptanmıştır [76].

Şanlı ve arkadaşları kırmızı şarap numunelerinde aralarında APG'nin de yer aldığı 8 polifenolik bileşiğin kapiler elektroforezle analizini gerçekleştirmişlerdir. 15 dakikada 55 cm lik kapilerde 26 kV gerilim uygulamasıyla 40 mM pH 8,9 borat tamponu ile ayırma sağlanmıştır. Şarap numuneleri dietileterle sıvı sıvı ekstraksiyona tabii tutulduktan sonra UV dedeksiyonlu kapiler elektroforeze verilmişlerdir. APG için tayin sınırı 0,62 mM dir [77].

Cui ve arkadaşları geleneksel Çin Tıbbında yaygın kullanılan *Radix scutellariae* bitkisindeki flavonları ultraperformanslı sıvı kromatografisi (UPLC) yöntemi ile analiz etmişler. C 18 kolonu durgun faz, metanol: % 0,01 lik formik asit çözeltisi karışımını mobil faz olarak kullanmışlar ve 275 nm de aralarında APG ve APG 7-O glikozitin de bulunduğu 10 flavonoidin analizini gerçekleştirmişler [78].

Misellar elektrokinetik kromatografi (MEKC) ile çeşitli bitki ekstrelerinden APG miktar tayini için UV dedeksiyonlu yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Psödo durgun faz olarak sodyumdodesil sülfat (SDS), tampon olarak pH'sı 10,2 olan 30 mmol/L borat tamponu kullanılmıştır. Yöntemin doğrusal olduğu aralık 1-100 µmol/L dir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,48 ve 0,92 µmol/L dir [79].

Sıçanlara oral yoldan *Wikstroemia indica* ekstresinin verilmesinin ardından plazmalarında umbeliferon, APG, dafnoretin, genkvaninin birarada analizi için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Plazma numuneleri asetonitril ile protein çöktürülmesine tabii tutulmuş ve ardından etilasetatla sıvı sıvı ekstraksiyonu uygulanmıştır. Ekstreler C 18 kolon ile asetonitril formik asit karışımından oluşan mobil fazla ayrılmış ve tandem MS ile dedekte edilmiştir. APG için tayin sınırının 3 ng/mL olduğu görülmektedir [80].

Çeşitli bitki ekstrelerinden luteolin ve APG tayini için yeni bir DAD dedektörlü kapiler elektroforez yöntemi de Maher ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. pH 10, 20 mM borat tamponu kullanılmış, 23 kV gerilim uygulanmıştır. APG için gözlenebilme sınırı 0,53 g/mL dir [81].

*Matricaria recutita* L. yapraklarından demlenmiş çaylarda APG 7-O-glikozit miktarları HPTLC ile analiz edilmiştir. Silikajel 60 NH<sub>2</sub> F254S plakları ve etilasetat: formik asit: asetik asit kullanılmıştır. Bu yöntem piyasadaki çayların kalitesi için belirleyici olacağı öne sürülmektedir [82].

*Swertia mussotii* Franch. ve preparatlarında oleanolik asit, ursolik asit, kersetin ve APG'yi tayin edebilmek için bir kapiler zon elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. 15 kV gerilimle pH 9,5 borat tamponu ve UV dedeksiyon kullanılmıştır. APG için dedeksiyon limiti değeri 0,2538 µg/mL' dir [83].

6 erkek sıçana *Paulownia tomentosa* Steud. çiçeklerinin ekstresi oral yoldan verilmiş ve plazmalarında APG'nin de aralarında olduğu 6 analiti bir arada analiz etmek için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Öncesinde plazma numuneleri diklorometanla sıvı sıvı ekstraksiyona tabii tutulmuştur. Ardından ters faz kromatografiyle oldukça hassas tayin sağlanmıştır [84].

*Annona muricata* L. tropikal meyvesinde içlerinde APG'nin de yer aldığı antioksidan etkili bileşiklerin tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirilmiştir. 100 gr taze meyve numunesindedeki ortalama 0,0194 mg APG saptanmıştır [85].

Papatya ve linden çiçek ekstralarının içeriğinde APG'nin de yer aldığı 11 flavonoidin DAD dedektörlü kapiler elektroforezle 11 dakika içinde 24 kV gerilim uygulamasıyla 40 mM pH 8,9 borat tamponu kullanarak tayini gerçekleştirilmiştir [86].





### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 APG İçin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesinde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler, Preparatlar, Cihazlar ve Ekipman

##### 3.1.1 Tez çalışması süresince kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

Etanol (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya )

Metanol (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya )

Apigenin ( $\geq 95,0$  % HPLC) (Sigma, St. Louis, Missouri, ABD)

Dimetilsulfoksit (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Dimetilformamid (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Asetonitril (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ortofosforik asit (% 85, ağ.) (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Disodyumhidrojen fosfat (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Potasyumdihidrojen fosfat (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum klorür (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Potasyum klorür (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ultra saf su (HPLC saflığında)

##### 3.1.2 Çözeltiler

###### Mobil faz:

HPLC grade etanol ve su karışımı (70:30, h/h) izokratik elüsyonda kullanılmıştır.

###### Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS):

10 mM PBS; 8 g NaCl, 0,2 KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 800 mL ultrasaf suda çözüldü. 0,1 N HCl ile pH'sı 7,4'e getirildi ve su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

### APG stok çözeltisi:

APG tartılarak 200 µg/mL olacak şekilde etanolde çözündürüldü.

### APG kalite kontrol (0,2, 8 ve 20 µg/mL) ve standart çözeltileri (0,2-20 µg/mL):

APG stok çözeltisinden çeşitli seyreltmelerle hazırlanmışlardır.

### **3.1.3 Preparatlar**

Diş macunu (Splat medical herbs)

Şampuan 1 (Avon)

Şampuan 2 (John Frieda)

Yüz temizleme kremi (Kiehl's)

Sıvı el sabunu (Watsons)

El kremi 1 (Cire Aseptine)

El kremi 2 (Fraternikus)

Bebek vücut yağı (Watsons)

Saç rengi açıcı sprey (Fengo)

Saç boyası koruyucu kremi (Wella)

Saç bakım serumu (Milkshake)

Göz makyaj temizleyici (The Body Shop)

Göz ve dudak makyaj temizleyici (The Body Shop)

Saç bakım maskesi (Avon)

Duş jeli (Milkshake)

### **3.1.4 Aletler ve diğer gereçler**

- 1- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazı (Shimadzu Corporations- Japonya)
- 2- C 18 kolon (150 mm x 4,6 mm x 5µm) (Shim-Pack, Shimadzu Corporations- Japonya)
- 3- UV-vizibl spektrofotometre (Hitachi- Japonya)
- 4- Teraziler (Shimadzu Corporations- Japonya)

- 5- Vorteks Mikser (Velp Scientifica- İtalya)
- 6- Ultrasonik banyo (VBR- Kanada)
- 7- Otomatik pipetler (Eppendorf 100 µL-1000 µL ve 10 µL-100 µL'lik)
- 8- Mobil Faz Süzme Ünitesi (Milipor, 5 µm)
- 9- pH metre (Hanna Instruments- İtalya)
- 10- Enjektör (2 mL)
- 11- HPLC enjeksiyon öncesi filtreleri (0,44 µm)
- 12- Balon jojeler (5 mL, 10 mL, 100 mL, 500 mL)
- 13- Beher (50 mL)
- 14- C 18 SPE kartuşları (Resprep 6 mL 1000 mg, Amerika Birleşik Devletleri)
- 15- Vakum pompası (Teknopomp, Türkiye)

### **3.2 APG'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi**

APG'nin HPLC ile analizi için gerekli olan kolon çeşidi, kolon boyu, kolon iç çapı, kolon partikül boyutu, mobil faz, akış tipi ve hızı, kolon fırını sıcaklığı gibi kromatografik koşullar belirlenerek geliştirilen yöntem valide edildikten sonra calendula ekstresi ve çeşitli papatya türlerinin ekstrelerini içeren 13 farklı tip, toplamda 15 adet kozmetik üründe APG analizi için uygulanmıştır.

#### Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Öncelikle APG'nin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu spektrofotometrede belirlendi. Bu dalga boyunda HPLC cihazında değişik tipte kolonlarda (Silikajel üzerine -CN, -NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -C18, oktil veya fenil grupları bağlanmış çeşitli boy (10-30 cm) ve partikül boyutuna (1-5 µm) sahip kolonlar) ve çeşitli mobil fazlarla (metanol-su, etanol-su, metanol-fosfat tampon, asetonitril - 10 mM o-fosforik asit çözeltisi karışımları) denemeler yapıldı. Ardından değişik akış hızları ve kolon sıcaklıkları ve enjeksiyon hacimleri denendi. Uygun kromatografi koşulları belirlendikten sonra kalibrasyon ve validasyon işlemleri yapıldı ve geliştirilmiş bu yöntem 13 farklı çeşit 15 adet kozmetik ürünün analizine uygulandı ve bu preparatlardaki APG varlığı ve miktarı belirlendi.

### 3.3 Validasyon

Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik yöntem validasyonu ICH kılavuzu Q2 ye göre yapıldı [87].

#### 3.3.1 Yöntemin seçiciliği

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla çözücünden herhangi bir girişimin olup olmadığı incelendi. Buna ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1’de verilmiştir.

#### 3.3.2 Tayin ve gözlenebilme sınırı

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini saptamak için gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.2’ de verildi.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

#### 3.3.3 Doğrusallık

Doğrusallık aralığı, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık ve tekrarlanabilirlikte sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır.

Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için APG’in 8 farklı konsantrasyonunu içeren karışımlar hazırlanarak analizleri yapıldı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanlarına karşı konsantrasyonların doğrusallık grafikleri çizildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.3’ de bildirildi.

#### 3.3.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

APG stok çözeltisinden uygun etanol hacmiyle hazırlanan kalite kontrol çözeltileri olarak nitelediğimiz üç farklı konsantrasyonda APG (0,2, 8 ve 20 µg/mL) içeren çözeltiler ile çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 3 farklı günde (günler arası) yapılmıştır. Her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.4’de bildirildi.

### 3.3.5 Çözelti stabilitesi

Çözelti stabilitesinin saptanması için standart çözeltiler, oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve + 4°C de 1 ay bekletildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5’de verilmiştir.

### 3.3.6 Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için 8 µg/mL konsantrasyonlardaki APG çözeltilerine kalite kontrol çözeltilerinin herbirinden 1’er mL ilave edildi. Elde edilen alan oranı değerleri daha önce hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar bulundu. Geri kazanım değerleri aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = [(C_t - C_u)/C_a] \times 100 \quad \text{Formül 1}$$

C<sub>t</sub>: bulunan toplam analit konsantrasyonu

C<sub>u</sub>: numunede standart katmadan önce bulunan analit konsantrasyonu

C<sub>a</sub>: ilave edilen analit konsantrasyonu

Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6’da verilmiştir.

### 3.3.7 Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını belirlemek için temel analiz koşullarında mobil faz oranları, akış hızı ve kolon sıcaklığı değiştirilerek kalite kontrol çözeltileriyle her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.7’de bildirildi. Yöntemin küçük modifikasyonlardan ne derece etkilendiği ortaya konmuş oldu.

## 3.4 Papatya Türlerine Ait Ekstreler İçeren Kozmetik Ürünlerde APG Analizi

Yöntemin geliştirilip valide edilmesinin ardından piyasada bulunan *calendula* ve *papatya türlerinin* ekstrelerini içeren çeşitli markalardan, çeşitli ürün tiplerinde APG’yi analiz edebilmek için önce laboratuvar numunesi hazırlama çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla sıvı-sıvı ekstraksiyon (her bir formülasyondan APG’yi en yüksek verimde ekstre edebilmek için çeşitli tipte çözücüler ve çözücü hacimleri denenmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu için hegzan, kloroform, diklorometan, kloroform-isopropanol karışımı, dietileter ile denemeler yapılmıştır. Bu çözücülerden

2-5 mL arası kullanarak ekstraksiyonlar yapılmış, ürün çözeltileri denenen ekstraksiyon çözücüleri ilave edildikten sonra, 5 dakika boyunca vorteks karıştırıcıda karıştırılmış, akabinde organik faz alınmış ve azot akımında uçurulmuştur. Katı faz ekstraksiyonu denemelerinde ise farklı partikül boyutu, yüzey alanı, gözenek boyutu ve hacim kapasitesi olan silis, diol, CN, alümina, C 8 ve C 18 kartuşlar denenmiştir. Elüsyonu sağlamak için ise APG'yi iyi çözüp, diğer bileşenleri mümkün olduğunca çözmeyecek şekilde, dimetilsülfoksit (DMSO), dimetilformamid (DMF), etanol, PBS çözücüleri ve bunların çeşitli karışımları denenmiştir. Her bir kozmetik formülasyon için belirlenen en iyi numune hazırlama yöntemi Bölüm 4.3'de verilmiştir.

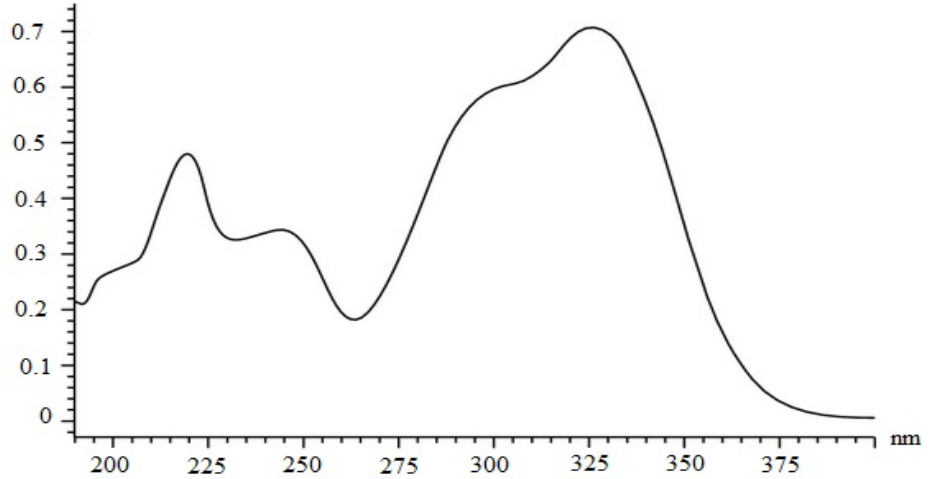


## 4. BULGULAR

### 4.1 APG'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analiz Sonuçları

#### 4.1.1 Dedeksiyonun belirlenmesi

Kromatografik ayırma çalışmalarına geçmeden önce spektrofotometre de apigeninin etanolde maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları (225 nm ve 325 nm) belirlenmiştir. 225 nm de yapılan ölçümlerle daha yüksek seçicilik elde edildiği için iki maksimum noktadan 225 nm ile çalışılması daha uygun bulunmuştur. APG'nin spektrumu Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 : APG spektrumu.

#### 4.1.2 Kromatografik koşulların belirlenmesi

Yapılan denemelerde en yüksek ayırma gücü gösteren ve en verimli ayırmayı sağlayan koşulların aşağıdaki gibi olduğu belirlenmiştir.

##### HPLC sistem parametreleri

- Durgun faz (Kolon): C 18 (250 mm x 4,5 mm x 5,6 µm)
- Mobil faz: Etanol: su (70:30, h/h)
- Akış hızı: 1 mL/dk

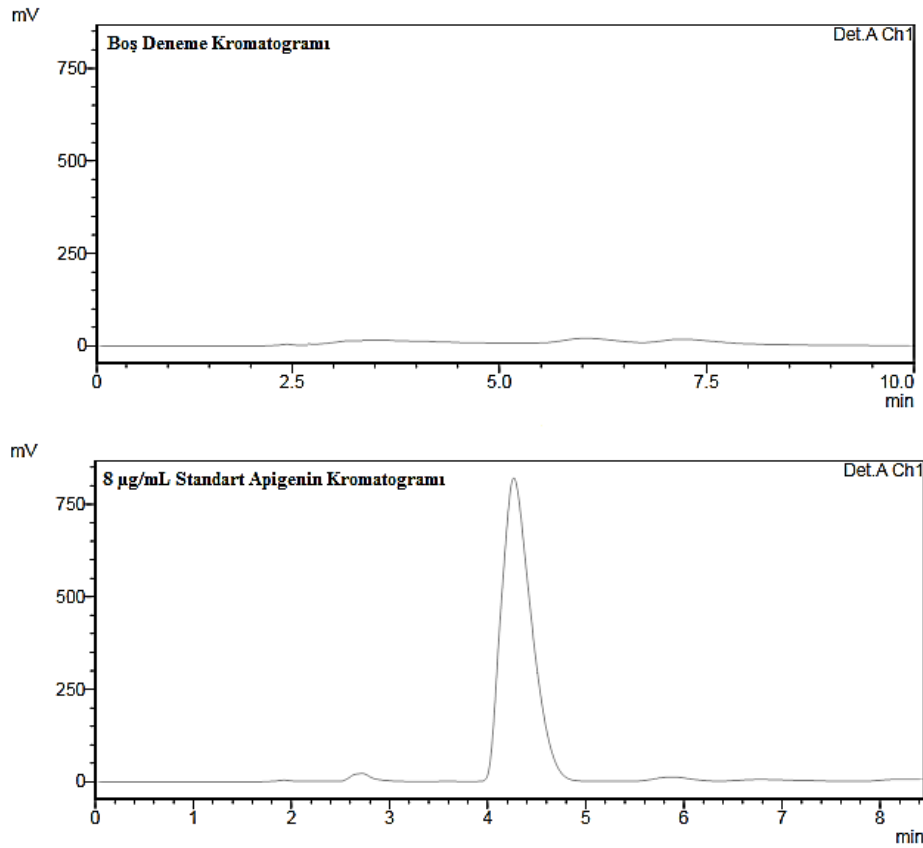
- Enjeksiyon hacmi: 50  $\mu$ L
- Fırın sıcaklığı: 25  $^{\circ}$ C
- Akış profili: izokratik

8  $\mu$ g/mL standart APG çözeltisine ait kromatogram Şekil 4.2’de belirtilmiştir. Alıkonma (Retansiyon) zamanı  $4.15 \pm 0.4$  dakikadır.

## 4.2 Yöntem Validasyonu

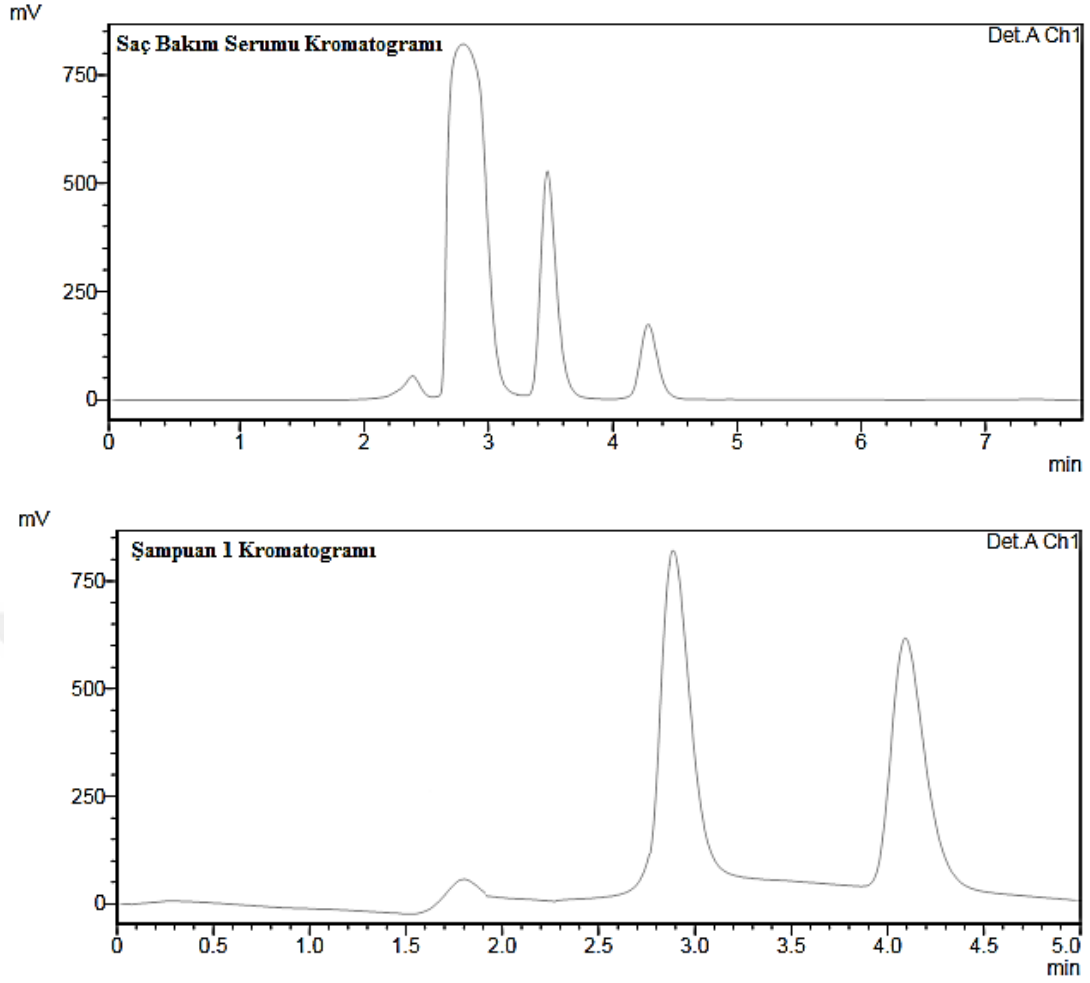
### 4.2.1 Seçicilik

8  $\mu$ g/mL standart apigenin çözeltisine, boş denemeye ve şampuan 1 ve saç serumu numunelerine ait kromatogramlar Şekil 4.2’de belirtilmiştir. Alıkonma zamanı  $4,15 \pm 0,4$  dakikadır.



**Şekil 4.2 :** Boş deneme, 8  $\mu$ g/mL standart APG çözeltisi, saç bakım serumu ve şampuan 1’e ait kromatogramlar.





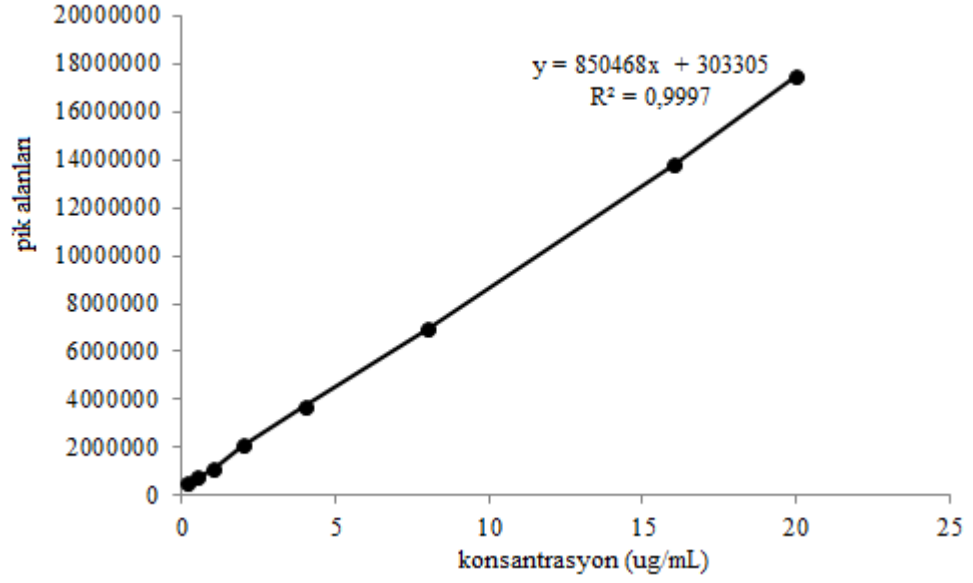
**Şekil 4.2 (devam)** : Boş deneme, 8 µg/mL standart APG çözeltisi, saç bakım serumu ve şampuan 1'e ait kromatogramlar.

#### 4.2.2 Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)

Bölüm 3.3.2'de verilen denklemlere göre apigenin için hesaplanan LOD değeri 0,060 µg/mL ve LOQ değeri ise 0,2 µg/mL olarak bulunmuştur.

#### 4.2.3 Doğrusallık

APG için 0,2-20 µg/mL konsantrasyon aralığında 8 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler ile APG stok çözeltisinden uygun etanol miktarıyla seyreltilere çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3 : APG'nin 0,2–20 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.

Tablo 4.1'de pik alanları (A), SD ve RSD değerleri, en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denklemi ( $A = mC + b$  [ $m =$  eğim,  $b =$  kesim noktası,  $C =$  konsantrasyon]) ve korelasyon katsayısı ( $r$ ) verilmiştir.

**Tablo 4.1 :** APG'nin 0,2–20 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.

A \ C	0,2	0,5	1	2	4	8	16	20
1	506845,8	754698,5	1108065	2108254	3725698	6905412	13545685	18134158
2	506489,4	751235,6	1152410	2107236	3723547	6984256	13221456	17455698
3	514589,5	757321,6	1136540	2108123	3654896	6992547	13684745	17245698
4	511236,7	755124,8	1005841	2085412	3654123	7032145	13687410	17125468
5	513684,1	751125,2	1085463	2104571	3745621	6854120	13845123	17502145
6	528142,7	754305,3	1154383	2139414	3851881	6837446	13961507	17402547
Ortalama	513498	754698,5	1107117	2108835	3725961,2	6934321	13774321	17477619,17
SD	7926,9	2399,16	56352,22	17351,05	72745,02	80132,39	257641,8	17351,05
% RSD	1,54	0,32	5,10	0,82	1,95	1,55	1,90	0,10
Ortalama alan (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: A= 850468C+303305 (r= 0,9997)								

#### 4.2.4 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Her bir kalite kontrol çözeltisinde 0,2, 8 ve 20 µg/mL apigenin miktarı Bölüm 3.3.4’de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri % 0,67 - 1,23 arasında hesaplandı (Tablo 4.2).

Farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise % 1,23 - 1,64 arasında bulundu (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2 :** Aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.

Gün içi (n=3)			Günler arası* (n=3)		
Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%)	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%)
0,2	0,19	0,67	0,2	0,18	1,23
8	8,24	0,90	8	7,8	1,45
20	19,96	1,23	20	19,84	1,64

\*Üç farklı günde elde edilen sonuçlar

#### 4.2.5 Çözelti stabilitesi

APG’nin laboratuvar numunesi olarak etanoldeki kalite kontrol çözeltilerinin, oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve +4°C de 1 ay stabil kaldığı saptanmıştır.

**Tablo 4.3 :** Oda sıcaklığında, otomatik numune örnekleyicisi ve buzdolabında bekletilen apigenin standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.

Uygulama	Geri kazanım (ortalama±SD) (%)	RSD (%)
Oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletme	% 89	3,23
Buzdolabında +4°C de 1 ay bekletme	% 95	2,45
Otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekletme	% 92	4,16

#### 4.2.6 Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için Bölüm 3.3.6’da anlatıldığı gibi çalışıldı.

Daha sonra geri kazanım yüzdeleri  $(C_t - C_u) \times 100 / C_a$  formülünden hesaplandı.

Burada;

$C_t$  : Bulunan toplam APG konsantrasyonu,

$C_u$  : Kozmetik üründen alınan analit konsantrasyonu,

$C_a$  : İlave edilen standart çözeltilisinin konsantrasyonudur.

Geri kazanım değerleri % aralığında bulundu (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4** Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları.

Alınan Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	İlave edilen Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Bulunan Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) (Ortalama $\pm$ SD)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
4	0,20	4,284 $\pm$ 0,082	102	2,65
	8	11,68 $\pm$ 0,096	97,4	2,34
	20	24,3 $\pm$ 0,13	101.2	1,86

$n=3$

#### 4.2.7 Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını belirlemek için etanol:su (70:30, h/h) olan mobil faz oranı 65:35 ve 75:25 olarak 1 olan akış hızı 0,8 ve 1,2 olarak ve 25°C olan kolon sıcaklığı 20°C ve 30°C olarak değiştirilerek kalite kontrol çözeltileriyle her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlandı. Pik alanlarında ve APG piklerinin resolüsyon değerlerinde anlamlı bir fark görülmedi. Standart koşullarda retansiyon zamanı  $4,15 \pm 0,4$  iken, sağlamlık denemelerinde  $4,3 \pm 0,8$  resolüsyon değeri  $3,78 \pm 0,7$  iken, sağlamlık denemelerinde  $3,66 \pm 0,5$  bulunmuştur.

#### 4.3 Kozmetik Ürünlerden APG Analizi Öncesi Numune Hazırlama

Bölüm 3.4'de belirtilen denemelerden sonra hangi ürün için hangi numune hazırlama yönteminin en yüksek geri kazanım sağladığı belirlenmiştir. Bu belirlenen yöntemler kullanılarak her ürünün içerdiği APG miktarı bulunmuştur.

Yöntemlerin geri kazanımının belirlenmesi amacıyla her bir numuneden alınan 0,5 mL'lik hacimlerdeki APG miktarı Bölüm 4.2.3'de belirtilen ölçü eğrisi denkleminde hesaplanmış ve 1'er mL'deki miktar bulunmuştur. Daha sonra aynı hacimdeki numunelere standart katma yöntemi uygulanarak 0,2, 8 ve 20 µg/mL'lik hacimlerdeki kalite kontrol çözeltilerinden 1'er mL ilave yapılmıştır. Her bir deneme 3'er kez tekrarlanmış ve her bir kalite kontrol çözeltisi ilavesi için ilgili değerlerin ortalaması alınmıştır. Bölüm 3.3.6'da belirtilen Formül 1'den her bir formülasyon için geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.5'de her bir formülasyon için belirlenen en uygun (en fazla geri kazanım gösteren) numune hazırlama yöntemi özetlenmiş, içerdiği APG miktarı ve geri kazanım değerleri ile bunlara ait bağlı standart sapma değerleri listelenmiştir.

Diş Macunu: 0,5 mL numuneye 2 mL asetonyril ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden asetonyril ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Asetonyrilli çözelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMSO ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMSO ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Şampuan 1: İki farklı şampuan numunesinden 1 ile numaralandırdığımız numunenin 0,5 mL'sine 2 mL metanol:su (1:1, h/h) karışımı ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden metanol ile şartlandırılmış C 18

kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Metanol:su (1:1, h/h) özelti atılmış, ardından kartuşa 5 mL DMF:PBS (1:4, h/h) ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF:PBS ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

şampuan 2: İki farklı şampuan numunesinden 2 ile numaralandırdığımız numunenin 0,5 mL'sine 2 mL metanol ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan özelti önceden metanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Metanollü özelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMSO ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMSO ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Yüz temizleme kremi: 0,5 mL numuneye 2 mL DMSO ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmış ve ardından karışım süzölmüştür. Süzöntü önceden metanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. DMSO'lu süzöntü atılmış, ardından kartuşa 5 mL DMF:PBS (1:2, h/h) ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF:PBS ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Sıvı el sabunu: 0,5 mL numuneye 2 mL metanol:su (1:1, h/h) karışımı ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan özelti önceden metanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Metanol:su (1:1, h/h) özelti atılmış, ardından kartuşa 5 mL DMF:PBS (1:4, h/h) ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF:PBS ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

El kremi 1: İki farklı el kremi numunesinden 1 ile numaralandırdığımız numunenin 0,5 mL'sine 2 mL asetonitril ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan özelti önceden asetonitril ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Asetonitrilli özelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMSO ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMSO ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

El kremi 2: İki farklı el kremi numunesinden 2 ile numaralandırdığımız numunenin 0,5 mL'sine 2 mL metanol:su (1:1, h/h) karışımı ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan özelti önceden metanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Metanol:su (1:1, h/h) özelti atılmış, ardından kartuşa 5 mL DMF:PBS (1:8, h/h) ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan

APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF:PBS ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Bebek vücut yağı: 0,5 mL numuneye 2 mL kloroform ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden kloroform ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Kloroformlu çözelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMF ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Saç rengi açıcı sprey: 0,5 mL numune etanolle seyreltildi (1:1, h/h), çözeltinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Saç boyası koruyucu kremi: 0,5 mL numuneye 1 mL etanol ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden etanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Etanollü çözelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMF ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Göz makyaj temizleyici: 0,5 mL numuneye 1 mL etanol ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden etanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Etanollü çözelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMF ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Göz ve dudak makyaj temizleyici: 0,5 mL numuneye 1 mL kloroform ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden kloroform ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Kloroformlu çözelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMSO ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMSO ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Saç bakım maskesi: 0,5 mL numuneye 2 mL asetonitril ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden asetonitril ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Asetonitrilli çözelti atılmış, ardından kartuşa 5 mL DMF:PBS (1:8, h/h) ilave edilerek kartuşta alıkonmuş



olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF:PBS ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Duş jeli: 0,5 mL numuneye 1 mL metanol ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti önceden metanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Metanollü çözelti atılmış, ardından kartuşa 1 mL DMF ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Saç serumu: 0,5 mL numuneye 1 mL etanol ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Oluşan çözelti etanol ile şartlandırılmış C 18 kartuştan vakum yardımıyla geçirilmiştir. Etanollü çözelti atılmış, ardından kartuşa 2 mL DMF ilave edilerek kartuşta alıkonmuş olan APG'nin çözeltisi elüe edilmiştir. DMF ekstresinin 50 µL'si direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

**Tablo 4.5 : Numune hazırlama yöntemleri**

<b>Kozmetik preparat</b>	<b>Numune Hazırlama Yöntemi</b>	<b>Geri kazanım</b>	<b>%RSD</b>	<b>Apigenin miktarı (µg/mL)</b>
Diş macunu	0,5 mL numune + 2 mL asetonitril $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMSO ile ekstraksiyon	% 89,3	2,34	5,78
Şampuan 1	0,5 mL numune + 2 mL metanol:su (1:1) $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 5 mL DMF:PBS (1:4) ekstraksiyon	% 87,6	4,23	6,43
Şampuan 2	0,5 mL numune + 2 mL metanol $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMSO ile ekstraksiyon	% 90,2	3,45	9,35
Yüz temizleme kremi	0,5 mL numune + 2 mL DMSO karıştırıp süzüldü, $\xrightarrow{\text{SPE}}$ süzüntü $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 5 mL DMF:PBS (1:2) ekstraksiyon	% 93,4	3,67	13,02

**Tablo 4.5 :** Numune hazırlama yöntemleri (devam).

Sıvı el sabunu	0,5 mL numune + 2 mL metanol:su (1:1) $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 5 mL DMF:PBS (1:4) ekstraksiyon	% 94,5	5,25	0,33
El kremi 1	0,5 mL numune + 2 mL asetonitril $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMSO ile ekstraksiyon	% 85,6	2,64	7,88
El kremi 2	0,5 mL numune + 2 mL metanol:su (1:1) $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 5 mL DMF:PBS (1:8) ekstraksiyon	% 83,7	3,37	1,58
Bebek vücut yağı	0,5 mL numune + 2 mL kloroform $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMF ile ekstraksiyon	% 91,5	4,67	0,43
Saç rengi açıcı sprej	Etanolle seyreltildi (1:1) direkt enjekte edildi.	% 92,3	3,23	< LOQ

**Tablo 4.5 :** Numune hazırlama yöntemleri (devam).

Saç boyası koruyucu kremi	0,5 mL numune + 2 mL etanol: asetonitril (1:1) $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMF ile ekstraksiyon	% 88,4	2,73	4,34
Saç serumu	0,5 mL numune + 1 mL etanol $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMF ile ekstraksiyon	% 81,6	4,84	2,36
Göz makyaj temizleyici	0,5 mL numune + 1 mL etanol $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMF ile ekstraksiyon	% 84,7	5,26	1,78
Göz ve dudak makyaj temizleyici	0,5 mL numune + 1 mL kloroform $\xrightarrow{\text{SPE}}$ 2 mL DMSO ile ekstraksiyon	% 86,8	2,91	1,25

**Tablo 4.5 :** Numune hazırlama yöntemleri (devam).

Saç bakım maskesi	0,5 mL numune + 2 mL asetonitril (1:8) ile ekstraksiyon	SPE → 2 mL DMF:PBS	% 92,5	3,52	3,45
Duş jeli	0,5 mL numune + 1 mL metanol ekstraksiyon	SPE → 1 mL DMF ile	% 89,4	4,62	8,43

**Tablo 4.6 :** Geliştirilen yönteme ait kromatografik parametreler.

<b>Kozmetik Preparat</b>	<b>Kapasite Faktörü*</b>	<b>Ayırma Gücü*</b>	<b>HETP*</b>	<b>Asimetri Faktörü*</b>
Diş Macunu	7,26	3,4	0,09	1,2
Şampuan 1	8,12	4,2	0,06	1,4
Şampuan 2	6,69	3,4	0,06	1,6
Yüz Temizleme Kremi	8,34	2,21	0,07	1,5
Sıvı El Sabunu	5,52	3,45	0,05	1,3
El Kremi 1	6,56	2,65	0,04	1,7
El Kremi 2	5,23	2,13	0,08	1,5
Bebek Vücut Yağı	5,76	3,42	0,06	1,4
Saç Rengi Açıcı Sprey	8,78	3,13	0,07	1,6
Saç Boyası Koruyucu Kremi	7,45	2,45	0,1	1,5
Saç Bakım Serumumu	6,87	2,66	0,09	1,5
Göz Makyaj Temizleyicisi (Waterproof)	5,26	2,76	0,08	1,6
Göz ve Dudak Makyaj Temizleyicisi	5,78	4,34	0,08	2
Saç Bakım Maskesi	5,93	3,67	0,07	1,2
Duş Jeli	5,67	4,34	1	1,6

\*ortalama değerler verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bitkilerin büyümesi, gelişmesi ve üremesi gibi temel yaşamsal faaliyetlerinde bir etkisi olmayan ancak bitkinin kendini savunması ve sağlıklı olma halini koruması fonksiyonlarında önemi büyük olan sekonder metabolitlerin insanlar üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardır bilim dünyasının ilgisini çekmektedir. Özellikle sekonder metabolitlerin antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, sitotoksik, sedatif, antidepresan, antiAlzheimer gibi daha birçok etkileri araştırılmaktadır. Bazı ilaçların, gıda takviyelerinin, OTC ürünlerinin ve kozmetiklerin içeriğinde de sekonder metabolitler ve türevlerinin bulunduğunu görmekteyiz.

Bu tez çalışmasında sekonder metabolitlerin ana sınıflarından fenolik bileşikler grubundan flavonoidler alt sınıfından bir flavon olan APG'nin kozmetik amaçlı yaygın kullanılmasından yola çıkılarak, çeşitli kozmetik formülasyonlarda bulunan APG miktarını tayin edebilen yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

Literatürde APG'yi analiz edebilmek için geliştirilmiş çok çeşitli (HPLC, UHPLC/MS-MS, kapiler elektroforez ve MEKC) yöntemler mevcuttur ve Bölüm 2.3.6'da birçoğu özetlenmiştir. Ancak bu yöntemler fare plazması, bitkilerin çeşitli kısımları, çeşitli droglar ve insan biyolojik sıvılarında geliştirilmiştir. Literatürde kozmetik ürünlerin içerdiği APG miktarını tayin eden bir yöntemle rastlanmamıştır.

Varolan UHPLC/MS-MS yöntemlerinde oldukça hassas analizlere rastlanmaktayken, kapiler elektroforez, MEKC ve çoğu HPLC yöntemi geliştirilen bu tez çalışmasına ait HPLC yönteminden hassas değildir. Ayrıca literatürde bulunan yöntemler kozmetik preparatlarda analiz imkanı sağlamamakta farklı amaçlara imkan tanımaktadır.

Geliştirilen yöntem MS-MS gibi pahalı, sofistike operatör gerektiren, her laboratuvarında ekipmanı bulunamayan bir analiz yöntemi olmayıp, bulunabilecek en basit ve ekonomik dedeksiyon sistemi olan UV-görünür bölge absorpsiyon spektrometrik dedektörle çalışmaktadır. Kozmetik ürünler gibi komplike numune ortamlarında bu dedeksiyonla ve yine yaygın kullanılan C18 kolonla ve yine oldukça

kolay hazırlanan etanol su karışımı mobil fazla analize imkan tanıyor olması, yöntemin önemli üstünlükleridir. APG'nin alıkonma zamanı  $4.15 \pm 0.4$  dakika gibi kısa bir süredir. Bu kadar kısa sürede ve gradient elüsyon uygulamadan analiz yapılabilmesi yine literatürde nadiren karşılaşılan bir durumdur. Yöntemin resolüsyonu ve diğer kromatografik ayırma kalitesini gösteren tüm parametreleri referans aralıklarına uygundur.

Kozmetik ürünlerden laboratuvar numunesi hazırlama işlemi olarak SPE kullanılması da yöntemin bir diğer önemli avantajıdır. Sıvı sıvı ekstraksiyonu gibi teknikler daha uzun zaman ve emek gerektiren, daha çok çözücü harcanmasına neden olan ve karıştırma, organik fazı çekme, uçurma, kalan bileşiği çözme gibi ilave işlemler gerektirmektedir. Oysa, geliştirilen yöntemde ait numune hazırlama basamaklarında SPE kartuşlara aktarılan numune çözeltileri uygun çözücülerle kısa sürede kartuştan elüe edilmiştir.

Yöntemin geliştirilmesi ve ICH kriterlerine göre valide edilmesinin ardından 13 farklı tip, toplamda 15 adet numunede APG analiz edilmiştir.

Kozmetik ürünler açısından piyasada çok değişik markalara ait çok çeşitli ürünler yer almaktadır. Bunların birçoğunun çeşitli bitki ekstraktları içerdiğini görüyoruz. APG'nin en yaygın olduğu papatya türlerindeki APG miktarını analiz etmek bu ürünlerden beklenen etkileri izlemek, bilinçli tüketmek ve ürünlerin kalite kontrolü açısından önemlidir. Bu yeni geliştirilen analiz yöntemi  $0,2 \mu\text{g/mL}$  ye kadar ürünlerdeki APG miktarını analiz edebilmekte ve  $0,060 \mu\text{g/mL}$  a kadar ise dedekte edebilmektedir. Yöntemin APG içermeye potansiyeli olan kozmetiklerdeki analizlerde rutin olarak kullanılacağı, kalite kontrol ve standardizasyon sağlayacağı ve benzer analitik yöntemleri geliştirme açısından da ışık tutacağı öngörülmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] **Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S.** (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Önemi. *Kastamonu Üni.-Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1), 52-67.
- [2] **Kaya, A.** (2010). Tıbbi Bitkiler ve Etnobotanik Çalışmalar. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, 11-19.
- [3] **Alpınar, K.** (2010). Halk Arasında Kullanılan Bitkilerin Derlenmesi. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, 19-28.
- [4] **Baumann, L.S.** (2007). Less-known botanical cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy*, 20 (5), 330-42.
- [5] **Srivastava, J., Shankar, E., Gupta, S.** (2010). Chamomile: A Herbal Medicine of The Past With Bright Future. *Molecular Medicine Reports*, 3 (6), 895-901.
- [6] **Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava, M.** (2011). Chamomile (M. chamomilla L.): An Overview. *Pharmacognosi Review*, 5 (9), 82-95.
- [7] **Aburjai, T., Natsheh, F.M.** (2003). Plants Used in Cosmetics. *Phytotherapy Reserach: PTR*, 17 (9), 987-1000.
- [8] **Mindell, E.** (2003). Earl Mindell's Herb Bible. 62-63.
- [9] **Venigalla, M., Gyengesi, E., Münch, G.** (2015). Curcumin and Apigenin-Novel and Promising Therapeutics Against Chronic Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Neural Regeneration Researchs*, 10 (8), 1181-85.
- [10] **Miean, K.H., Mohamed, S.** (2001). Flavonoid Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6), 3106-12.
- [11] **Candwell, E.** (2013). The Compound in The Mediterranean Diet That Makes Cancer Cell Mortal. *Medical Express*.
- [12] **Elmore, E., Siddique, S., Navidi, M. et al.** (2005). Correlation of invitro Chemopreventive Efficacy Data From The Human Epidermal Cell Assay with Animal Efficacy and Clinical Trial Plasma Levels. *Journal of Cellular Biochemistry*, 95 (3), 571-88.
- [13] **Raskovic, A., Gigov, S., Capo, I. et al.** (2017). Antioxidative and Protective Actions of Apigenin in a Paracetamol-Induced Hepatotoxicity Rat Model. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1-8.
- [14] **Singh, G., Kumar, P., Joshi, S.C.** (2014). Treatment of Dermatophytosis by A New Antifungal Agent Apigenin. *Mycoses*, 57 (8), 497-506.

- [15] Song, M., Li, L., Li, M. et al. (2016). Apigenin Protects Mice From Pneumococcal Pneumonia By Inhibiting The Cytolytic Activity Of Pneumolysin. *Fitoterapia*, 115, 31-36.
- [16] Wang W., Lin P., Ma L., et al. (2016). Separation And Determination Of Flavonoids in Three Traditional Chinese Medicines By Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection. *Journal of Separation Science*, 39 (7), 1357-1362.
- [17] Gül, G. (1995). *Matricaria chamomilla* L. Recutita Grierson Üzerinde Farmakogenetik Araştırmalar. *Yüksek Lisans Tezi G.Ü. Ecz.Fak. Farmakognozi A.B.D.*
- [18] Baghalian, K., Haghiry, A., Naghavi, M.R., Mohammadi, A. (2008) Effect of saline irrigation water on agronomical and phytochemical characters of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Scientia Horticulturae*, 116 (4), 437-441.
- [19] Ebadi, M. (2002) Pharmacodynamic Basis Of Herbal Medicine.
- [20] Povh, N.P., Marques Marcia, O.M., Angela, M., Meireles, A. (2001) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert ). *Journal of Supercritical Fluids*, 21, 245-256.
- [21] Mulinacci, N.; Romani, A.; Pinelli, P.; Vincieri, F.F.; Prucher, D. (2000) Characterization of *Chamomilla recutita*(L.) flower extracts by HPLC-DAD analysis. *Chromatographia*, 51, 301-307.
- [22] Owlia, P.; Rasooli, I.; Sadari, H. (2007). Antistreptococcal and Antioxidant Activity of essential oil from *Matricaria chamomilla* L. *Research Journal of Biological Sciences*, 2 (2), 155-160.
- [23] Saraçoğlu, İ.A. (2014) Bitkisel Sağlık Rehberi. 97-100.
- [24] Gardiner, P. (2007) Complementary, Holistic and Integrative Medicine: Chamomile. *Pediatrics in Review*, 28 (4), 16-8.
- [25] Guzelmeric, E., Yesilada, E., Vovk, I. et. al. (2017) Quality assessment of marketed chamomile tea products by a validated HPTLC method combined with multivariate analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 132, 35-45.
- [26] Harborne, J.B. (1999). Recent Advances in Chemical Ecology. *Natural Product Reports*, 16, 509-523.
- [27] Roy, J.E., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., Neutelings G. (2016) Glycosylation is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 735.
- [28] Nandave, M., Ojha, S.K., Arya, D.S. (2005) Protective role of flavonoids in cardiovascular diseases. *Natural Product Radiance*, 4 (3), 166-76.
- [29] Hamdoon, M. (2009) Natural and Synthetic Flavonoid Derivatives with Potential Antioxidant and Anticancer Activities. 16-22.

- [30] Orhan, D., Özçelik, B., Özgen, S., Ergun, F. (2010) Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activities of Some Flavonoids. *Microbiological Research*, 165 (6), 496-504.
- [31] Seleem, D., Pardi, V., Murata, R.M. (2016) Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity in vitro. *Archives of Oral Biology*, 76, 76-83.
- [32] Cushnie, T., Lamb A.J. (2005) Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- [33] Pan, M.H., Lai, C.S., Ho, C.T. (2010) Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Function*, 1 (1), 15-31.
- [34] Sandher, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P. (2011) A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 25-41.
- [35] George, V.C., Dellaire, G., Rupasinghe, H.P.V. (2017) Plant Flavonoids in Cancer Chemoprevention: Role in Genome Stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45, 1-14.
- [36] Murakami, A., Ashida, H., Terao, J. (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*, 269, 315–325.
- [37] Williams, R. J., Spencer, J., Rice-Evans, C. (2004) Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 838 – 849.
- [38] Chen, Y.T., Zheng R.L., Ju, Y. (1990) Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology Medicine*, 9 (1), 19-21.
- [39] Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., Pelzer L.E. (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids: Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*, 56 (9), 683–687.
- [40] Tranchimand, S., Brouant, P., Iacazio, G. (2010) The rutin catabolic pathway with special emphasis on quercetinase. *Biodegradation*, 21 (6), 833–859.
- [41] Pietta, G. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7), 1035-1042.
- [42] Zaveri, N. (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*, 78, 2073–2080.
- [43] Han, R.M., Tian, Y.X., Liu, Y. et al. (2009) Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57 (9), 3780–3785.
- [44] He, Y.H., Xiao, C., Wang, Y.S. et al. (2005) Antioxidant and anti-inflammatory effects of cyanidin from cherries on rat adjuvant-induced arthritis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 30, 1602-1605.

- [45] Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T. (1998) Quantitative Analysis of Flavonols, Flavones and Flavanones in Fruits, Vegetables and Beverages by HPLC with Photo-Diode Array and Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110.
- [46] Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H. (2001) Selective Growth-Inhibitory, Cell-Cycle Deregulatory and Apoptotic Response of Apigenin in Normal Versus Human Prostate Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287 (4), 914-920.
- [47] Piantelli, M., Rossi, C., Lezzi, M., La Sorda, R., Lacobelli, S., Alberti, S., Natali, P.G. (2006) Flavonoids Inhibit Melanoma Lung Metastasis by Impairing Tumor Cells Endothelium Interactions. *Journal of Cellular Physiology*, 207, 23-29.
- [48] Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A. et al. (2000) Flavonoids Apigenin and Quercetin Inhibit Melanoma Growth and Metastatic Potential. *International Journal of Cancer*, 87 (4), 595-600.
- [49] Siddique, Y.H., Ara, G., Beg, T., Afzal, M. (2010) Anticlastogenic Effect of Apigenin in Human Lymphocytes Treated with Ethinylestradiol. *Fitoterapia*, 81, 590-94.
- [50] Siddique, Y.H., Beg, T., Afzal, M. (2005) Genotoxic Potential of Ethinylestradiol in Cultured Mammalian Cells. *Chemico-Biological Interactions*, 151, 133-141.
- [51] Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., Birt, D.F. (1990) Inhibitory Effect of Apigenin A Plant Flavonoid, on Epidermal Ornithine Decarboxylase and Skin Tumor Promotion in Mice. *Cancer Research*, 50, 499-502.
- [52] Tong, X., Dross, R.T.V., Abu-Yousif, A. et al. (2007) Apigenin Prevents UVB-Induced Cyclooxygenase 2 Expression: Coupled mRNA Stabilization and Translational Inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 283-296.
- [53] Hong, X., Dross, R.T.V., Essengue, S. et al. (2007) Modulation of UVB-Induced and Basal Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression by Apigenin in Mouse Keratinocytes: Role of USF Transcription Factors. *Molecular Carcinogenesis*, 46, 303-314.
- [54] Kiraly, A.J., Soliman, E., Jenkins, A., Dross, R.T.V. (2016) Apigenin inhibits COX-2, PGE2, and EP1 and also initiates terminal differentiation in the epidermis of tumor bearing mice. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 104, 44-53.
- [55] Jangdey, M.S., Gupta, A., Saraf S&S. (2017) Development and optimization of apigenin-loaded transfersomal system for skin cancer delivery: in vitro evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 1-11.
- [56] Pal, H.C., Hunt, K.M., Diamond A. et al. (2016) Phytochemicals for the Management of Melanoma. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16 (12), 953-979.

- [57] An, F., Cao, X., Qu, H., Wang, S. (2015) Attenuation of Oxidative Stress of Erythrocytes by The Plant-Derived Flavonoids Vitexin and Apigenin. *Pharmazie*, 70 (11), 724-32.
- [58] Qian, S., Fan, W., Qian, P. et al. (2015) Apigenin Restricts FMDV Infection and Inhibits Viral IRES Driven Translational Activity. *Viruses*, 7, 1613-1626.
- [59] Anevlasis, S. and Bouros, D. (2010) Community acquired bacterial pneumonia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11, 361-374.
- [60] Arsic, I., Tadic, V. et al. (2011) Preparation of novel apigenin-enriched, liposomal and non-liposomal, anti-inflammatory topical formulations as substitutes for cortico steroid therapy. *Phytotherapy Research*, 25, 228-233.
- [61] Wang, J., Liu, Y.T., Xiao, L. et al. (2014) Anti-Inflammatory Effects of Apigenin in Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Acute Lung Injury by Suppressing COX-2 and NF-Kb Pathway. *Inflammation*, 37, 2085-2090.
- [62] Iwakiri, Y., Sampson, D.A., Allen K.G.D. (2002) Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids*. 67, 435-443.
- [63] Hou, M., Sun, R., Hupa, M. et al. (2013) Topical apigenin improves epidermal permeability barrier homeostasis in normal murine skin by divergent mechanisms. *Experimental Dermatology*, 22, 210-215.
- [64] Yano, S., Umeda, D., Yamashita, S. et al. (2009) Dietary apigenin attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 876-81.
- [65] Zhao, G., Han, X., Cheng, W. et al. (2017) Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. *Oncology Reports*, 37 (4), 2277-85.
- [66] Nielsen, S. E. and Dragsted, L. O. (1998) Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for determination of apigenin and acacetin in human urine with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, 713, 379–386.
- [67] Cai, H., Raynaud, D., Steward, W., Gescher, A. (2006) A simple HPLC method for the determination of apigenin in mouse tissues. *Biomedical Chromatography*, 20, 1038–1042.
- [68] Dong, X., Lan, W., Yin, X., Yang, C., Wang, Y., Ni, J. (2017) Simultaneous Determination and Pharmacokinetic Study of Quercetin, Luteolin, and Apigenin in Rat Plasma after Oral Administration of *Matricaria chamomilla* L. Extract by HPLC-UV. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-7.
- [69] Jaroslava, A., Zengin, G., Zekovic, Z. et al. (2016) Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process. *Journal of Supercritical Fluids*, 120, 32-42.

- [70] Almeida, L. M., Carvalho, L. S., Gazolla, M. et al. (2016) Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- [71] Tian, Y., Li, Q., Zhou, X., Pang, Q., Xu, Y. (2017) UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of twelve constituents from *Erigeron breviscapus* extract in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, 1046, 1-12.
- [72] Faccin, H., Loose, R. F., Viana, C. et al. (2017) Determination of phenolic compounds in extracts of Amazonian medicinal plants by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 9 (7), 1141-1151.
- [73] Marconi, S., Boarelli, M. et al (2017) Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim. *Journal Of Chromatography A*, 1481, 53-63.
- [74] Wu, T., Yu, C., Li, R. (2017) Determination of flavonoids in *Flos Chrysanthemi* and *Flos Chrysanthemi Indici* by capillary electrophoresis. *Instrumentation Science & Technology*, 45 (4), 412-422.
- [75] Mueller-Sepulveda, A., Letelier, M. E., Martin, B. S. et al. (2016) Simultaneous Determination of Different Flavonoids in Human Plasma By A Simple HPLC Assay. *Journal of The Chilean Chemical Society*, 61 (4), 3164-3169.
- [76] Hwang, S. H., Paek, J. H., Lim, S. S. (2016) Simultaneous Ultra Performance Liquid Chromatography Determination and Antioxidant Activity of Linarin, Luteolin, Chlorogenic Acid and Apigenin in Different Parts of *Compositae* Species. *Molecules*, 21 (11).
- [77] Sanli, S., Sanli, N., Ozkan, S. A. et al. (2016) Development and Validation of a Green Capillary Electrophoretic Method for Determination of Polyphenolic Compounds in Red Wine Samples. *Chromatographia*, 79 (19-20), 1351-1358.
- [78] Cui, X., Cai, H., Li, H. et al. (2016) Simultaneous Determination of 10 Flavonoids in Crude and Wine-Processed *Radix scutellariae* by UHPLC. *Journal Of Chromatographic Science*, 54 (3), 312-317.
- [79] Glowacki, R., Furmaniak, P., Kubalczyk, P. et al. (2016) Determination of Total Apigenin in Herbs by Micellar Electrokinetic Chromatography with UV Detection. *Journal Of Analytical Methods in Chemistry*, 1-8.
- [80] Wei, L., Wang, X., Zhang, P. et al. (2016) An UPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of two coumarins and two flavonoids in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of *Wikstroemia indica* extract. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical And Life Sciences*, 1008, 139-145.

- [81] **Maher, H. M., Al-Zoman, N. Z., Al-Shehri, M. M. et al.** (2015) Determination of Luteolin and Apigenin in Herbs by Capillary Electrophoresis with Diode Array Detection. *Instrumentation Science & Technology*, 43 (6), 611-625.
- [82] **Guzelmeric, E., Vovk, I., Yesilada, E.** (2015) Development and validation of an HPTLC method for apigenin 7-O-glucoside in chamomile flowers and its application for fingerprint discrimination of chamomile-like materials. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 107, 108-118.
- [83] **Gao, R., Wang, L., Yang, Y. et al.** (2015) Simultaneous determination of oleanolic acid, ursolic acid, quercetin and apigenin in *Swertia mussotii* Franch by capillary zone electrophoresis with running buffer modifier. *Biomedical Chromatography*, 29 (3), 402-409.
- [84] **Dai, B., Hu, Z., Li, H. et al.** (2015) Simultaneous determination of six flavonoids from *Paulownia tomentosa* flower extract in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical And Life Sciences*, 978, 54-61.
- [85] **Sandoval, L., Ettiene, G., Perez-Perez, E. et al.** (2014) HPLC determination of flavonoids in fruits of soursop (*Annona muricata* L.) from different plants. *Revista De La Facultad De Agronomia De La Universidad Del Zulia*, 31 (1), 785-800.
- [86] **Sanli, S. and Lunte, C.** (2014) Determination of eleven flavonoids in chamomile and linden extracts by capillary electrophoresis. *Analytical Methods*, 6 (11), 3858-3864.
- [87] **The International Conference on Harmonisation (ICH)**, ICH Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use on validation of analytical procedures Q2A. IFPM, 2005, Geneva.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Ecem SERİM  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 18.08.1993 - Bakırköy  
**E-posta** : ecemserim@hotmail.com.tr

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi  
Kimya Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2017, Bezmialem Vakıf Üniversitesi,  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Programı

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 04.2017-... Tıbbi Tanıtım Sorumlusu, Ali Raif İlaç Sanayi
- 03.2017-07.2016 Tıbbi Tanıtım Sorumlusu, Koçak Farma