

FARMAKOĞNOZİ VE DOĞAL ÜRÜNLER KİMYASI

DOKTORA PROGRAMI

2024

- 1. E**** E****** Laurus Nobilis L. Bitkisinden Standardize Kozmetik Hammadde Üretim Proseslerinin Geliştirilmesi ve Kozmetik Formülasyonların Hazırlanması
- 2. Ş**** U****** Sambucus Nigra L. (Kara Mürver) Bitkisinin Çiçek ve Meyvelerinden Standardize Ekstrelerin Hazırlanması ve Biyolojik Etkilerinin Araştırılması
- 3. M**** Ç****** Matricaria Recutita L. (Alman Papatyası) Bitkisinin Çiçeklerinden Standardize Ekstrelerin Hazırlanması ve Fitofarmasötik Ürünlerin Geliştirilmesi

LAURUS NOBİLİS L. BİTKİSİNDEN STANDARDİZE KOZMETİK HAMMADDE ÜRETİM PROSESLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KOZMETİK FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI

ÖZET

Defne (*Laurus nobilis* L.) Lauraceae familyasının *Laurus* cinsine ait aromatik ve çok önemli bir bitkidir. Kendine has bir kokusu bulunan defne, Akdeniz ikliminde doğal yetişme ortamı bulmakta ve Türkiye'nin de doğal bitki türleri arasında bulunmaktadır. Türkiye, dünya defne yaprağı ihtiyacının %90'ını sağlamaktadır ve önemli tedarikçiler arasındadır. Bu çalışmada defne bitkisinin yaprak, meyve, çiçekleri üzerinde çalışılarak kozmetik ve ilaç sanayi kullanım potansiyeli saptanmak istenmiştir.

Laurus nobilis, dişi ve erkek bitkileri ayrı olan dioik bir türdür. Türkiye'nin Ege Bölgesi defnenin endüstriyel amaçlı yaygın bir şekilde yetiştirildiği bir bölgedir. Her iki cinsiyette de kültür edilmiş ya da doğal defne yaprakları hemen hemen aynı bileşime ve aynı verimde uçucu yağ sunmaktadır. Sonuçlara göre çiçek uçucu yağlarının verim ve bileşimlerindeki farklılıkların sadece cinsiyete bağlı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Tüm uçucu yağlar antioksidan aktivitelere ve önemli antimikrobiyal etkilere sahiptir ancak yaprak uçucu yağları her açıdan çok daha üstündür.

Laurus nobilis bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağ (LNEO) bir yaklaşım olarak LNEO yüklü poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülleri hazırlanmış ve LNEONP'ler tek emülsiyon yöntemiyle sentezlenmiştir. LNEO, CT-DNA'ya interkalatif olarak bağlanmış ve ek olarak, LNEO'nun ikili bir PI3K/mTOR inhibitörü üzerindeki etki mekanizması tahmin edilerek antiproliferatif aktivitesi ve mekanizması, moleküler yerleştirme analizi kullanılarak belirlenmiştir. LNEO yüklü PLGA NP'lerin kozmetik formülasyon olarak nanopartikül dozaj formunda ticarileştirilmesi hedeflenmektedir.

Laurus nobilis bitkisi yaprak, meyve, yaprak uçucu yağı ve meyve sabit yağından elde edilen 14 ayrı örnek, cilt yaşlanması üzerinde etkili olduğu bilinen 3 enzim üzerinde inhibisyon aktivitesi bakımından incelenmiştir. Sonuçlar yapraktan elde edilen örneklerin, meyveden elde edilen örneklere kıyasla belirgin şekilde daha güçlü aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sebeple yaprak uçucu yağı içeren nanopartiküller geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin uçucu yağ ile benzer aktivite gösterdiği yapılan testler sonucunda ortaya konmuştur. Uçucu yağ ve uçucu yağ içeren nanopartiküller GC-MS analizine tabi tutulduğunda, uçucu yağdaki majör bileşenlerin nanopartiküllere yüklendiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar yaprak 1:5 etanol ekstresi, yaprak uçucu yağının ve yaprak uçucu yağı içeren nanopartiküllerin kozmetik formülasyonlarda kullanılma ve ekonomik bir değer ihtiva etme potansiyelini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Laurus nobilis*, kozmetik, nanoformülasyon, uçucu yağ

DEVELOPMENT OF STANDARDIZED COSMETIC RAW MATERIAL PRODUCTION PROCESSES AND PREPARATION OF COSMETIC FORMULATIONS FROM *LAURUS NOBILIS* L.

SUMMARY

Laurel (*Laurus nobilis* L.) is an aromatic and very important plant belonging to the *Laurus* genus of the Lauraceae family. Laurel, which has a unique scent, finds its natural habitat in the Mediterranean climate and is among the natural plant species of Turkey. Turkey provides 90% of the world's bay leaf needs and is among the important suppliers. In this study, it was aimed to determine the use and potential of the bay laurel plant in the cosmetic and pharmaceutical industries by studying its leaves, fruits and flowers.

Laurus nobilis is a dioecious species with separate male and female plants. Turkey's Aegean Region is a region where bay laurel is widely grown for industrial purposes. Cultivated or natural bay leaves of both sexes offer almost the same composition and the same yield of essential oil. According to the results, it was revealed that the differences in the yield and composition of flower essential oils depend only on gender. All essential oils have antioxidant activities and significant antimicrobial effects, but leaf essential oils are far superior in every respect.

As an approach, LNEO-loaded poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles were prepared using the essential oil (LNEO) obtained from the leaves of the plant *Laurus nobilis*, and LNEONPs were synthesized by the single emulsion method. LNEO was intercalally linked to CT-DNA, and in addition, its antiproliferative activity and mechanism were determined using molecular docking analysis by predicting the mechanism of action of LNEO on a dual PI3K/mTOR inhibitor. It is aimed to commercialize LNEO-loaded PLGA NPs in nanoparticle dosage form as cosmetic formulation.

14 separate samples obtained from *Laurus nobilis* plant leaves, fruit, leaf essential oil and fruit fixed oil were examined for inhibition activity on 3 enzymes known to be effective on skin aging. The results revealed that samples obtained from leaves showed significantly stronger activity than samples obtained from fruit. For this reason, nanoparticles containing leaf essential oil have been developed. As a result of the tests, it was revealed that nanoparticles showed similar activities as essential oil. When essential oil and nanoparticles containing essential oil were subjected to GC-MS analysis, it was observed that the major components in the essential oil were loaded into the nanoparticles. These results revealed the potential of leaf 1:5 ethanol extract, leaf essential oil, and nanoparticles containing leaf essential oil to be used in cosmetic formulations and have economic value.

Keywords: *Laurus nobilis*, cosmetics, nanoformulation, essential oil

***SAMBUCUS NIGRA* L. (KARA MÜRVER) BİTKİSİNİN ÇİÇEK VE MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile çalışılarak, Türkiye’de doğal olarak yetişen *Sambucus nigra* L. bitkisinin 121 farklı bölgeden alınan örnekleri toplam antosiyanin içeriği bakımından değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, yerli ve antosiyanince zengin bir *S. nigra* kültür çeşidi geliştirilecektir.

Tez kapsamında, Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi’nde (BAÇEM) kültüre alınan *S. nigra* bitkilerinin çiçek, meyve ve yapraklarından toplanmıştır. Bu bitkisel materyallerden meyve %96 etanol ekstresi, çiçek %70 etanol ekstresi, yaprak %70 etanol ekstresi hazırlanmış ve bu ekstrelerin A549, MCF-7 ve U-118 MG hücre hatlarındaki sitotoksitesi çalışılmış, ekstrelerin bu hücre hatlarında önemli sitotoksite sergilemediği tespit edilmiştir.

Kara mürver ekstrelerindeki rutin ve izokersitrin flavonoidlerini PDA dedektörlü HPLC cihazında kantitatif olarak tayin edebilmek için metot geliştirilmiştir. Geliştirilen metot doğruluk, kesinlik, seçicilik, tayin sınır, gözlenebilme limiti, doğrusalılık, uygulama aralığı ve sağlamlık açısından USP kriterlerine göre valide edilmiştir.

BAÇEM’den toplanan *S. nigra* çiçek, meyve ve yapraklarından standardize %50 etanol ekstreleri ve %100 su ekstreleri elde edilmiş ve her birinin spesifikasyonu oluşturulmuştur. Spesifikasyonlarda kimyasal içerik bakımından fenolik madde miktarı, flavonoid madde miktarı, rutin miktarı ve izokersitrin miktarına yer verilmiştir. Elde edilen standardize ekstrelerin her biri, yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obeziteye sahip erkek Wistar albino sıçan gruplarının diyetlerine dahil edilerek test edilmiştir. Obezitede etkili parametreler olan HDL, LDL, trigliserit, adinopektin, leptin, T₃, T₄, TNF- α , IL-1 β , kan glukozu seviyesi, serum insülin seviyesi, lipaz enzim inhibisyonu ve serum lipaz seviyesi değişimleri 7 hafta boyunca takip edilmiştir. *In vivo* olarak test edilen ekstrelerin obezite parametrelerinde kayda değer değişiklikler meydana getirmediği saptanmıştır.

Ek olarak, kara mürver, ekinezya ekstreleri ile C vitamini ve çinko içeren, bağışıklık güçlendirmek için, soğuk algınlığına karşı kullanılacak damla formunda bir formülasyon hazırlanmıştır. Formülasyonun L-askorbik asit, toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam antosiyanin madde miktarlarının stabilitesi başlangıçtan itibaren 3 ay boyunca 3 farklı ortamda takip edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kara mürver, *Sambucus nigra* L., obezite, sitotoksite, metot validasyonu

PREPARATION OF STANDARDIZED EXTRACTS FROM FLOWERS AND FRUITS OF *SAMBUCUS NIGRA* L. (BLACK ELDERBERRY) AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL EFFECTS

SUMMARY

In this study, working with the Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry Aegean Agricultural Research Institute samples of the *Sambucus nigra* L. plant, which grows naturally in Türkiye, taken from 121 different regions were evaluated in terms of total anthocyanin content. In line with these results, a native and anthocyanin-rich *S. nigra* cultivar will be developed.

Within the scope of the dissertation, flowers, fruits and leaves of *S. nigra* plants cultivated at Balıkesir Metropolitan Municipality Farmer Training Center (BAÇEM) were collected. Fruit 96% ethanol extract, flower 70% ethanol extract, leaf 70% ethanol extract were prepared from these plant materials, and the cytotoxicity of these extracts on A549, MCF-7 and U-118 MG cell lines was studied, and it was determined that the extracts did not exhibit significant cytotoxicity in these cell lines.

A method was developed to quantitatively determine the rutin and isoquercitrin flavonoids in black elderberry extracts on an HPLC device equipped with a PDA detector. The developed method has been validated according to USP criteria in terms of accuracy, precision, selectivity, detection limit, detection limit, linearity, application range and robustness.

Standardized 50% ethanol extracts and 100% water extracts were obtained from *S. nigra* flowers, fruits and leaves collected from BAÇEM, and the specifications of each were created. In terms of chemical content, the specifications include the amount of phenolic substance, the amount of flavonoid substance, the amount of rutin and isoquercitrin. Each of the resulting standardized extracts was tested by inclusion in the diets of groups of male Wistar albino rats with high-fat diet-induced obesity. Changes in HDL, LDL, triglyceride, adiponectin, leptin, T₃, T₄, TNF- α , IL-1 β , blood glucose level, serum insulin level, lipase enzyme inhibition and serum lipase level, which are effective parameters in obesity, were monitored for 7 weeks. It was determined that the extracts tested *in vivo* did not cause significant changes in obesity parameters.

In addition, a formulation in the form of drops containing black elderberry and echinacea extracts, vitamin C and zinc has been prepared to strengthen immunity and be used against common cold. The stability of the L-ascorbic acid, total phenolic substance, total flavonoid substance and total anthocyanin substance amounts of the formulation was monitored in 3 different environments for 3 months from the beginning.

Keywords: Black elderberry, *Sambucus nigra* L., obesity, cytotoxicity, method validation

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 papatyası 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 antienflamatuar 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