



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *ALCHEMİLLA* TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Ekin KURTUL

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özlem BAHADIR ACIKARA**

**ANKARA
2015**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *ALCHEMİLLA* TÜRLERİ
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Ekin KURTUL

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özlem BAHADIR ACIKARA**

**ANKARA
2015**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “TÜRKİYE’E YETİŞEN BAZI *ALCHEMILLA* TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:Ekin KURTUL

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalında

Ekin KURTUL tarafından hazırlanan

"Türkiye'de Yetişen Bazı *Alchemilla* Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar"
adlı tez çalışması

Aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/12/2015

Prof.Dr.Gülçin SALTAN İŞCAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Osman ÜSTÜN
Gazi Üniversitesi

Üye

Doç.Dr.Özlem BAHADIR ACIKARA
Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii

1. GİRİŞ

1.1. Botanik Özellikler	15
1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri	15
1.1.2. Rosaceae (Gülgiller) Familyasının Botanik Özellikleri	15
1.1.3. <i>Alchemilla</i> L. Cinsinin Botanik Özellikleri	16
1.1.4. <i>Alchemilla mollis</i> ve <i>Alchemilla persica</i> Türlerinin Tayin Anahtarı	16
1.1.5. <i>Alchemilla mollis</i> (Buser) Rothm. Türünün Botanik Özellikleri	17
1.1.6. <i>Alchemilla persica</i> Rothm. Türünün Botanik Özellikleri	18
1.2. <i>Alchemilla</i> L. Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	20
1.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	20
1.2.1.1. Fenolik Asitler	20
1.2.1.2. Flavonoidler	21
1.2.1.3. Tanenler	26
1.2.1.4. Terpenik Bileşikler	28
1.2.1.4.1. Triterpenler	28
1.2.1.4.2. Uçucu Bileşikler	29
1.2.1.4.3. Yağ Asitleri	30
1.2.1.5. Diğer Bileşikler	32
1.2.2. Biyoaktivite Çalışmaları	32
1.2.2.1. Anjiyoprotektif Aktivite	32
1.2.2.2. Antiinflamatuvar Aktivite	33
1.2.2.3. Antimikrobiyal Aktivite	34
1.2.2.4. Antioksidan Aktivite	36
1.2.2.5. Antitümör ve Sitotoksik Aktivite	38
1.2.2.6. Kadın Hastalıkları Üzerine Etki	40
1.2.2.7. Yara İyi Edici Etki	40
1.2.2.8. Diğer Aktiviteler	42

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç	45
2.1.1. Bitkisel Materyal	45
2.2. Yöntem	48
2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	48
2.2.1.1. İzolasyon Çalışmaları	48

2.2.1.1.1.Ekstraksiyon Çalışmaları	48
2.2.1.1.2. Kromatografi Çalışmaları	48
2.2.1.1.2.1. Silikajel Kolon Uygulamaları	48
2.2.1.1.2.2. Sefadeks Kolon Uygulamaları	49
2.2.1.1.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi	49
2.2.1.1.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analizleri	50
2.2.1.1.3.İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini	51
2.2.1.1.3.1.Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi	51
2.2.1.1.3.2. Kütle Spektroskopisi	52
2.2.1.2.Farmakope Analizleri	52
2.2.1.2.1. Tanen Miktar Tayini	52
2.2.1.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi Analizleri	54
2.2.1.3.Miktar Tayini Çalışmaları	55
2.2.2. Biyoaktivite Çalışmaları	56
2.2.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	56
3. BULGULAR	
3.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular	58
3.1.1. İzolasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	58
3.1.1.1. Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Bulgular	58
3.1.1.2. Kromatografi Çalışmalarına Ait Bulgular	58
3.1.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisine Ait Bulgular	58
3.1.1.2.2. Silikajel Kolon Uygulamalarına Ait Bulgular	60
3.1.1.2.3.Sefadeks Kolon Uygulamalarına Ait Bulgular	62
3.1.1.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine Ait Bulgular	66
3.1.1.3.İzole Edilen Bileşiklerin Yapılarının Aydınlatılması	67
3.1.1.3.1.AML-1 Bileşiğinin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular	67
3.1.1.3.2. AML-2 Bileşiğinin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular	73
3.1.2. Farmakope Analizlerine Ait Bulgular	77
3.1.2.1. Tanen Miktar Tayinine Ait Bulgular	77
3.1.2.2. İnce Tabaka Kromatografisine Ait Bulgular	79
3.1.3. YPSK ile Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular	81
2.2.2. Biyoaktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	85
2.2.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	85
4.TARTIŞMA	88
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
ÖZET	94
SUMMARY	95
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	104

ÖNSÖZ

Alchemilla cinsi dünyada 1000'in üzerinde; ülkemizde ise 74 türle temsil edilmektedir. Ancak ülkemizde yetişen türlerle ilgili yurtiçi çalışma sayısı oldukça azdır. Bu tez çalışmasında ülkemizde yetişen *Alchemilla mollis* ve *Alchemilla persica* türleri üzerinde fitokimyasal çalışmalar, farmakope analizleri ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılarak, *Alchemilla* cinsinin Türkiye'de yetişen türleri üzerine dikkat çekmek ve bilime katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Çalışmalarım esnasında benden hiçbir şekilde bilgisini, tecrübesini, emeğini ve samimiyetini esirgemeyen; beni yönlendiren; desteğini, sabrını ve hoşgörüsünü her zaman hissettiğim; birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum; Sayın ve sevgili danışman hocam Doç. Dr. Özlem BAHADIR ACIKARA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde gerekli olanakları sağlayan Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın hocam Prof. Dr. Gülçin SALTAN İŞCAN'a, çalışmalarımda bana her türlü yardımı sağlayan ve bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarıma ve benden desteğini esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımda Merkez Laboratuvarını kullanmama olanak sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Bitkisel materyalin toplanmasında yardımlarını gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet TEKİN'e teşekkür ederim.

Kimyasal yapı tayini çalışmalarında bana yardımcı olan Sayın hocam Prof. Dr. Hakan GÖKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında bilgisini, yardımlarını ve emeğini esirgemeyen Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Müjde YÜCE ERYILMAZ ve Sibel GÜRPINAR'a teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte beni yalnız bırakmayan ve bana destek olan Veysel ÖZAYDIN ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her noktasında sevgi ve destekleriyle arkamda duran, bugünlere gelmemi sağlayan annem ve babam başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
AChE	Asetilkolinesteraz
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Santimetre
COX	Siklooksijenaz
CUFH	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
DAD	Diode array dedector
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FID	Flame ionisation dedector (alev iyonizasyon dedektörü)
γ	Gama
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GC	Gaz kromatografisi
HORAC	Hidroksil radikali engelleme kapasitesi
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
IL	İnterlökin
ICAM	Hücre içi adezyon molekülü
İTK	İnce tabaka kromatografisi
KS	Kütle spektrometresi

LC	Liquid chromatography (sıvı kromatografisi)
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOD	Limit of detection (teşhis edilebilir en düşük limit - teşhis sınırı)
LOQ	Limit of quantification (hesaplanabilir en düşük limit - tayin sınırı)
M	Molar
MeOD	Dötorometanol
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonu
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NMR	Nükleer manyetik rezonans
ORAC	Oksijen radikali absorbans kapasitesi
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
TBARS	Tiyobarbütirik asit reaktif ürünleri
TNF	Tumor necrosis factor (tümör nekroz faktörü)
TRAP	Tartarat rezistan asit fosfataz
UV	Ultraviyole
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	<i>Alchemilla</i> türlerinde tespit edilen bazı fenolik asitler	20
Şekil 1.2.	<i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen bazı flavonoidler	22
Şekil 1.3.	<i>Alchemilla</i> türlerinde tespit edilen bazı flavonoidler	25
Şekil 1.4.	<i>Alchemilla</i> türlerinde tespit edilen bazı tanenler	26
Şekil 1.5.	<i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen bazı triterpenler	28
Şekil 1.6.	<i>Alchemilla</i> türlerinde tespit edilen bazı uçucu bileşikler	29
Şekil 1.7.	<i>Alchemilla</i> türlerinde tespit edilen bazı yağ asitleri	30
Şekil 2.1.	<i>A.mollis</i> 'in doğadaki görünüşü	46
Şekil 2.2.	<i>A.persica</i> 'nın doğadaki görünüşü	47
Şekil 3.1.	Silikajel kolondan elde edilen fraksiyonların etilasetat:metanol:su (80:13,5:10) çözücü sistemiyle normal faz İTK uygulaması	59
Şekil 3.2.	Silikajel kolondan elde edilen fraksiyonların metanol:su (1:1) çözücü sistemiyle ters faz İTK uygulaması	60
Şekil 3.3.	Silikajel kolon sonucu elde edilen fraksiyonlar	61
Şekil 3.4.	AML-1 bileşiğinin izolasyon şeması	62
Şekil 3.5.	EKB14-16 fraksiyonunun sefadesks kolondan elde edilen alt fraksiyonları	63
Şekil 3.6.	EKB17-18 fraksiyonunun sefadesks kolondan elde edilen alt fraksiyonları	64
Şekil 3.7.	AML-2 bileşiğinin izolasyon şeması	65
Şekil 3.8.	AML-1 bileşiğinin YPSK kromatogramı, 254 nm	66
Şekil 3.9.	AML-1 bileşiğinin UV spektrumu	66
Şekil 3.10.	AML-2 bileşiğinin YPSK kromatogramı, 210 nm	67
Şekil 3.11.	AML-2 bileşiğinin UV spektrumu	67
Şekil 3.12.	AML-1 bileşiğinin KS spektrumu	68
Şekil 3.13.	AML-1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	69
Şekil 3.14.	AML-1 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	70
Şekil 3.15.	AML-1 bileşiğinin yapı tayini bulguları	72
Şekil 3.16.	AML-2 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	73
Şekil 3.17.	AML-2 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	74
Şekil 3.18.	AML-2 bileşiğinin HMBC spektrumu	75

Şekil 3.19.	AML-2 bileşiğinin yapı tayini bulguları	77
Şekil 3.20.	Gallik asit için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi	78
Şekil 3.21.	Bitki ekstraktlarının ve standartların Avrupa Farmakopesi'e göre İTK analizleri	79
Şekil 3.22.	Bitki ekstraktlarının ve standartların Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals kitabına göre İTK analizleri	80
Şekil 3.23.	<i>A.mollis</i> toprak üstü kısımlarına ait YPSK kromatogramları	81
Şekil 3.24.	<i>A.persica</i> toprak üstü kısımlarına ait YPSK kromatogramları	82
Şekil 3.25.	<i>A.mollis</i> köklerine ait YPSK kromatogramı; UV ₂₁₀	82
Şekil 3.26.	<i>A.persica</i> köklerine ait YPSK kromatogramı; UV ₂₁₀	82
Şekil 3.27.	Kateşinin 210 nm'deki YPSK kromatogramı ve UV spektrumu	83
Şekil 3.28.	Kateşin için kalibrasyon grafiği ve denklemi	84
Şekil 3.29.	AML-1 bileşiği için kalibrasyon grafiği ve denklemi	84
Şekil 3.30.	AML-2 için kalibrasyon grafiği ve denklemi	84

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	<i>Alchemilla</i> türlerinde YPSK analizi ile tespit edilen flavonozitler	25
Çizelge 1.2.	<i>Alchemilla</i> türlerinde tespit edilen yağ asitleri	31
Çizelge 1.3.	mm'de inhibe edilen zon sayısı	35
Çizelge 1.4.	<i>Alchemillarizeensis</i> ekstrelerinin MIK değerleri.	35
Çizelge 1.5.	<i>Alchemilla</i> türlerinin fenolik madde miktarları (mg GAE(Gallik asit ekivalanı)/g ekstre) ve antioksidan aktiviteleri (IC ₅₀)	39
Çizelge 1.6.	<i>Alchemilla</i> ekstrelerinin apoptotik ve nekrotik etkileri	39
Çizelge 1.7.	<i>A.vulgaris</i> ekstresi (%3) ile tedavi edilen lezyonların iyileşme üzerine etkisi	41
Çizelge 1.8.	<i>A. vulgaris</i> 'in AChE inhibitörü aktivitesi	44
Çizelge 1.9.	<i>A. vulgaris</i> 'intirozinaz enzim inhibitörü aktivitesi	44
Çizelge 2.1.	Ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların incelenmesinde kullanılan çözücü sistemleri	50
Çizelge 2.2.	YPSK analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi	51
Çizelge 2.3.	YPSK miktar tayini analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi	56
Çizelge 3.1.	AML-1 bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C NMR bulguları	71
Çizelge 3.2.	AML-2 bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C NMR bulguları	76
Çizelge 3.3.	Bitki kısımlarındaki total polifenol miktarları (mg GAE/g bitki)	78
Çizelge 3.4.	Bitki kısımlarındaki tanen miktarı (g/100 g bitki materyali)	78
Çizelge 3.5.	Standart maddelerin (AML-1, AML-2, Kateşin) retansiyon zamanları (dk)	83
Çizelge 3.6.	<i>Alchemilla</i> türlerinin kateşin, AML-1 ve AML-2 miktarları	85
Çizelge 3.7.	Kateşin, AML-1 ve AML-2'ye ait LOD ve LOQ değerleri	85
Çizelge 3.8.	Ekstrelerin test edilen mikroorganizmalar için MIK değerleri (mg/ml)	86
Çizelge 3.9.	İzole edilen maddelerin test edilen mikroorganizmalar için MIK değerleri (mg/ml)	86

1.GİRİŞ

Alchemilla L. Rosacea familyasına ait, tür açısından oldukça zengin cinslerden biridir. Bu türler Avrasya'da yetişmekle birlikte Avrupa, Doğu Afrika, Kuzey Amerika ve Avustralya'da yayılış göstermektedir (Davis, 1982). Günümüzde Avrupa ve Akdeniz bölgesinde yaklaşık 541 türü olduğu düşünülmektedir. Türkiye'de 74 adet *Alchemilla* türü kayıtlıdır ve yetişen türler çoğunlukla Kuzey ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış göstermektedir (Aymerich ve Saez, 2015; Davis, 1982; Hayırlıoğlu ve Beyazoğlu, 1997; Kaya ve ark., 2012; Özhatay ve Kültür, 2006, Özhatay ve ark., 2011).

Alchemilla cinsi içinde en çok dikkat çeken tür *Alchemilla vulgaris* L.'tir. Avrupa'da Lady's mantle, Bear's foot, Lions's foot gibi isimlerle bilinmekte ve halk arasında dahilen menopoz şikayetlerinin giderilmesinde, dismenore ve menoraji gibi jinekolojik problemlerde, menstrüal ağrılarda, gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında, iltihabi rahatsızlıklarda ve kilo kontrolünde, gargara olarak ise ağız ve boğaz iltihaplarında kullanılmaktadır. Yaralarda, ekzema ve kızarıklık gibi cilt problemlerinde ise haricen kullanılmaktadır (PDR for Herbal Medicines, 2000; Said ve ark., 2012; Tasic, 2012). Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlıdır. Almanya'da Sağlık Bakanlığı bünyesinde bulunan Komisyon E tarafından spesifik olmayan diyarede bitkinin kullanımı onaylanmıştır (Komisyon E, 1986). ESCOP monograflarında ise spesifik olmayan diyarede, gastrointestinal şikayetlerde ve dismenorede kullanımı klinik çalışmalar ve uzun süreli kullanımına dayanılarak onaylanmıştır (ESCOP Monographs, 2013).

Ülkemizde *A.vulgaris* yetişmemektedir. *Alchemilla* türleri halk arasında fındık otu veya aslan pençesi gibi isimlerle bilinmekte ve yapılan etnobotanik çalışmalarda genel olarak toprak üstü kısımları yara iyi edici (Saraç ve ark., 2013; Kaval ve ark., 2014; Güzel ve ark., 2015; Mükemre ve ark., 2015), sakinleştirici (Saraç ve ark., 2013), antidiyareik, tonik ve diüretik olarak (Baytop, 1999; Altundağ ve Öztürk,

2011; Akbulut ve Bayramoğlu, 2013), menstürasyon düzensizliklerinde (Polat ve ark., 2011), jinekolojik problemlerde (Sağıroğlu ve ark., 2012; Kalankan ve ark., 2015), karaciğer enflamasyonunda, solunum güçlüğünde (Sağıroğlu ve ark., 2012), astım, bronşit tedavisinde ve öksürük kesici olarak (Polat ve ark., 2015), diyabet, böbrek, barsak ve mide hastalıklarında (Akbulut ve Özkan, 2014; Akbulut ve Bayramoğlu, 2014), antienflamatuar olarak ve deri hastalıklarında (Kaval ve ark., 2014) kullanılmaktadır.

Alchemilla türleri üzerinde yapılan biyoaktivite çalışmaları bitkilerin anjiyoprotektif, antikanserojenik, antioksidan, yara iyi edici, antimikrobiyal, antiviral aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir (Condrat ve ark., 2009; Küpeli ve ark., 2015).

Alchemilla türlerinin drog olarak kullanılan toprak üstü kısımları fitokimyasal bileşikler açısından zengin bir içeriğe sahiptir. Yapılan fitokimyasal çalışmalar *Alchemilla* türlerinin tanen, flavonozit, proantosiyanidin, triterpen ve fenolik bileşikleri içerdiğini göstermektedir (Condrat ve ark., 2009; Makau ve ark., 2013; Ergene ve ark., 2014; Küpeli ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında ülkemizde yaygın olarak özellikle Karadeniz Bölgesi ile Sivas, Yozgat civarında yetişen *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. ve Doğu Anadolu'da yayılış gösteren *Alchemilla persica* Rothm. türlerinin kimyasal içeriklerinin araştırılarak, bu türlerin Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olan *A.vulgaris* yerine kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *A.mollis* içeren "Herba Alchemilla" olarak bilinen ticari preparat Avrupa'da geleneksel tedavide anstrejan, diüretik, antispazmodik olarak ve şiddetli menstrüasyon ile yara tedavisinde kullanılmaktadır (Makau ve ark., 2013). Ülkemizde de *Alchemilla* türleri halk arasında benzer amaçlarla kullanılmaktadır. Duckstein ve ark., (2013) tarafından yapılan fitokimyasal çalışmada *A.mollis* ve *A.vulgaris* türlerinin toprak üstü kısımlarının kimyasal içeriklerinin oldukça benzer olduğu da ortaya konmuştur.

1.1. Botanik Özellikler

1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri

Alchemilla L. cinsinin sistematik sınıflandırması:

Alem	: Plantae (Bitkiler)
Bölüm	: Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler, Çiçekli Bitkiler)
Alt Bölüm	: Angiospermae (Kapalı Tohumlu Bitkiler)
Sınıf	: Dicotyledones (İki çenekliler)
Alt Sınıf	: Dialypetalae (Ayrıpetalliler)
Takım	: Rosales
Familya	: Rosaceae
Alt Familya	: Rosoideae
Cins	: <i>Alchemilla</i> L.

(Davis, 1982; Tanker ve ark., 2014)

1.1.2. Rosaceae (Gülgiller) Familyasının Botanik Özellikleri

Bu familyanın bitkilerine dünyanın her yerinde yaygın olarak rastlanmakla birlikte, Kuzey Yarıkürede yetişenler daha fazla gelişmiştir. Çoğunlukla çok yıllıklardır, tek yıllık olanlara da rastlanır. Otsu veya odunsu yapıda, bazen de dallanmış olarak bulunurlar. Yaprakları alternan dizilişli, çoğunlukla stipulalıdır. Basit veya bileşik yaprak şeklinde olabilir. Yaprak kenarları genellikle dişlidir. Çiçek durumu ağaçlarda ve çalılarda çoğunlukla mahmuz şeklinde sürgün verir. Çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli, aktinomorf, epigin veya perigin ve 4-5 sepallidir, genellikle hipantiyum bulunur. Petaller 4-5 tane ve bağımsızdır. Stamenler petal sayısı kadar veya daha fazladır. Ovaryum üst veya alt durumlu olabilir. Karpeller sadece alt durumlu ovaryuma sahip cinslerde birleşik olarak bulunur. Meyveler yaş veya kuru, çiçek

tablası veya hipantiyum üzerinde, aken tipi, drupa ve çekirdeklidir. Tohumlar endosperma taşımaz. Besin maddesi kotiledonda toplanmıştır. Yeryüzünde 115 kadar cins, 3200 tür; Anadolu'da 35 kadar cins ve 250 türü yetişir. Meyveleri (elma, armut, çilek, erik, kiraz, kayısı) nedeniyle ekonomik değeri yüksektir (Davis, 1982; Tanker ve ark., 2014).

1.1.3. *Alchemilla* L. Cinsinin Botanik Özellikleri

Alchemilla türleri çoğunlukla Avrasya'da yayılış gösterir ancak Avrupa, Doğu Afrika, Kuzey Amerika ve Avustralya'da da yetişmektedir. Türkiye'de yetişen türler çoğunlukla Kuzey Anadolu Bölgesi'nde yayılış göstermekle birlikte Kırım, Kafkasya ve İran'da da bu türlere rastlanmaktadır. Çok yıllık bitkilerdir. Odunsu rizomlara sahiptirler. Yaprakları palmat veya lobludur. Sezon sonu büyümesinde veya kesilme, otlatılma sonrasındaki büyümede yaprak şekli ve tüylenme farklılık gösterebilir. Bu nedenle teşhis sırasında yaprak için olgun, taban yaprakları, sinüs için ise iki taban lobu arasındaki açı veya boşluk değerlendirilir. 4-5 çiçek birleşik salkım şeklinde gözlenir. Hipantiyum urseolattır. Epikaliks vardır, stamenler 4-5 tanedir. Meyve tek, aken, tamamen veya kısmen ince, kuru hipantiyumla kapanmıştır. Avrupa'da yetişen türlerin bir çoğu eşeysiz üreme ile çoğalır. Polenler büyük ölçüde gelişmemiştir (Davis, 1982; Sepp ve Paal, 1998).

1.1.4. *Alchemilla mollis* ve *Alchemilla persica* Türlerinin Tayin Anahtarı

Türkiye'de yetişen *Alchemilla* cinsi "Flora of Turkey and The East Aegean Islands Cilt 4" 'te morfolojik özelliklerine göre A,B,C,D ve E olmak üzere beş grup altında toplanmıştır. Gruplar ile C grubunda yer alan *A.mollis* ve *A.persica* için tayin anahtarları aşağıda verilmiştir(Davis, 1982).

1. Yapraklar tabandan veya tabana yakın parçalı (Subsect. *Chirophyllum*)

A GRUBU

1. Yapraklar loblu

2. Sepaller hipantiyumdan uzun; dış kaliks lobları sepallerle aynı veya daha uzun; aken tipi meyvesi hipantiyumdan uzun (Subsect. *Calicanthum*)

B GRUBU

3. Dallar ve yaprak sapları tüylü

C GRUBU

3. Dallar ve yaprak sapları tüysüz veya yatık tüylü

4. Hipantiyum kısmen tüylü

D GRUBU

4. Hipantiyum tüysüz

E GRUBU

C GRUBU

1. Tüm çiçek sapları yoğun şekilde tüylü

2. Sepal ve epikaliks lobları tüysüz

3. Kökler, yaprak sapları ve çiçek sapları dik-yayık tüylerle kaplı; yaprak lobları 5-8 eşit hemen hemen eşit dişler

3. Kökler, yaprak sapları ve çiçek sapları yayık tüylerle kaplı; yaprak lobları 7-11 eşit olmayan dişli

2. Sepal ve epikaliks lobları seyrek kirpikli

4. Glomeruller yoğun, uzun, 3 katına kadar uzunlukta; yapraklar geniş boşluklu

4. Glomeruller gevşek, kısa; yapraklar dar veya kapalı boşluklu

1. Tüm çiçek sapları tüysüz veya bazılarının sadece proksimal kısmı seyrek tüylü
5. Bütün yaprakların iki yüzü de yoğun tüylü
6. Yaprak lobları 1/7-1/4
7. Çiçekler 3.5-5 mm genişliğinde (bazen daha geniş); bütün çiçek sapları tüysüz
8. Kökler neredeyse tamamen tüylü (en az uzunluğunun 5/6'sı kadar); yapraklar dar veya kapalı boşluklu
9. Yaprak lobları trunkat değil, yarıklar yok; 6-10 dişli

29. *mollis*

5. Yaprakların en azından üst yüzü tüysüz veya seyrek tüylü
10. Hipantiyum kısmen tüylü
11. En azından bazı yaprakların üst yüzü tüylü
12. Yaprak lobları kavisli, yuvarlağa yakın veya yarı-eliptik
13. Kökler neredeyse tamamen tüylü; yaprak lobları yarıksız

35. *persica*

1.1.5. *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. Türünün Botanik Özellikleri

Gövde 25-80 cm, gür, sert, dik olarak yükselmiş, tüyleri yayık, yaprak sapı da dahil boylu boyunca tüylü. Yapraklar dairemsi veya dairemsi-böbrek şeklinde, 13x15,5 cm'ye kadar, dar veya kapalı açılı, iki yüzü de yoğun tüylü, 9-11 loblu, loblar 1/7-4-13, yay şeklinde veya yarı dairemsi, yuvarlak ama tepesi düz değil, dışsız yarık yok. Gövde yaprakları büyük, çiçeklenme geniş, çiçek kümeleri yakınlaşmış, çiçek sapları tüysüz. Çiçekler (3-)3,5-5(-6) mm genişliğinde, hipantiyum yayık tüylü, dış kaliks

lobları ovat veya ovat-lanseolat, genellikle bir küçük dişli, çoğunlukla oval sepallerden uzun. Aynı zamanda sivri ve genellikle tüysüz (Davis, 1982).

Yetiştirme yerleri: Kuzey Anadolu. Bursa: Uludağ, Bolu: Aladağ; Kartalkaya tepesi 1600-2000m; Kastamonu: Ilgaz 1350-2100 m; Çankırı: 1450 m; Sinop: Çangal Dağı, Ayancık'ın yukarısı, 900 m; Amasya: Ak Dağ, 1400-1800 m; Gümüşhane: Tempede; Sivas: Ak Dağ'ın kuzeyi, 1400 m. Romanya, Güney Rusya, Kafkasya, Gürcistan, Sovyet Ermenistan, Kuzey İran (Davis, 1982).

1.1.6. *Alchemilla persica* Rothm. Türünün Botanik Özellikleri

Gövde yeşil veya sarımsı-yeşil, 30-70(-100) cm, gür, dik olarak yükselmiş, yayık tüylü, yukarılarda daha seyrek. Yapraklar geniş, sert, böbrek şeklinde veya dairemsi-böbrek şeklinde, kıvrımlı, oldukça geniş açılı, loblar $(1/5-1/4)$ - belli belirsiz yarıklı veya yarık yok; 9-11 loblu, parabolik, dişler 6-9(-12), eşitimsi, meyilli üçgenimsi, akutumsu, birbirine yaklaşmış, tepe yanlardan biraz küçük. Yaprakların iki yüzü seyrekten yoğunla kadar tüylü, genellikle alt yüzü yoğun; nadiren bazı yapraklar tüysüz. Çiçek kümesi gevşek; çiçek sapları tüysüz. Çiçekler 3,5-5,5(-6) mm genişliğinde; hipantiyum seyrek veya yoğun yayık tüylü (nadiren tüysüz); sepaller ovat-üçgenimsi, $\pm$ akut, tüysüz; dış kaliks lobları sepallerle aynı boyda veya sepallerden biraz uzun, genellikle her çiçek 1(-2) küçük dişli (Davis, 1982).

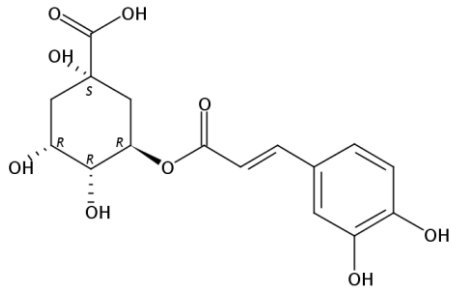
Yetiştirme yerleri: Doğu Anadolu. Kars: Kağızman'ın doğusundaki dağlar, Akçay-Cumaçay yolunda 20.km, 2200 m; Bitlis: Meleto Dağı, 2750 m; Van: Pelli'nin 10 km güneydoğusu; Van: Hoşap, Kepir Dağı, 2800 m; Hakkari: Cilo Dağı, Diz Deresinin yukarısı, 2500 m. Kafkasya, Kuzey ve Kuzeydoğu İran, Kuzey Irak (Davis, 1982).

1.2. *Alchemilla* L. Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

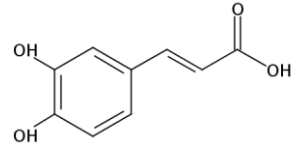
1.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

1.2.1.1. Fenolik Asitler

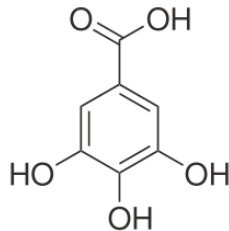
Alchemilla jumrukczalica Pawl. ve *A. vulgaris* bitkisinin yaprakları sulu-metanol ile ekstre edilmiş ve ekstre GC-KS yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda ekstrede; β -fenilpirüvik asit, salisilik asit, trans-sinamik asit, vanilik asit, gentisik asit, protokateşik asit, siringik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, sinapik asit hem bağlı hem de serbest formda; benzoik asit, m-hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, β -rezorsilik asit, mandelik asit, gallik asit, 3,4,5-trimetoksimandelik asit ise sadece bağlı formda tespit edilmiştir (Şekil 1.1.) (Nikolova ve ark., 2012).



Klorojenik asit



Kafeik asit



Gallik asit

Şekil 1.1. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen bazı fenolik asitler

Duckstein ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *A.mollis* ve *A.vulgaris* saplı yapraklarının sulu-asetonlu ekstraları hazırlanmış, her iki bitkinin de klorojenik asit içerdiği LC-KS/KS yöntemiyle tespit edilmiştir.

1.2.1.2. Flavonoidler

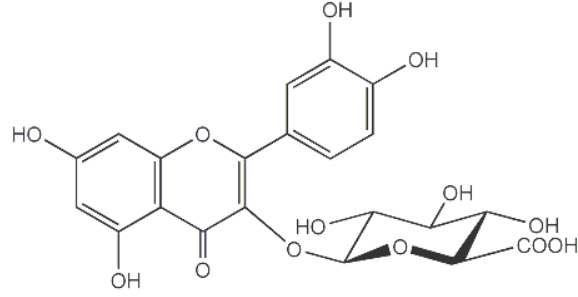
D'Agostino ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan bir çalışmada *A.vulgaris* L.'in toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresi su ve bütanolle partitisyona tabi tutulmuş ve sefadeks kolona uygulanmıştır. Kolondan metanolle elüsyon yapılarak birleştirilen fraksiyonlardan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile kersetin-3-O- β -D-glukopiranozit, kersetin-3-O- β -D-rutinozit, kersetin-3-O- α -D-arabinofuranozit, 3-O-kemferol-6"-O-O-(*p*-kumaroil)- β -D-glukopiranozit izole edilmiştir.

Alchemilla xanthochlora Rothm. bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımlarından kersetin 3-O- α -L-arabinopiranozit (gujaverin) bileşiği izole edilmiştir (Şekil 1.2.) (Fraisie ve ark, 2000).

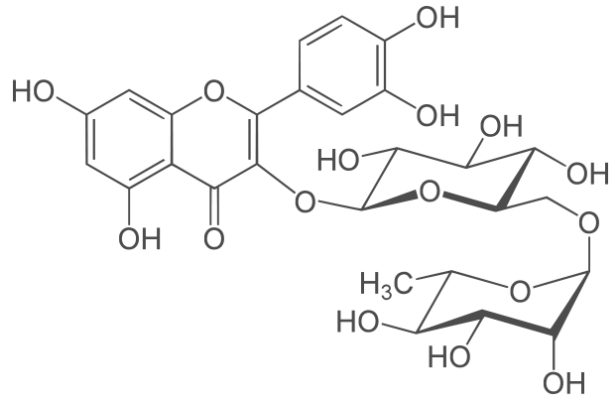
A.mollis'in çiçekli toprak üstü kısımları metanolle ekstre edilerek etanolle partitisyona tabi tutulmuştur. Elde edilen etanollü ekstre sefadeks kolona uygulanarak cis- ve trans-tilirozit, rodiojin, hiperozit, izokersitrin, mikuelianin ve sinokrazozit D2 bileşikler izole edilmiştir (Şekil 1.2.) (Trendafilova ve ark., 2011).

Alchemilla achtarowii Pawl. bitkisinin toprak üstü kısımları metanol ile ekstre edilmiş, çözücü uçurulduktan sonra elde edilen kuru ekstre petrol eteri, kloroform ve etil asetat ile partitisyona tabi tutulmuştur. Etil asetat fraksiyonusefadekskolona uygulanarak flavonoid bileşikler içeren fraksiyonlar elde edilmiştir. Bu fraksiyonlardan orta basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak kemferol 3-O- β -D-(6"-Z-*p*-kumaroil)-glukopiranozit (*cis*-tilirozit), kemferol 3-O- β -D-(6"-Z-*p*-kumaroil)-glukopiranozit (*trans*-tilirozit), kemferol 3-O- β -D-glukozit (trifolin), kemferol 3-O-(4"-E-*p*-kumaroil)-robinobiozit (variabilozit G), kersetin 3-O- α -L-arabinopiranozit

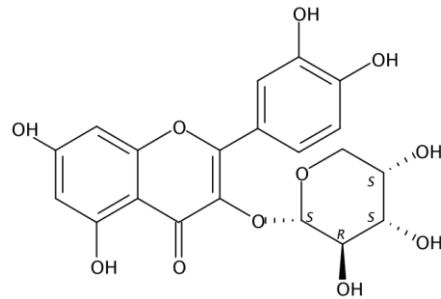
(gujaverin), kersetin 3-O- β -galaktopiranozit (hiperozit), kersetin 3-O- β -glukopiranozit (izokersetin), kersetin 3-O- β -D-glukuronit (mikuelianin) bileşikleri izole edilmiştir (Şekil 1.2.) (Trendafilova ve ark., 2012).



Kersetin-3-O- β -D-glukopiranozit (Mikuelianin)

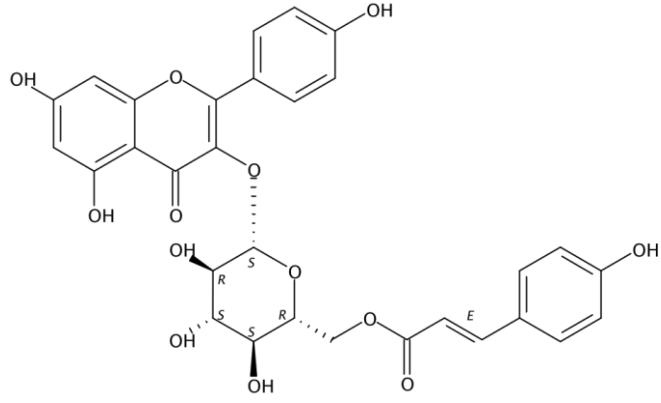


Kersetin-3-O- β -D-rutinozit (Rutin)

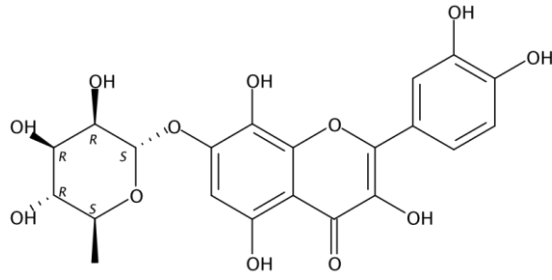


Kersetin-3-O- α -D-arabinofuranozit (Gujaverin)

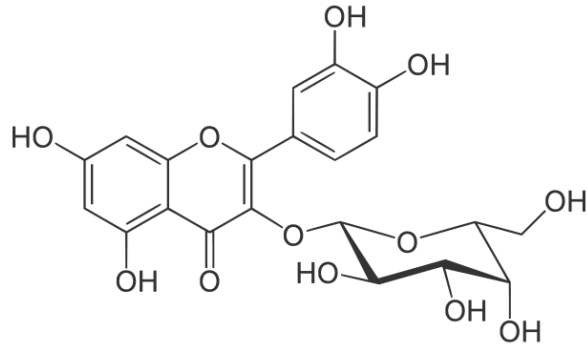
Şekil 1.2. *Alchemilla* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler



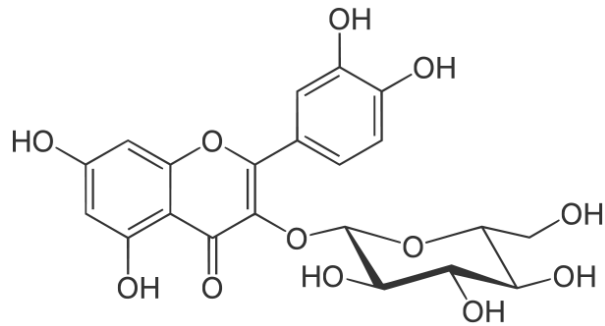
3-O-kemferol-6''-O-O-(*p*-kumaroil)-β-D-glukopiranozit (Tilirozit)



Rodioljin

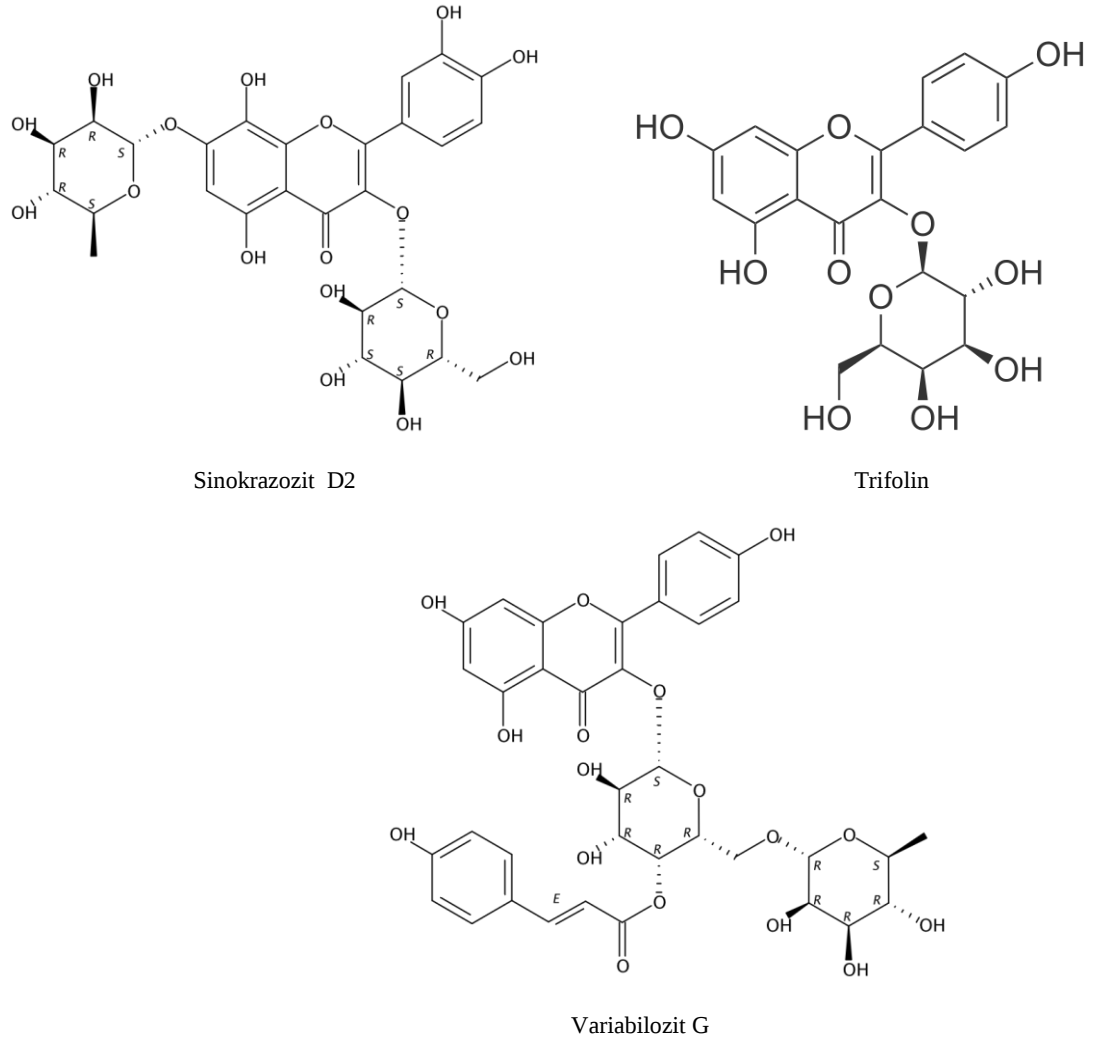


Hiperozit



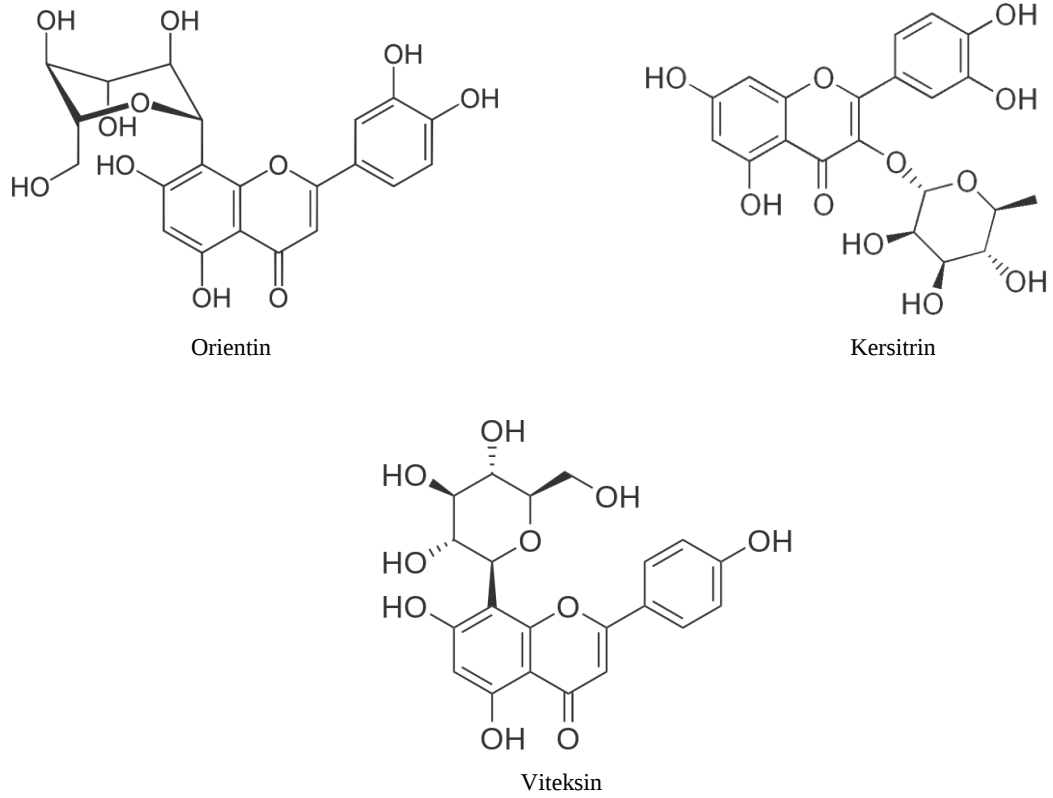
İzokersitrin

Şekil 1.2. *Alchemilla* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler



Şekil 1.2. *Alchemilla* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler

Kaya ve arkadaşları (2012a, 2012b) tarafından yapılan bir dizi YPSK ve ince tabaka kromatografisi (İTK) analizi sonucunda; farklı *Alchemilla* türlerinde luteolin-8-C-glikozit (orientin), apigenin-8-C-glikozit (viteksin), kersetin-3-O-rutinozit (rutin), kersetin-3-O-galaktozit (hiperozit), kersetin-3-O-glukopiranozit (izokersetin), kersetin-3-O-ramnozit (kersitrin) bileşikleri tespit edilmiştir (Şekil 1.2., Şekil 1.3.) (Çizelge 1.1.).



Şekil 1.3. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen bazı flavonoitler

Çizelge 1.1. *Alchemilla* türlerinde YPSK analizi ile tespit edilen flavonozitler

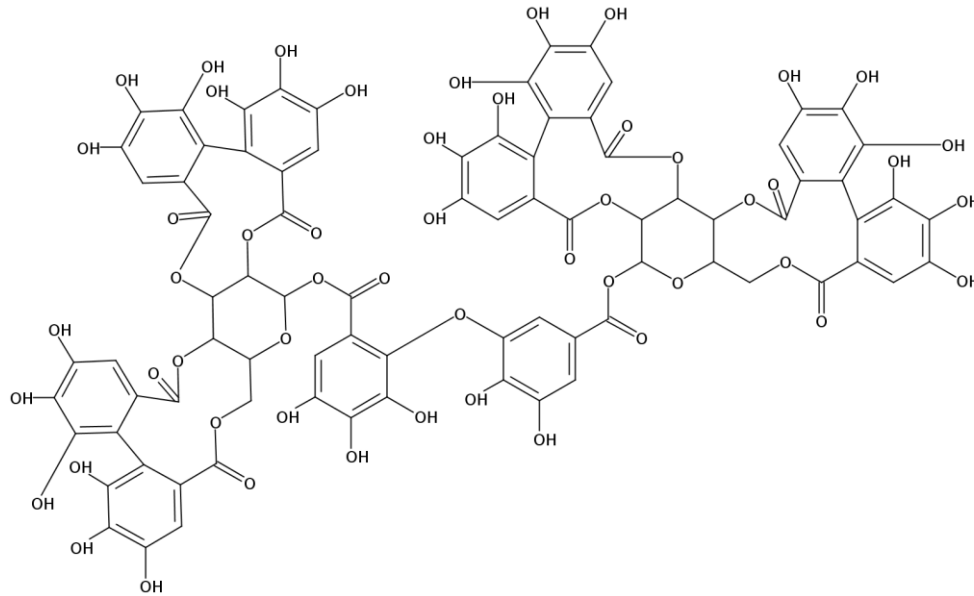
	Orientin	Viteksin	Rutin	Hiperozit	İzokersetin	Kersitrin
<i>A.procerrima</i> Fröhner	+			+		
<i>A.stricta</i> Rothm.	+	+			+	+
<i>A.armeniaca</i> Rothm.	+	+		+		
<i>A.ciminensis</i> B.Pawl.	+		+	+	+	
<i>A.orduensis</i> B.Pawl.	+			+	+	
<i>A.ikizdereensis</i> Kahl.	+	+	+	+		
<i>A.hirsutiflora</i> (Buser) Rothm.	+		+	+		+
<i>A.erzincanensis</i> B.Pawl.		+			+	
<i>A.orduensis</i> B.Pawl.		+	+			+
<i>A.orituncica</i> B.Pawl.			+	+	+	
<i>A.bursensis</i> B.Pawl.			+	+	+	+

A.mollis ve *A.persica* Rothm. 'nın toprak üstü kısımlarının metanol-sulu ekstreleri üzerinde YPSK ile hiperozit ve izokersetin miktar tayininin yapıldığı bir çalışmada; LOD (Limit of detection-teşhis sınırı) ve LOQ (Limit of quantification -tayin sınırı) değerleri sırasıyla hiperozit için $3,16 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ ve $5,49 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$; izokersetin

için $9,16 \pm 0,36$ µg/ml ve $14,76 \pm 0,27$ µg/ml olarak tespit edilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda ise *A.mollis*'te hiperozit ve izorkersetin miktarları sırasıyla $0,236 \pm 0,002$ ve $0,622 \pm 0,003$ mg/g; *A.persica*'da ise $0,223 \pm 0,001$ ve $0,534 \pm 0,001$ mg/g olarak bulunmuştur (Küpeli ve ark., 2015).

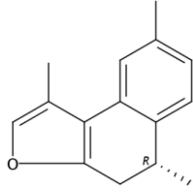
1.2.1.3. Tanenler

A. vulgaris'in tanen içeriğinin Avrupa Farmakopesi ve ESCOP monograflarında pirogallol üzerinden hesaplanmak üzere en az % 6.0 olması gerektiği rapor edilmiştir (Avrupa Farmakopesi, 2007; ESCOP Monographs, 2013). Özellikle elajitanenler (% 5-8); agrimonin (% 3.5-3.8), levigatin F (% 0.9), pedunkulagin (%1.2) bulunmaktadır (ESCOP Monographs, 2013; Wichtl, 2004). Ayrıca monomerik ve oligomerik elajitanenler; sanguin H-10, kastalagin/veskalagin, galloil bis hekzahidroksidifenoil heksoz ve gallik asit varlığı *A. mollis* ve *A. vulgaris* toprak üstü kısımlarında LC-KS/KS ile tespit edilmiştir (Şekil 1.4.) (Duckstein ve ark., 2012)

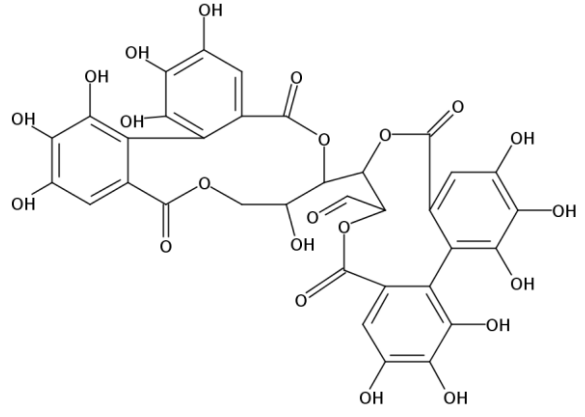


Agrimoniin

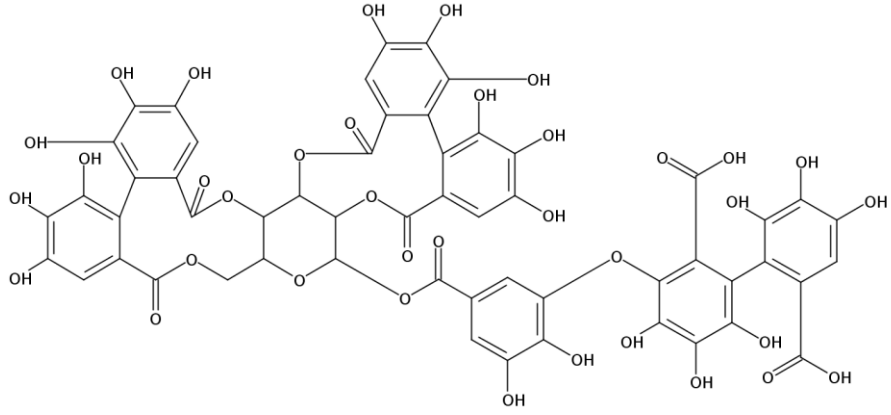
Şekil 1.4. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen bazı tanenler



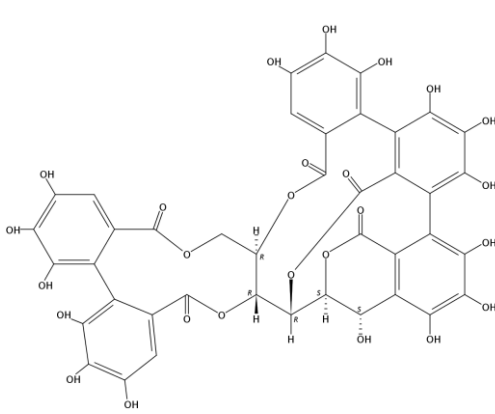
Levigatin



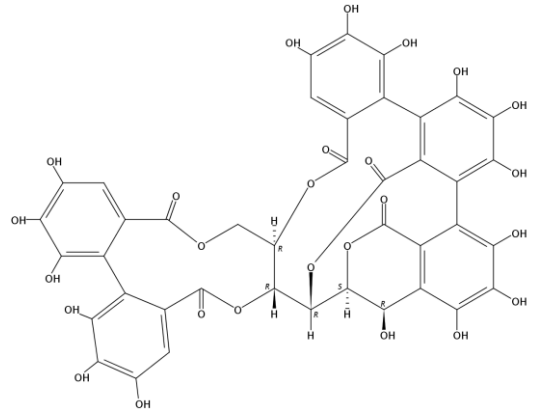
Pedunculagin



Sanguin



Kastalagin



Veskalagin

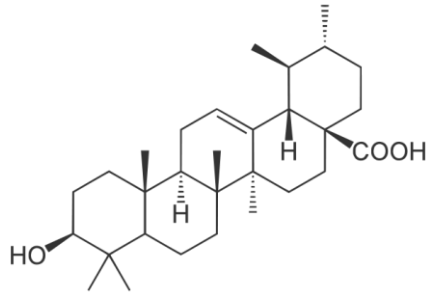
Şekil 1.4. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen bazı tanenler

Bitkisel drogların tanen içeriklerinin YPSK-KS ve spektrofotometriyle tayin edildiği fitokimyasal bir çalışmada *A.vulgaris*'in sulu ekstresinde gallik asit, elajik asit ve klorojenik asit saptanmıştır (Condrat ve ark., 2010; Moller ve ark., 2008).

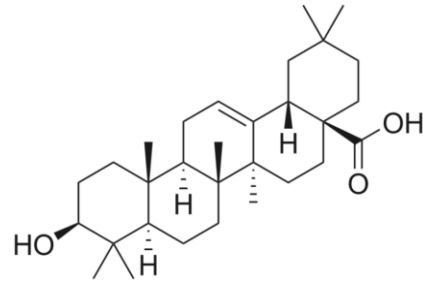
1.2.1.4. Terpenik Bileşikler

1.2.1.4.1. Triterpenler

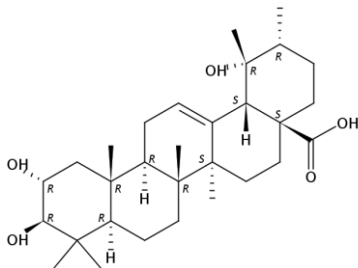
Bir çalışmada *A. faeroensis* bitkisinin toprak üstü kısımları petrol eteri ve etanolle ekstre edilmiş, etanolle ekstre silikajel kolona uygulanarak diklorometan:metanol ve metanol:su çözücü sistemleriyle elüsyon yapılmış, bitkiden ursolik asit, 2 α -hidroksiursolik asit, 2 α ,19 α -dihidroksiursolik asit (tormentik asit), 2 α ,3 α ,19 α -trihidroksiurs-12-en-28-oik asit (öskophik asit) ve oleanolik asit izole edilmiştir (Şekil 1.5.) (Olafsdottir ve ark., 2001).



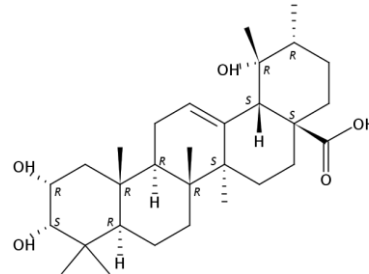
Ursolik asit



Oleanolik asit



Tormentik asit

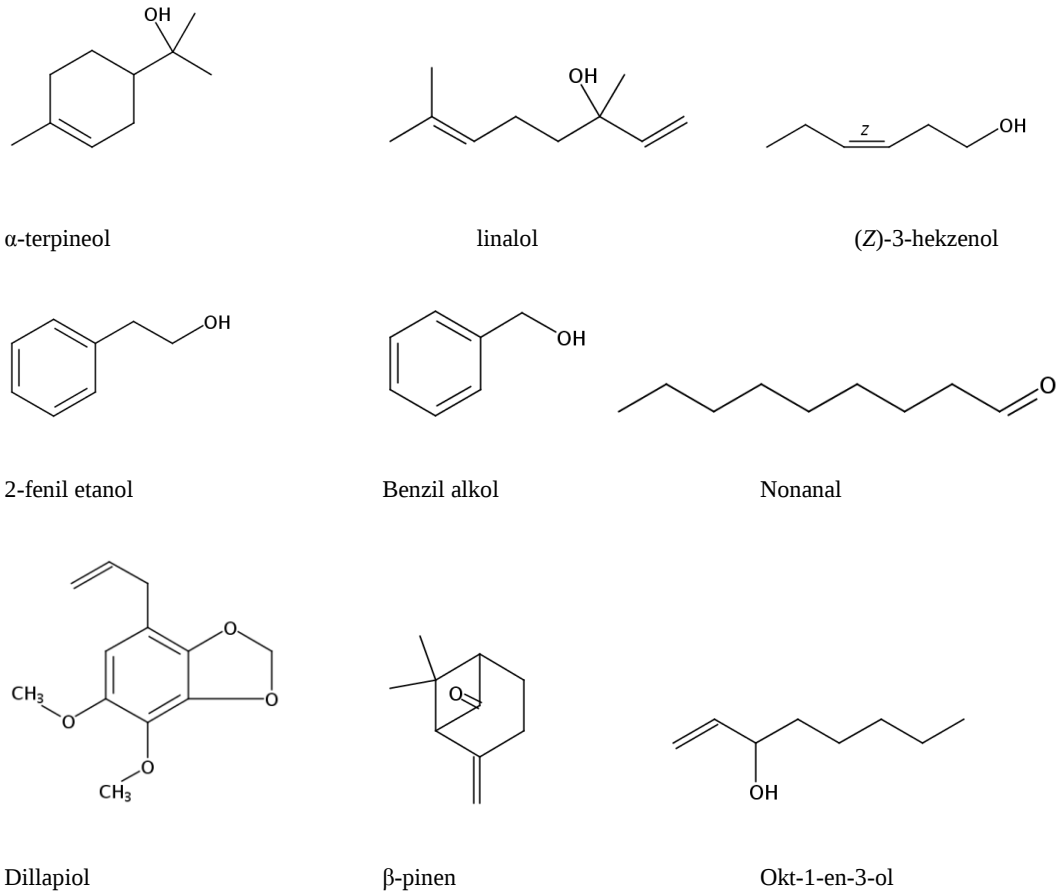


Öskophik asit

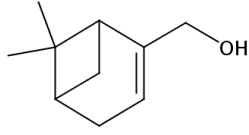
Şekil 1.5. *Alchemilla* türlerinden izole edilen bazı triterpenler

1.2.1.4.2. Uçucu Bileşikler

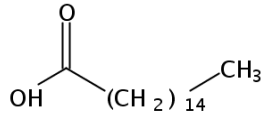
A.alpina L. em. Buser'nın toprak üstü kısımlarının uçucu yağ bileşiminin araştırılması amacıyla GK-FID (Gaz Kromatografisi-alev iyonizasyon dedektörü) ve GK-KS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) analizleri yapılmış ve bu analizler sonucunda bitkinin uçucu yağında major bileşenler olarak α -terpineol, linalol, (Z)-3-hekzenol, 2-feniletanol, benzil alkol, nonanal, dillapiol, β -pinen tespit edilmiştir (Falchero ve ark., 2008). Falchero ve arkadaşları (2009) tarafından *A. xanthochlora* Rothm. üzerinde yapılan bir başka GK-FID ve GK-KS analizi sonucunda ise uçucu yağ bileşiminde majör bileşen olarak cis-3-hekzenol, linalol, okt-1-en-3-ol, nonanal, mirtenol, hekzadekanoik asit, cis-3-hekzenil asetat ve α -terpineol bileşiklerine rastlanmıştır (Şekil 1.6.).



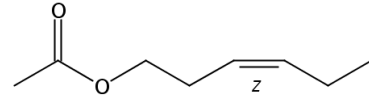
Şekil 1.6. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen bazı uçucu bileşikler



Mirtenol



Hekzadekanoik asit

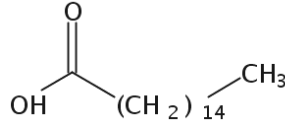


cis-3-hekzenil asetat

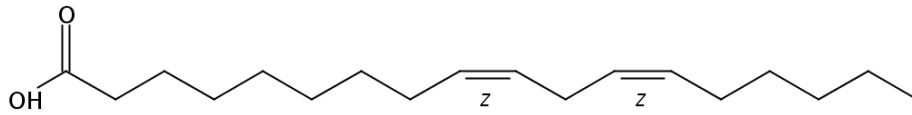
Şekil 1.6. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen bazı uçucu bileşikler

1.2.1.4.3.Yağ asitleri

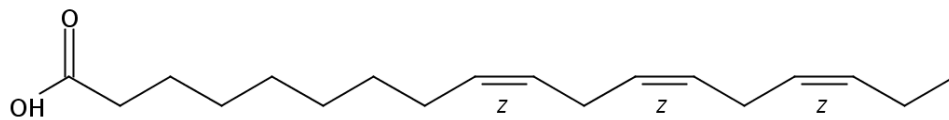
Kuzeydoğu Anadolu'da yetişen 23 *Alchemilla* L. türü üzerinde yapılan fitokimyasal bir çalışmada; bitki yaprakları kloroform-metanol ile ekstre edilmiş, sodyum kloritle hidrofilik kirlilikler uzaklaştırılarak GK analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucu bitkilerde tespit edilen yağ asitleri Çizelge 1.2.'de gösterilmiş ve C16:0 (palmitik asit), C18:2 (linoleik asit) ve C18:3 (α -linolenik asit) asitlerinin *Alchemilla* cinsi için taksonomik markörler olabileceği bildirilmiştir (Şekil 1.7.) (Ayaz ve ark., 1999).



Palmitik asit



Linoleik asit



α -linolenik asit

Şekil 1.7. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen bazı yağ asitleri

Çizelge 1.2. *Alchemilla* türlerinde tespit edilen yağ asitleri

	Yağ Asitleri											
Türler	C28:0	C26:0	C24:0	C22:0	C20:0	C18:2 + C18:3	C18:1	C18:0	C16:1	C16:0	C14:0	C12:0
<i>A.orthotrica</i> Rothm.	-	-	+	+	+	+	im	+	+	+	+	+
<i>A.erzincanensis</i> Pawl.	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>A.hirtinedicellata</i> Juz.	-	-	+	+	+	+	im	+	+	+	+	+
<i>A.mollis</i> (Buser) Rothm.	-	-	-	+	+	+	im	+	+	+	+	+
<i>A.persica</i> Rothm.	-	-	+	+	+	+	im	+	+	+	+	+
<i>A.oriturica</i> Pawl.	-	-	+	+	+	+	im	+	+	+	+	+
<i>A.sintenisii</i> Rothm.	-	-	+	+	+	+	im	+	+	+	+	+
<i>A.barbatiflora</i> Juz.	-	-	+	+	+	+	im	+	+	+	+	-
<i>A.cimilensis</i> Kahl.	+	+	+	+	+	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.hemsinica</i> Kahl.	-	+	+	+	+	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.norrecidens</i> Juz.	+	+	+	+	+	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.sericata</i> Reichb.	+	+	+	+	+	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.ervtronoda</i> Juz.	-	-	+	+	+	+	im	+	+	+	+	+
<i>A.lithophila</i> Juz.	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>A.rizensis</i> B.Pawl.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A.dura</i> Buser	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A.ancerensis</i> Kahl.	-	-	+	+	+	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.retinervis</i> Buser	-	-	-	-	-	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.valdehirsuta</i> Buser	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A.monitcola</i> Oniz	-	+	+	+	+	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.compactilis</i> Juz.	-	-	-	-	+	+	+	+	im	+	+	-
<i>A.daahestanica</i> Juz.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A.pseudocartalinica</i> Juz.	+	+	+	+	+	+	+	+	im	+	+	-

im= iz miktarda; 12:0= laurik asit, 14:0= miristik asit, 16:0= palmitik asit, 16:1= palmiteoleik asit, 18:0= stearik asit, 18:1= oleik asit, 18:2= linoleik asit, 18:3= α -linolenik asit, 20:0= araşidik asit, 22:0= behenik asit, 24:0= lignoserik asit, 26:0= serotik asit, 28:0= montanik asit (Ayaz ve ark., 1999).

1.2.1.5. Diğer Bileşikler

Batı Kafkasya'da endemik olarak yetişen *A.tredecimloba* L. yapraklarından aspartik asit, treonin, serin, glutamik asit, glisin, alanin, valin, metiyonin, izolösin, lösin, tirozin, fenilalanin, histidin, lisin, arjinin amino asitleri izole edilmiştir (Babayan ve Chelombitko, 2007).

A. vulgaris'in ayrıca saponozit, lesitin (Clair, 2009) ve manganez (II) içerdiği de tespit edilmiştir (Mutaftchiev ve Tzachev, 2003).

1.2.2. Biyoaktivite Çalışmaları

1.2.2.1. Anjiyoprotektif Aktivite

Arteriyel hipertansiyonlu sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada *A.vulgaris*'in flavonoidler üzerinden standardize edilmiş kuru ekstresi 10 gün süresince 300 mg/kg dozda uygulanmış ve eritrositler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bunun sonucunda ekstrenin eritrosit membranlarında lipit içeriğini arttırdığı ve fosfolipit miktarını normalize ettiği tespit edilmiştir (Plotnikov ve ark., 2006).

Flavon monoglikozitleri açısından zengin *A.vulgaris* ekstresinin anjiyoprotektif etkisinin araştırıldığı sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 30 ve 60 mg/kg dozlardaki ekstreler kardiyak korumayı sırasıyla %28 ve %30,1 oranında arttırmıştır (ESCOP, 2013).

Sıçan aort damarları üzerinde yapılan çalışmada *A.vulgaris*'in metanollü ekstresinin vasküler etkileri in vitro olarak araştırılmıştır. Ekstre 0,01-1mg/ml arasında doza

bağlı olarak noradrenalin ve potasyum kloritle uyarılmış rat aortunda vazorölaksan etkiyle rahatlama sağlamıştır. Metanollü *A. vulgaris* ekstresi ile 10mg/ml dozda yapılan tedavide kontraksiyonlar azalırken sulu ekstrede kasılmaların arttığı görülmüştür. Metanollü ekstrenin total flavonoit içeriğinin sulu ekstrede ise gallik asit içeriğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Etki, ekstrenin içerdiği flavonoit türevi bileşiklere bağlanmıştır. Metanollü ekstrenin vasküler endotel aracılı mekanizmalarla etkili olduğu düşünülmektedir (Takır ve ark.,2014).

Takır ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve potasyum klorit ile hipertansif hale getirilen sıçanlara 2 hafta boyunca günlük 300 mg/kg dozda *A.vulgaris* metanollü ve sulu ekstresi oral yolla verilmiş ve bu süre sonunda sıçanların mezenterik arterlerinde, ekstrelerin direkt etkileri karşılaştırılmıştır. Metanollü ekstrenin vazorölaksan etki nedeniyle artmış olan kan basıncını belirgin bir biçimde düşürdüğü gözlenmiştir. Metanollü ekstrenin mekanizmasının ortaya konması gerektiği, kardiyovasküler hastalıklarda ve genellikle hipertansif hastalıklarda kullanılabileceği öne sürülmüştür.

1.2.2.2. Antienflamatuar Aktivite

Silybum marianum, *Alchemilla vulgaris* , *Equisetum arvense*, *Glycine soja*, *Triticum vulgare*, *Medicago sativa*, *Raphanus sativus* içeren standardize ekstrenin elastaz enzim inhibisyonunun incelendiği çalışmada, ekstrenin domuz pankreatik elastaz ve insan lökosit elastaz inhibisyon değerleri sırasıyla %41 ve %50 olarak bulunmuştur (Benaiges ve ark., 1998).

A.vulgaris'in sulu-alkollü ekstresinin araşidonik asit metabolizması üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ekstrenin yaklaşık 0,52 mg/ml konsantrasyonda araşidonat 5-lipooksijenaz enzim inhibisyonu yaptığı bu nedenle de yüksek antienflamatuar etki gösterdiği bulunmuştur (Trouillas ve ark., 2003).

Liyofilize *A.vulgaris* ekstresi prostaglandin biyosentezi üzerinde inhibitör aktivitesi için test edilmiştir ancak etki tespit edilememiştir. Aynı ekstre nötrofillerde platelet aktive edici faktör (PAF) nedenli ekzositozu inhibe etmiştir (% 91 $\pm$ 4) (ESCOP, 2013).

Flavon monoglikoziti (0.16 mg/ml konsantrasyonda) içeren *A. vulgaris* fraksiyonu pankreatik elastaz enzim aktivitesini % 50 oranında inhibe etmiştir. Tripsin ve α -kimotripsin üzerinde gösterdiği inhibitör aktivite ise daha düşük bulunmuştur (Jonadet ve ark., 1986). *Alchemilla* çiçek ve yapraklarından hazırlanan etanollü (% 50) ekstre 25 μ g/ml dozda elastaz enzim aktivitesini % 94 oranında inhibe etmiştir (ESCOP, 2013).

Yumurta koriyo allantoik zarları üzerinde yapılan bir çalışmada *A.vulgaris*'in sulu etanollü ekstresi 500 μ g dozda membran irritasyonunu %91-%100 oranında inhibe etmiştir (ESCOP, 2013).

1.2.2.3. Antimikrobiyal Aktivite

A.vulgaris yapraklarının %10'luk sulu ekstresinin antimikrobiyal etkisi agar dilüsyon metoduyla test edilmiştir. MİK (Minimum inhibitör konsantrasyonu) değerleri *Staphylococcus warneri* 215 ve *Staphylococcus hominis* 214 suşları için 125 mg/ml, *S. hominis* 218 suşu için 750 mg/ml, *Yersinia enterocolitica* ve *Morganella morganii* için 1000 mg/ml, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* ve *S.hominis* 217 suşları için 1000 mg/ml'nin üzerinde bulunmuştur (Djipa ve ark., 2000).

Alchemilla pedata Hochst.x A.Rich.'nın %80 metanollü-sulu ekstresi sırasıyla petrol eteri, kloroform, aseton ve metanolle partitisyona tabii tutularak elde edilen fraksiyonların ve total ekstrenin antibakteriyel ve antifungal etkileri agar difüzyon

yöntemiyle ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 1.3.'te verilmiştir (Taddese ve ark., 2003).

Çizelge 1.3. mm'de inhibe edilen zon sayısı

Fraksiyonlar	Konsantrasyon (mg/ml)	Ec	Pa	Sa	Ca	Tm
Petrol eteri	25	32,0 (0,57)	25,0 (1,36)	35,0 (0,60)	38,0 (1,20)	38,0 (1,92)
	5	-	16,0 (1,17)	25,0 (1,7)	24,0 (2,24)	15,0 (0,33)
Kloroform	25	-	-	19,0 (1,0)	21,5 (1,76)	-
	5	-	-	15,5 (0,76)	18,0 (0,60)	-
Aseton	25	15 (1,00)	20,0 (0,87)	21,0 (0,67)	25,0 (1,35)	22,0 (0,17)
	5	14 (0,67)	18,0 (0,58)	17,0 (0,33)	18,0 (0,44)	16,5 (0,76)
Metanol	25	-	16,5 (0,44)	19,0 (0,73)	20,0 (1,44)	14, (0,76)
	5	-	13,5 (0,50)	14,5 (0,58)	-	-
Total (%80 metanol)	25	15 (0,17)	17,5 (0,50)	22,0 (1,45)	20,0 (0,93)	15,0 (0,32)
	5	14 (0,17)	14,0 (0,17)	18,0 (0,29)	15,5 (0,67)	13,5 (0,74)

Ec: *Escherichia coli*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Ca: *Candida albicans*; Tm: *Trichophyton mentagrophytes* (Taddese ve ark., 2003)

A.rizeensis bitkisinin çiçek, tohum ve toprak üstü kısımları metanolle ekstre edilmiş, elde edilen ekstre kloroform ve suyla partisyona tabi tutularak antimikrobiyal aktiviteleri agar dilüsyon yöntemiyle tayin edilmiştir. Çizelge 1.4.'te antimikrobiyal aktivite test sonuçları verilmiştir (Buruk ve ark., 2006)

Çizelge 1.4. *Alchemilla rizeensis* ekstrelerinin MIC değerleri. Ç: çiçek, T: tohum, TÜ: topraküstü kısım, S-: Suda çözünmeyen kısım, S+:suda çözünen kısım (Buruk ve ark., 2006)

	Ç+T(S-)	Ç+T(S+)	TÜ (S-)	TÜ (S+)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,312	>1000	-	0,625
<i>Branhamella catarrharis</i>	>1000	0,312	-	0,312
<i>Bacillus subtilis</i>	-	>1000	-	>1000
<i>Helicobacter pylori</i>	>1000	0,625	-	0,078
<i>Candida albicans</i>	-	-	--	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	0,625	<1000	<1000	0,625

Ç: çiçek, T: tohum, TÜ: topraküstü kısım, S-: Suda çözünmeyen kısım, S+:suda çözünen kısım (Buruk ve ark., 2006)

Keshavarzi ve Hesami (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *A.vulgaris*'in etanollü ekstresinin *Candida albicans* ve *Malassezia furfur* kültürleri üzerindeki etkileri test edildiğinde ekstrenin MIK değeri *C.albicans* için 2,5 mg/ml, *M.furfur* için ise 5 mg/ml olarak bulunmuştur.

Bir çalışmada *Alchemilla glabra* Neyg'nın asetonlu ekstesinin antimikrobiyal etkinliği agar difüzyon tekniğiyle araştırılmış; test edilen mikroorganizmalarda MIK_{50} değerleri, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P için 2,5; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 için 0,25; *Proteus vulgaris* G için 0,1; *Klebsiella pneumoniae* için 25 olarak bulunmuştur (Denev ve ark., 2014).

Alchemilla glabra, *Alchemilla monticola* Opiz, *Alchemilla fissa* Günther & Schummel ve *Alchemilla viridiflora* Rothm.'nın *Helicobacter pylori* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada bitkilerin toprak üstü kısımları sikloheksan, diklorometan ve metanolla ekstre edilerek bakteri suşları üzerinde test edilmiştir. Metanol ekstrelerinin diğer ekstrelerle göre daha etkili olduğu ve bu ekstrelerin MIK değerlerinin sırasıyla 4-32 $\mu\text{g/ml}$; 4-16 $\mu\text{g/ml}$; 4-32 $\mu\text{g/ml}$; 4-32 $\mu\text{g/ml}$ aralıklarında olduğu saptanmıştır. Bu etki metanol ekstrelerindeki elajik asit ve kersetin-3-O- β -glukozite bağlanmıştır (Krivokuca ve ark., 2015).

A.mollis'in sulu ve etanollü ekstreleri hazırlanmış ve H1N1, H3N2 ve H5N2 influenza virüslerine etkileri tavuk kırmızı kan hücreleri üzerinde hemaglutinasyon testi kullanılarak incelenmiştir. Ekstrelerin her üç virüs partikülüyle de doğrudan etkileşerek infektivitesini baskıladığı, virüslerin hemaglutinasyon yeteneğini inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı çalışmada *A.mollis* ekstresinin ticari antiviral bir ilaç olan zanamavirle kombinasyonu test edilmiş, bu kombinasyonun virüs replikasyonu üzerinde sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Makau ve ark.,2013).

1.2.2.4. Antioksidan Aktivite

A. vulgaris (0.5g/100 ml) sulu ekstresinin 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikal dekolorizasyonu yöntemi ile ölçülen antioksidan aktivitesi, trolox ekivalan olarak, 4.79 ± 0.14 mM bulunmuştur (Kiselova ve ark., 2006). Benzer bir çalışmada bitkinin metanollü ekstresinin de antioksidan aktivitesi

tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitenin polifenolik içerik ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir (Kiselova ve ark., 2011).

A. vulgaris etanollü ekstresinin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikaline karşı süpürücü etkisinin test edildiği bir çalışmada antioksidan etki mol kersetin eşdeğeri olarak hesaplanmış ve $4,97 \pm 0,14$ (*1000) olarak bulunmuştur. Bu etki ekstrenin içerdiği flavonoitlere bağlanmıştır (Condrat ve ark, 2009).

A.vulgaris'in %50 etanol ile hazırlanan ekstresinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) nedenli sitotoksisiteyi ($47,0 \pm \%3$) ve DNA hasarını inhibe ederek ($37,2 \pm \%3,6$) antioksidan etki gösterdiği, DPPH radikalini süpürücü ($\%71,8 \pm 4,1$) ve demir iyonu indirgeyici ($84,6 \pm 3,8$) antioksidan aktivite testlerinde, etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bitkiden hazırlanan sulu etanollü ekstrenin plazmid DNA'yı oksidatif hasardan koruması, H_2O_2 ve menadionun *Escherichia coli* de antioksidan gen uyarımı ile araştırılmıştır. Ekstre uygulandığı ortamda *E.coli* gelişiminin H_2O_2 ve menadionun sebep olduğu oksidatif stresten daha az etkilendiği, ayrıca ekstrenin antioksidan gen uyarımını da arttırdığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda H_2O_2 nedenli sitotoksisitenin $\%47 \pm 3$ oranında ; H_2O_2 kaynaklı DNA hasarının ise $\%37,2 \pm 3,6$ oranında inhibe edildiği tespit edilmiştir. Flavonoitlerden daha çok tanen içeriğinin antioksidan aktivite ile korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Oktyabrsky ve ark., 2009).

A. persica'nın toprak üstü kısımlarının ve köklerinin antioksidan aktiviteleri hazırlanan sulu-metanollü ekstrelerinin DPPH radikalini süpürücü etkisi ve malondialdehit (MDA) seviyesi üzerine etkisi test edilerek araştırılmıştır. DPPH radikal süpürücü aktivite toprak üstü kısımlar için 0.055 mg/ml, kökler için ise 0,051 mg/ml bulunmuştur. TBARS (Tiyobarbütirik asit reaktif ürünleri) testinde ise MDA seviyesi toprak üstü kısımlar için 5,9 nmol/ml, kökler için ise 19,08 nmol/ml olarak ölçülmüştür. Her iki deney değerlendirildiğinde bitkinin toprak üstü kısımlarının köklerinden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Ergene ve ark., 2010).

A.vulgaris'in 2mg/ml konsantrasyonda hazırlanan sulu ve etanollü ekstrelerinin lipid peroksidasyonu inhibe etme yetenekleri ölçülmüştür. Etanollü ekstrede inhibisyon görülmemiş, sulu ekstrede ise 10, 30, 40 µl dozlarda, doza bağlı bir aktivite gözlenmiştir (ESCOP, 2013).

A.glabra Neyg. toprak üstü kısımları sulu-asetonlu ekstresinin antioksidan aktivitesi ORAC (Oksijen radikali absorbans kapasitesi), TRAP (Tartarat rezistan asit fosfataz) ve HORAC (Hidroksil radikali engelleme kapasitesi) yöntemleriyle test edilmiş ve aktivitesi sırasıyla 1337±85 µmol troloks ekivalanı/g , 1815±38 µmol troloks ekivalanı/g , 1999±70 µmol gallik asit ekivalanı/g olarak bulunmuştur. Bunların yanında ekstrenin lipid peroksidasyonu inhibe ettiği de görülmüştür (Denev ve ark., 2014).

Farklı lokalitelerden toplanan *Alchemilla bulgarica* Rothm., *Alchemilla viridiflora* Rothm., *Alchemilla erythropoda* Juz., *Alchemilla monticola* Opiz, *Alchemilla crinita* Buser, *Alchemilla gracilis* Opiz, *Alchemilla glabra*, *Alchemilla subcrenata* Buser, *Alchemilla glaucescens* Wallr., *Alchemilla vulgaris*, *Alchemilla obtusa* Buser, *Alchemilla cinerea* Buser, *Alchemilla mollis* toprak üstü kısımlarının sulu-metanollü ekstreleri hazırlanarak fenolik madde miktar tayini ve antioksidan aktivite çalışmaları yapılmıştır. Tespit edilen en düşük ve en yüksek fenolik madde miktarları ile DPPH radikali süpürücü aktiviteleri IC₅₀ değeri olarak Çizelge 1.5'te verilmiştir. Veriler değerlendirildiğinde bitkilerdeki total fenolik madde ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğu açıklanmıştır (Vitkova ve ark., 2015).

1.2.2.5. Antitümör ve Sitotoksik Aktivite

Fare melanoma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada *A.vulgaris* sulu-alkollü ekstresinin yüksek konsantrasyonlarda (0,5 mg/ml'den fazla) deri tümörleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (Trouillas ve ark., 2003).

Malign nöroblastoma hücrelerinde doza bağımlı tümorisidal aktivitenin incelendiği çalışmada *A. vulgaris* ekstresi 1.766 mg/ml LC₅₀ değeri ile orta derecede aktif bulunmuştur (Mazzio ve Soliman, 2009).

Çizelge 1.5. *Alchemilla* türlerinin fenolik madde miktarları (mg GAE(Gallik asit eşdeğeri)/g ekstre) ve antioksidan aktiviteleri (IC₅₀)

	Max. total fenolik madde (mg GAE/ g ekstre)	Min. total fenolik madde (mg GAE/ g ekstre)	Max. IC ₅₀ (mg/ml)	Min. IC ₅₀ (mg/ml)
<i>A.bulgarica</i>	47,53±1,76	33,75±1,90	47,83	34,03
<i>A. viridiflora</i>	64,85±2,61	37,84±0,76	33,85	23,33
<i>A.erythropoda</i>	71,88±2,32	33,75±1,90	47,83	17,46
<i>A. monticola</i>	64,85±2,61	33,75±1,90	47,83	17,46
<i>A. crinita</i>	62,21±1,57	36,47±0,42	35,41	17,46
<i>A. gracilis</i>	44,45±2,13	44,45±2,13	33,53	33,53
<i>A. glabra</i>	82,71±0,36	33,75±1,90	47,83	15,57
<i>A.subcrenata</i>	71,88±2,32	44,45±2,13	47,74	16,03
<i>A. glaucescens</i>	71,88±2,32	37,84±0,76	47,74	16,03
<i>A. vulgaris</i>	71,88±2,32	44,45±2,13	42,57	16,03
<i>A. obtusa</i>	72,27±2,49	37,84±0,76	38,07	13,08
<i>A. cinerea</i>	36,55±3,45	36,47±0,42	35,41	35,22
<i>A. mollis</i>	67,12±0,13	67,12±0,13	17,85	17,85

A.erythropoda, *A.ikizdereensis*, *A.oriturcica*, *A.trabzonica* yapraklarının sulu alkollü ekstrelerinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Çizelge 1.6.'daki sonuçlar elde edilmiştir (Türk ve ark., 2011).

Çizelge 1.6. *Alchemilla* ekstrelerinin apoptotik ve nekrotik etkileri.

Ekstre mg/ml	Apoptotik indeks (%)				Nekrotik indeks (%)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	2±1
50	2±1	3±1	5±1	5±1	2±1	2±1	3±1	4±1
100	4±1	6±1	7±1	10±1	3±1	5±1	5±1	9±1
150	10±1	8±1	12±1	16±2	4±1	8±1	12±1	17±2
200	12±1	9±1	14±2	24±2	6±2	10±3	18±2	25±2

I: *A.erythropoda*, II: *A.ikizdereensis*, III: *A.oriturcica*, IV: *A.trabzonica*

1.2.2.6. Kadın Hastalıkları Üzerine Etki

Endometriyozis modeli oluşturulmuş sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, *A. mollis* ve *A. persica* 'nın toprak üstü kısım ve köklerinin sulu-metanollü ekstreleri 100 mg/kg dozda verilmiş; *A.persica* toprak üstü kısmının endometriyomu azalttığı, *A.mollis* toprak üstü kısımlarının sistik formasyonu , yapışıklığı azalttığı, ayrıca TNF- α (Tumor necrosis factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) ve IL(interlökin)-6 seviyelerini *A. persica*'ya oranla daha etkin bir biçimde azalttığı bulunmuştur. Her iki türün; *A.mollis* ve *A.persica* toprak üstü kısımlarının endometriyozis tedavisinde faydalı olabileceği öne sürülmüştür (Kupeli Akkol ve ark., 2015).

Romanya'da 11-17 yaşları arasındaki bireylerde yapılan bir çalışmada, 341 kadın üzerinde *A.vulgaris*'in menstruasyon periyodundaki etkileri araştırılmıştır. Tanen içeriği % 5.8 ve flavonoit glikozitleri % 2.2 olarak ayarlanmış sıvı ekstrenin aşırı menstrual kanamayı azaltıcı etkisi incelenmiştir. Sıvı ekstre günde 50-60 damla dozda 3 veya 5 kez olacak şekilde verilmiş ve katılımcılar altı yıl boyunca gözlenmiştir. Menstruasyon periyodundan 10-15 gün öncesinde kullanıldığında aşırı kanama üç ila beş gün içerisinde durmuş, akış hızı düşmüştür (Tobyn ve ark., 2011).

1.2.2.7.Yara İyi Edici Etki

Ağız ülserli 4-44 yaşları arasında 48 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada hastalara *A.vulgaris*'in %3'lük gliserinli ekstresini içeren Aphtarine® preparatının günde 3 kez uygulaması sonrasında, rahatsızlık hissi ve tamamen iyileşme deneklerin %60,4'ünde 2 gün içinde, % 75'inde 3 gün içinde saptanmıştır, herhangi bir tedavi almayan hasta grubunda ise bu iyileşme 4-7 gün içerisinde gerçekleşmiştir. Aphtarine®GMP kurallarına uygun olarak üretilmiş, gliserin içerisinde % 3 *A. vulgaris* ekstresi taşımakta olan bir üründür. % 0.08 oranında tanen taşır ve tanen miktarının % 3.8'i

elajik asittir. Flavonoit içeriği ise % 0.02 kersetin, % 0.002 luteolin olarak YPSK ile belirlenmiştir. Yapılan bu klinik çalışmada Aphtarine® preparatı ile güvenli, iyi tolere edilebilen ve oldukça etkili bir tedavi sağlanmıştır.(Shrivastava ve John, 2006).

A. vulgaris'in % 3 gliserol içindeki sıvı ekstresinin *in vitro* olarak “Chang” karaciğer hücrelerinde “MDBK” Madin Darby Sığır Böbrek epitel hücrelerinde ve rat aortik miyofibroblast hücrelerinde hücre gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. MDBK, miyofibroblast ve karaciğer hücrelerinde hücre sayısında *A. vulgaris* % 0.1-1’lik ekstreleri ile sırasıyla % 21.3 ± 2.1 ; % 15.5 ± 2.25 ; % 10.6 ± 0.6 oranında artış tespit edilmiştir. Hücrelerde herhangi bir morfolojik değişiklik veya sitotoksosite gözlenmemiştir. Aynı çalışmada *A.vulgaris* toprak üstü kısımlarının %3'lük ekstresideri lezyonu oluşturulan sıçanlara topikal olarak uygulanmış ve Çizelge 1.7.'deki sonuçlar elde edilmiştir. *A. vulgaris* ekstresi ile tedavi edilen ratlarda gliserine göre daha erken iyileşme görülmüştür. Bu etki *A. vulgaris*’in epitelyum hücreler ve miyofibroblastlardaki promitotikaktivitesine bağlanmıştır(Shrivastava, 2007).

Çizelge 1.7.*A.vulgaris* ekstresi (%3)ile tedavi edilen lezyonların iyileşme üzerine etkisi

Tedavi	Ortalama lezyon çapı (mm)						
	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün	7. gün
Distile su	7,9±0,2	8,0±0,1	6,9±0,5	5,1±0,5	3,7±0,7	1,4±0,7	0,2±0,3
Gliserin	7,8±0,3	7,8±0,3	5,8±0,6	4,0±0,7	3,2±1,0	1,6±0,7	0,2±0,3
<i>A.vulgaris</i> %3	8,0±0,1	7,2±0,6	5,3±0,7	3,5±0,6	2,8±0,6	0,6±0,7	0,1±0,1

A.vulgaris'in tek başına ve 1:1 oranında *Mimosa tenuiflora* ekstresiyle karıştırılarak, %0,3-5 arasındaki konsantrasyonlarda, epitel ve fibroblast hücre gelişimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, %3 konsantrasyondaki *A.vulgaris* ekstresi epitel ve fibroblast hücrelerinin gelişiminde sırasıyla % $26,67 \pm 0,73$ ve % $10,35 \pm 1,22$ oranında etki göstermiştir. Bu değerler ekstre karışımında % 57.7 ± 0.54 ve % 43.09 ± 1.22 olarak bulunmuştur. Çalışmada %5 konsantrasyonda uygulanan ekstrelerin ise gözlenen aktivitede düşüşe sebep olduğu tespit edilmiştir (Shrivastava, 2011).

Paralel olarak yürütülen klinik bir çalışmada alt ekstremitelerinde derin yara veya yaralar olan erişkin hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada *A.vulgaris*'ten elde edilen

proantosiyanidin ekstresi (%1,5) gliserol ve bal ile karıştırılıp %3 konsantrasyonda hazırlanarak 6 hafta süre ile 52 hastaya uygulanmıştır. Plasebo kontrol grubu ile birlikte toplam 93 hasta ile yapılan çalışmada, deney sonunda yara yüzey alanı ve hacmindeki azalma ölçülmüş ve ekstrenin belirgin aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Shrivastava, 2011).

1.2.2.8. Diğer Aktiviteler

A. vulgaris tentürünün inkübe tavuk yumurtası koryoallantoik membranında anjiogenezi inhibe edici etkisi *in vitro* olarak test edilmiş ve etkili bulunmuştur. *A. vulgaris* tentüründen 10 µL veya liyofilize edildikten sonra 1 mL agaroz çözeltisi içinde uygulanmıştır. *A. vulgaris* herbasından % 43 etanol a/a kullanılarak hazırlanan tentür, agrimoniin, levigatin F ve pendunkulagin gibi bilinen elajitanenleri ve ayrıca flavonoidler, lökosiyanidinler ve kafeik asit türevleri gibi bileşikler de içermektedir. *Alchemilla vulgaris* tumor hastalıklarında, romatoid artiritte ve diğer kronik enflamatuvar hastalıklarda, psöriazis, retinopati ve periodontal enflamasyonlarda anjiyogenezi inhibe etmektedir. Tentürü kuru madde olarak 20 mg-2 g doz aralığında ayarlanmalıdır (Paper ve Franz, 1998).

A. vulgaris ekstresinin anksiyolitik etkisi, sekiz günlük tavuklara i.p. enjeksiyonla verilen sulu-alkollü ekstrenin sedasyon, formalin enjeksiyonu ile oluşturulan ağrı, endişe durumlarında meydana getirdiği değişikliklerin gözlenmesi ile araştırılmıştır. Tedavi sonucunda herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir (Sufka ve ark., 2001).

Arteriyel hipertansiyonlu ve kan viskozitesi artmış sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 10 gün süresince 300 mg/kg/gün flavonoidleri üzerinden standardize edilmiş *A.vulgaris* ekstresinin eritrosit yüzey morfolojisinde ve eritrosit membranlarının lipid kompozisyonunda olumlu etkileri olduğu, eritrositlerin deformasyonunu da düzelttiği tespit edilmiştir (Plotkinov ve ark., 2006).

A.xanthochlora'dan izole edilen elajitanenlerin taze insan kan hücrelerindeki astrenjan etkisi araştırılmış ve agrimoniin, pedunculagin ve laevigatin F en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Plotnikov ve ark., 2006).

A. vulgaris'ten hazırlanan polisakkarit taşıyan fraksiyon ile standardize insan plazması kullanılarak yapılan çalışmada, fraksiyonun 12.5 mg/ml dozda pıhtılaşmayı önlediği tespit edilmiştir (Pawlaczyk ve ark., 2009).

Alchemilla vulgaris, *Olea europaea* L., *Mentha longifolia* L. yaprakları ile *Cuminum cyminum* L. tohumlarından hazırlanan bitkisel karışımın 4 hafta süreyle verildiği tavuklarda belirgin bir kilo kaybı gözlenmiştir. Ayrıca bu bitkisel karışımın, sıçanların interskapular kahverengi adipoz dokularında termojenez meydana getirdiği tespit edilmiştir (Said ve ark., 2011).

Aynı karışım (*Alchemilla vulgaris*, *Olea europaea* L., *Mentha longifolia* L. yaprakları ile *Cuminum cyminum* L. tohumları) kilo ve vücut kütle indeksi üzerine etkisi için araştırılmıştır. Randomize, çift körlü, plasebo kontrollü çalışmada, bitkisel karışımın, haftada 0.75 kg kilo kaybı sağladığı tespit edilmiştir (Said ve ark. 2010). Aynı bitkisel karışımın kullanıldığı diğer bir çalışmada ise, benzer şekilde 3 ay boyunca haftada 1 kg kilo kaybı gözlenmiş ve preparatın deney grubunda bulunan şeker, kalp ve tansiyon hastası olan bireylerin ilaçlarıyla herhangi bir etkileşimi veya yan etkisi görülmemiştir (Said ve ark., 2011).

A. xanthochlora'nın sıcak su ile hazırlanan liyofilize ekstresi izole tavşan kolonunda antisekretuar etkisi için test edilmiş ancak belirgin bir etki tespit edilememiştir. *A. xanthochlora*'dan izole edilen elajitanenlerin astrenjan etkisi ise taze insan kanını hemoliz etme yeteneği ve metilen mavisine afinitesi belirlenmek suretiyle test edilmiştir. Agrimonin, pedunculagin ve levigatin F en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir (ESCOP, 2013).

İzole kobay barsağında spontan, asetilkolin veya baryum klorit nedenli kontraksiyonlarda *A. vulgaris*'in % 50 h/h metanollü ekstresi antispazmodik

aktivitesi için 800 µg/ml doza kadar test edilmiş ancak belirgin bir etki gözlenmemiştir (ESCOP, 2013).

A.vulgaris'in polifenol içeren fraksiyonunun tiroid bezi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, sıçanlar üzerinde bitkinin 10 mg/kg dozda tiroid hormonlarının sentezini stimule ettiği bulunmuştur (ESCOP, 2013).

A.vulgaris kuru yapraklarının ve dekoksasyonunun normal ve streptozotosin ile diyabetik hale getirilmiş farelerde glukoz homeostazı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bitkisel materyal diyetle, dekoksasyonu ise içecek su ile birlikte (1 g/400 ml su) verilmiştir. 12 günlük tedavi sonunda *Alchemilla* ile tedavide hiperfaji, polidipsi, kilo kaybı, hiperglisemi ve hipoinsülinemi gelişimde koruyucu bir etkinlik gözlenmemiştir (ESCOP, 2013).

Bir çalışmada *A.vulgaris*'in sulu ve metanollü ekstrelerinin içerdiği etken maddelerin asetilkolinesteraz (AChE) ve tirozinaz enzim inhibitörü etkileri araştırılmış, Çizelge 1.8. ve Çizelge 1.9.'da verilen sonuçlar elde edilmiştir (Neagu ve ark., 2015)

Çizelge 1.8. *A. vulgaris*'in AChE inhibitörü aktivitesi

Numune	AChE inhibisyonu (%)		
	3 mg/ml	1.5 mg/ml	0.75 mg/ml
<i>Alchemilla vulgaris</i> (sulu ekstre)	84,56±5,64	71,36±3,54	50,76±5,78
<i>Alchemilla vulgaris</i> (etanollü ekstre)	96,50±4,93	78,56±2,45	56,83±3,25
Elajik asit	75,61±1,32	60,28±5,36	
Kersetin	62,73±7,61	51,62±3,23	
Klorojenik asit	75,34±2,39	54,11±5,24	
Rutin	59,46±3,65	31,23±2,57	

Çizelge 1.9. *A. vulgaris*'in tirozinaz enzim inhibitörü aktivitesi

Numune	Tirozinaz inhibisyonu (%)		
	3 mg/ml	1.5 mg/ml	0.75 mg/ml
<i>Alchemilla vulgaris</i> (sulu ekstre)	60,00±2,78	53,21±6,78	39,21±5,29
<i>Alchemilla vulgaris</i> (etanollü ekstre)	71,55±4,39	59,12±2,51	45,12±4,26
Elajik asit	45,77±1,71	25,42±1,52	
Kersetin	62,60±3,65	33,45±2,59	
Klorojenik asit	58,09±2,31	41,45±2,83	
Rutin	47,23±6,54	32,30±1,37	

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bitkisel Materyal

Bu tezde çalışma materyali olarak Sivas, Sarıyar bölgesinden toplanan *A.mollis* ile Erzincan, Kop Geçidi'nden toplanan *A.persica*'nın toprak üstü kısımları ve kökleri kullanılmıştır. *A.mollis*, Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'ndan Yrd.Doç.Dr. Mehmet TEKİN; *A.persica*, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden Prof.Dr.Hayri DUMAN tarafından teşhis edilmiştir.*A.mollis* Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Herbaryum'unda CUFH 1344herbaryum numarası ile,*A.persica* ise Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryum'unda AEF 26731 herbaryum numarası ile muhafaza edilmektedir.

Bitkiler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde uygun koşullarda kurutulduktan sonra; *A.mollis*'in toprak üstü kısımları izolasyon çalışmalarında; *A.mollis* (Şekil 2.1.) ve *A.persica* (Şekil 2.2.)bitkilerinin toprak üstü kısımları ve kökleri farmakope analizlerinde kullanılmıştır.



Şekil 2.1. *A.mollis*'in doğadaki görünüşü



Şekil 2.2. *A.persica*'nın doğadaki görünüşü

2.2. Yöntem

2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

2.2.1.1. İzolasyon Çalışmaları

2.2.1.1.1. Ekstraksiyon Çalışmaları

A.mollis'in toprak üstü kısımları uygun koşullarda kurutulup toz edildikten sonra 995,96 g tartılarak metanol:su (80:20) çözücü sistemiyle 24 saat boyunca oda sıcaklığında masere edildi ve ardından 30 dk ultrasonik banyoda karıştırılarak pilili süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen ekstre rotavaporda düşük basınçta 40 °C'yi geçmeyecek sıcaklıkta yoğunlaştırıldı ve kalan ekstre liyofilize edilerek suyundan kurtarıldı.

Elde edilen liyofilizeekstre suyla disperse edildi ve ayırma hunisinde sıvı sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu. Sırasıyla önce petrol eteriyle, ardından kloroform ve en son etilasetat ile sıvı sıvı fraksiyonlama yapıldı. Her bir fraksiyon rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı. Kalan sulu faz ise liyofilize ederek kurutuldu.

2.2.1.1.2. Kromatografi Çalışmaları

2.2.1.1.2.1. Silikajel Kolon Uygulamaları

Sıvı-sıvı ekstraksiyon ile elde edilen petrol eteri, kloroform, etilasetat ve sulu fraksiyonları İTK ile kontrol edildi. Plaklar üzerinde UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm'lerde

gözlenen lekeler değerlendirilerek etilasetatlı fraksiyonun izolasyon çalışmalarında kullanılmasına karar verildi ve silikajel ile hazırlanan kolona uygulandı. Kolon hazırlanmasında silikajel 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm, Merck ASTM) 400 g tartıldı ve etilasetat ile karıştırılarak 6x80 cm büyüklüğünde kolona dolduruldu. Etilasetatlı ekstre (21,4730 g) aynı ağırlıktaki silikajel ile karıştırılarak kurutuldu ve kolona kuru halde tatbik edildi. Elüsyon işlemi için etilasetat : metanol : su (100:13,5:10) çözücü karışımı kullanıldı. Fraksiyonlar 100 ml'lik hacimlerde toplandı (EKB fraksiyonları). Kolonu yıkamak amacıyla metanol kullanıldı. Elde edilen fraksiyonlar İTK ile UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm'de ayrıca vanilin-H₂SO₄ (Sülfirik asit) reaktifi ile muamele edildikten sonra kontrol edildi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi.

2.2.1.1.2.2.Sefadeks Kolon Uygulamaları

Sefadeks LH-20 (25-100 µm, Sigma-Aldrich) üzerini örtecek kadar metanol içerisinde 30 dk bırakılıp şişmesi sağlandı. Daha sonra 3,5 cm çapında, 60 cm uzunluğunda cam kolona dolduruldu. Musluktan metanol geçirilerek bir süre akış sağlandı. Kolon bir süre bekletildi ve sefadeksin oturması sağlandı. EKB14-16 (1,3943 g) ve EKB17-18 (0,4771 g) numaralı fraksiyonlar metanolde çözülerek kolona ayrı ayrı uygulandı. Her iki fraksiyonun elüsyonu için de metanol kullanıldı ve 10 ml hacimde alt fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlar silika jel 60 RP-18 F_{254S} kaplı hazır plaklar (Merck, 1.05559) kullanılarak İTK ile kontrol edildi. Aynı zamanda fraksiyonların YPSK analizleri yapıldı. Kromatogramlar ve İTK plakları karşılaştırıldı, benzer fraksiyonlar birleştirildi.

2.2.1.1.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi

Sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonlar, izolasyona devam edilecek fraksiyonu belirlemek ve kolon kromatografisi için uygun çözücü sistemini saptamak amacıyla Çizelge 2.1.'de belirtilen çözücü sistemleri kullanılarak silikajel 60

F₂₅₄(Merck, 1.05554) vesilika jel 60 RP-18 F_{254S} (Merck, 1.05559) kaplı hazır plaklar üzerinde incelendi.

Silikajel kolondan toplanan fraksiyonların İTK analizleri silikajel 60 normal faz plaklar (Merck, 1.05554) üzerinde etilasetat : metanol : su (80:13,5:10) çözücü sistemi ve silikajel 60 ters faz plaklar (Merck, 1.05559) üzerinde metanol:su (1:1) çözücü sistemi kullanılarak incelendi. Plaklar vanilin-sülfirik asit reaktifıyla muamele edilerek 110 °C'lik etüvde bekletildi ve lekeler tespit edildi.

Çizelge 2.1. Ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların incelenmesinde kullanılan çözücü sistemleri

Hekzan:metanol:etilasetat (3:5:7)
Hekzan:etilasetat:metanol (2:8:2)
Hekzan:etilasetat:metanol (3:7:3)
Hekzan:etilasetat (6:4)
Diklorometan:metanol (8:2)
Kloroform:metanol:su (64:50:10)
Hekzan:kloroform (8:2)
Etilasetat:metanol:su (50:13,5:10)
Etilasetat:metanol:su (70:13,5:10)
Etilasetat:metanol:su (80:13,5:10)
Etilasetat:metanol:su (100:13,5:10)
Metanol:su (5:5)

EKB14-16 ve EKB17-18 fraksiyonlarının uygulandığı sephadex kolonlardan elde edilen fraksiyonların İTK analizleri ters faz plaklar (Merck, 1.05559) üzerinde metanol:su (1:1) çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirildi

2.2.1.1.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analizleri

Kolon kromatografisi sonucunda toplanan ve birleştirilen fraksiyonlar ile izole edilen maddelerin YPSK analizleri yapıldı. Analizlerde Çizelge 2.2.'de verilen akış sistemi ve aşağıda verilen analiz koşulları kullanıldı.

YPSK Sistemi	: Agilent 1260 G1315 DAD
Kolon	: ACE 5, C18, (250 x 4,6 mm; 5 µm partikül büyüklüğü)
Hareketli Faz A	: %0,2 fosforik asit içeren su
Hareketli Faz B	: Asetonitril
Akış Tipi	: Gradient elüsyon
Akış Hızı	: 1mL/dak
Sıcaklık	: 40°C
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µL
Dalga Boyu	: 254 nm, 210 nm

Çizelge 2.2.YPSK analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi

Zaman (dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış Hızı (mL/dak)
0	90	10	1
20	40	60	1
20,01	0	100	1
25	0	100	1

2.2.1.1.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini

İzole edilen bileşiklerin saflaştırılması preparatif İTK ve çöktürme işlemi ile yapıldı. Saflaştırılan bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle; KS, ¹H, ¹³C ve 2D NMR (HMBC) tayin edildi.

2.2.1.1.3.1.Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

Bileşiklerin dötometanol(MeOD) ve dimetilsülfoksit (DMSO-d6) içinde hazırlanan çözeltilerinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR ayrıca HMBC spektrumları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı II’de bulunan Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digi NMR Spektrometre cihazı kullanılarak alındı.

2.2.1.1.3.2. Kütle Spektroskopisi

İzole edilen bileşiklerin kütleleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı II'de bulunan Waters 2695 Allia Micromass ZQ marka LC/KS (Liquid chromatography- cihazı ile ölçüldü. Örnekler metanol içinde çözülüp, dilüe edildikten sonra aşağıda verilen şartlar altında 10 µL enjekte edilerek analizler yapıldı.

LC/KS Şartları

YPSK Sistemi	: Waters Alliance
Kolon	: C-18
Hareketli Faz A	: Metanol:Su (50:50)
Hareketli Faz B	: Asetonitril
Akış Hızı	: 0,5mL/dak
Sıcaklık	: 25°C
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µL

2.2.1.2. Farmakope Analizleri

2.2.1.2.1. Tanen Miktar Tayini

Tanen miktar tayini çalışmaları Avrupa Farmakopesi 6.0'daki "Determination of Tannins in Herbal Drugs" yöntemi esas alınarak yapıldı.

A.mollis ve *A.persica*'nın toprak üstü kısımları ile kökleri toz edildi. Her birinden 0,5 g tartılarak 150 ml su ile sıcak su banyosunda 30 dk ısıtıldı. Su ile 250 ml'ye tamamlanarak pileli süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 50 ml'si atıldı.

Ekstrelerden 5 ml alınarak suyla 25 ml'ye tamamlandı. Her birinden 2 ml alındı ve tüplere aktarıldı. Tüplere 1 ml fosfomolibdotungustik asit reaktifi (Sigma-Aldrich) ve 10 ml su eklendi. %29'luk sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Atabay) çözeltisi ile 25 ml 'ye tamamlandı. Ekstreler 30 dk bekletildikten sonra 760 nm'de köre karşı absorbansları ölçüldü.

Bitki ekstrelerinden 10'ar ml alınarak her biri 0,10 g deri tozuyla 60 dk boyunca çalkalandı. Pileli süzgeç kağıdından süzüldü ve süzüntülerden 5'er ml alınarak suyla 25 ml'ye tamamlandı. Çözeltilerin her birinden 2 ml alınarak 1 ml fosfomolibdotungustik asit (Sigma-Aldrich) ve 10 ml su eklendi. %29'luk Na_2CO_3 (Atabay) çözeltisi ile 25 ml'ye tamamlandı. 30 dk bekletilerek 760 nm'de köre karşı absorbansları ölçüldü.

Standart olarak kullanılan gallik asit 50 mg tartılarak 100 ml suda çözüldü ve farklı konsantrasyonlarda (0,5; 0,1; 0,05; 0,025 mg/ml) sulu çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinden 2 ml alınarak 1 ml fosfomolibdotungustik asit (Sigma-Aldrich) ve 10 ml su ile karıştırıldı. %29'luk Na_2CO_3 (Atabay)çözeltisiyle 25 ml'ye tamamlandı. 30 dk bekletilerek 760 nm'de köre karşı absorbansı ölçüldü.

Kör çözelti olarak su kullanıldı. Bütün çalışmalar karanlık ortamda yürütüldü.

Standart çözeltilerden elde edilen absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon eğrisi ve kalibrasyon denklemi oluşturdu. Ekstrelerin absorbans değerleri bu denklemde yerine yazılarak total polifenol miktarları hesaplandı. Aynı denklem kullanılarak deri tozu (Sigma-Aldrich) ile muamele edilen ekstrelerin absorbans değerlerine karşılık deri tozu ile adsorbe olmayan polifenol miktarları hesaplandı. Total polifenol miktarından deri tozu (Sigma-Aldrich) ile absorbe olamayan polifenol miktarı çıkartılarak bitkilerdeki tanen yüzdeleri hesaplandı.

2.2.1.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi Analizleri

Avrupa Farmakopesi 6.0 "ALCHEMILLA-Alchemillae herba" monografındaki analizler esas alınarak yapıldı.

A.mollis ve *A.persica* toprak üstü kısımları ile kökleri toz edilerek 0,5 g tartıldı ve 5 ml metanol eklendi. 70 °C sıcak su banyosunda 5 dk bekletildi. Soğutuldu ve pileli süzgeç kağıdından süzüldü.

Referans bileşik olarak kafeik asit ve klorojenik asit kullanıldı. 1 mg kafeik asit ve klorojenik asit 10 ml metanolde çözüldü.

Normal faz silikajel plaklar (Merck, 1.05554) ve susuz formik asit:su:etilasetat (8:8:84 v/v/v) çözücü sistemi kullanıldı.

Ekstreler ve referans çözeltiler aynı plak üzerinde 10 cm yürütüldü. Vanilin-sülfirik asit reaktifiyle muamele edildi. 110 °C'lik etüvde bekletildi ayrıca 366 nm dalga boyundaki ışık altında incelendi.

Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals (Wichtl, 2004) isimli eserde *A.vulgaris* için yapılan analizler esas alınarak İTK analizi yapıldı. *A.mollis* ile *A.persica*'nın toprak üstü kısım ve kökleri 1'er g tartılarak 5'er ml metanol ile 10'ar dk su banyosunda ısıtıldı, soğutularak süzüldü. Klorojenik asit, rutin ve hiperozit 5 mg tartılarak 5 ml metanol içerisinde çözüldü. Ekstreler ve referans maddeler normal faz silikajel plak (Merck, 1.05559) üzerinde etilasetat:susuz formik asit:su (80:8:12) çözücü sistemiyle 8 cm yürütüldü. Vanilin-sülfirik asit reaktifiyle muamele edildi. 110 °C'lik etüvde 10 dk bekletildi. 366 nm dalga boyundaki ışık altında incelendi.

2.2.1.3. Miktar Tayini Çalışmaları

Alchemilla türlerinin toprak üstü kısımları ve kökleri kateşin, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve izole edilen mikuelianin ile elajik asit içerikleri açısından kalitatif ve kantitatif olarak araştırıldı. Kantitatif tayin retansiyon zamanı ve UV spektrumları kıyaslanarak yapıldı. Kalitatif olarak varlığı tespit edilen kateşin, mikuelianin ve elajik asit analiz edildi.

A.mollis ve *A.persica*'nın toz edilmiş toprak üstü kısım ve köklerinden 0,5 g tartıldı, metanol:su (80:20) çözücü sisteminden 10 ml ilave edilerek ultrasonik banyoda 30 dk bekletildi. Hazırlanan ekstreler süzüldü ve eksilen hacim balonjojede 10 ml'ye metanol:su (80:20) karışımı ile tamamlandı. Her bir ekstre 0,45 µm filtrelerden süzülüp YPSK cihazında 3'er kez enjekte edildi.

Kateşin, mikuelianin ve elajik asit 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanarak 3'er kez enjekte edildi. Yapılan enjeksiyonlarda verilen konsantrasyonlara karşılık okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek doğru denklemi elde edildi. Elde edilen grafikte *Alchemilla* ekstrelerinde okunan pik alanları yerine konarak yapılan hesaplama sonucunda miktar tayinleri yapıldı. Miktar tayini yapılan her bir standart için LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü oranı sırasıyla 3 ve 10 olacak şekilde hesaplandı ve belirlenen konsantrasyonlarda her bir standart 6'şar kez YPSK cihazına enjekte edildi.

Miktar tayini YPSK analizlerinde aşağıdaki analiz koşulları ile Çizelge 2.3.'te verilen gradient akış sistemi kullanıldı.

YPSK Sistemi	: Agilent 1260 G1315 DAD
Kolon	: ACE 5, C-18, (250 x 4,6 mm; 5 µm partikül büyüklüğü)
Hareketli Faz A	: %0,2 fosforik asit içeren su
Hareketli Faz B	: Asetonitril
Akış Tipi	: Gradient Elüsyon

Akış Hızı : 0,5 mL/dak
Sıcaklık : 25°C
Enjeksiyon Hacmi : 10 µL
Dalga Boyu : 254 nm, 210 nm

Çizelge 2.3.YPSK miktar tayini analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi

Zaman (dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış Hızı (mL/dak)
0	92	8	0,5
20	85	15	0,5
40	75	25	0,5
50	50	50	0,5
55	0	100	0,5
60	0	100	0,5

2.2.2. Biyoaktivite Çalışmaları

2.2.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

A.mollis ve *A.persica*'nın toprak üstü kısımları ve köklerinin sulu-metanollü ekstraktları ile *A.mollis*'in toprak üstü kısımlarından izole edilen bileşikler mikuelianin ve elajik asit *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi ve *Candida albicans* ATCC 10231 suşu üzerindeki antifungal etkisi test edildi.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2013) ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) önerileri göz önüne alınarak ekstraktların ve maddelerin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi.

Ekstreler ve maddeler %20 DMSO içinde çözülerek azalan miktarda iki katlı dilüsyonları Mueller-Hinton Broth besiyeri içinde hazırlanmış (10 mg/ml-0,078 mg/ml aralığında) her bir kuyucuk eşit miktardaki 18-24 saatlik mikroroganizma kültürü ile inoküle edildi. Plaklar 35 ± 1 °C'de, 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreme görülmeyen son kuyucuğun konsantrasyonu MİK değeri olarak kaydedildi (mg/ml).

3. BULGULAR

3.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. İzolasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.1.1.1. Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Bulgular

A.mollis'in toprak üstü kısımları metanol:su (80:20) çözücü sistemiyle ekstraksiyona tabii tutuldu. Liyofilize edilerek suyundan kurtarılmasıyla 284,4801 g liyofilize ekstre elde edildi.

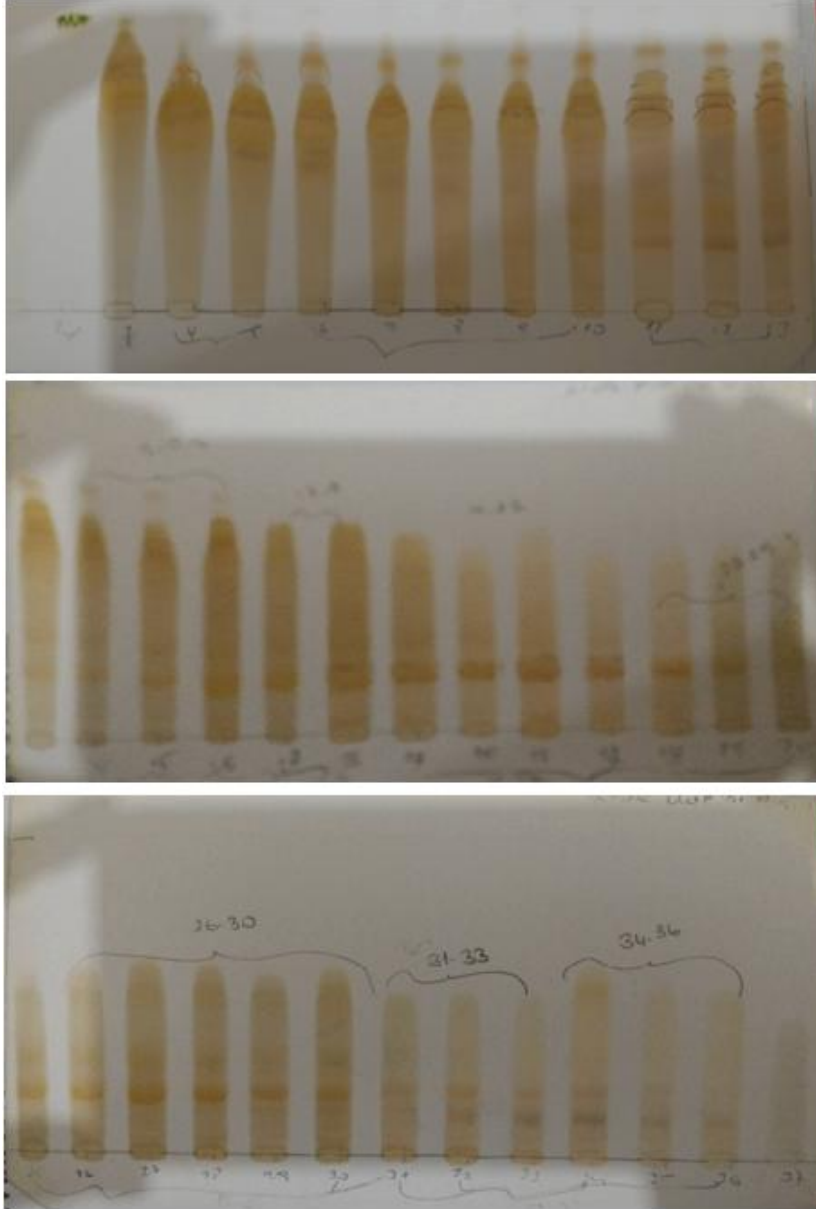
250,0566 g liyofilize ekstrenin sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonucunda 64,7894gr etilasetat; 15,0525 g kloroform ve 5, 4229 g petrol eteri fazı elde edildi.

3.1.1.2. Kromatografi Çalışmalarına Ait Bulgular

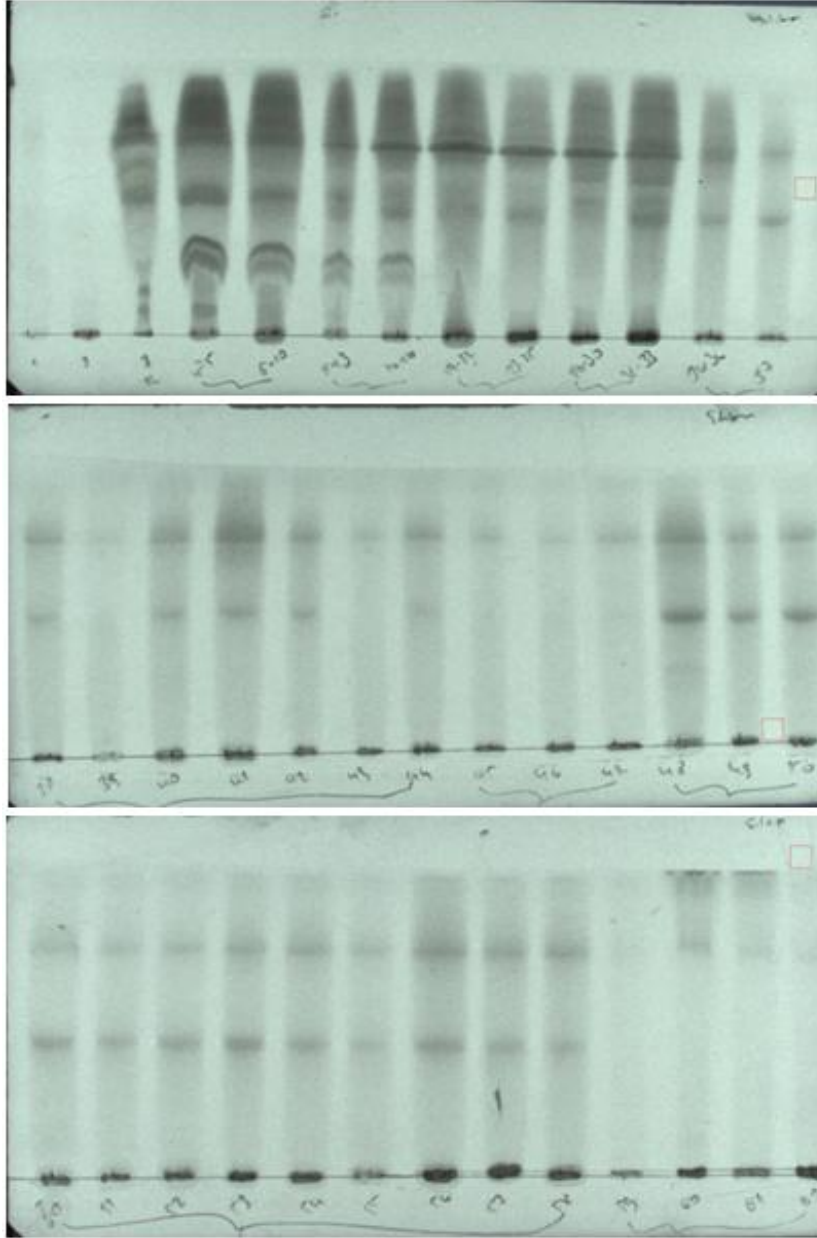
3.1.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisine Ait Bulgular

Sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucu elde edilen fazlar üzerinde izolasyona devam edilecek fazın belirlenmesi için İTK çalışmaları yapıldı. Plaklar üzerinde gözlenen lekeler ve madde miktarları da dikkate alınarak etilasetat fazıyla devam edilmesine karar verildi. Kolon kromatografisinde kullanılacak çözücü sistemi olarak bileşiklere ait lekelerde en iyi ayrım görülen etilasetat:metanol:su (100:13,5:10) seçildi.

Silikajel (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm, Merck ASTM) kolondan elde edilen fraksiyonların etilasetat:metanol:su (80:13,5:10) çözücü sistemiyle normal faz plaklarda (Merck, 1.05554) (Şekil 3.1.) ve metanol:su (1:1) çözücü sistemiyle ters faz plaklarda (Merck, 1.05559) (Şekil 3.2.) İTK analizleri yapıldı 254 nm ve 366 nm dalga boyunda UV ışık altında incelendi.



Şekil 3.1. Silikajel kolondan elde edilen fraksiyonların etilasetat : metanol : su (80:13,5:10) çözücü sistemiyle normal faz İTK uygulaması (Vanilin- H_2SO_4 reaktifi ile muamele edildikten sonra)

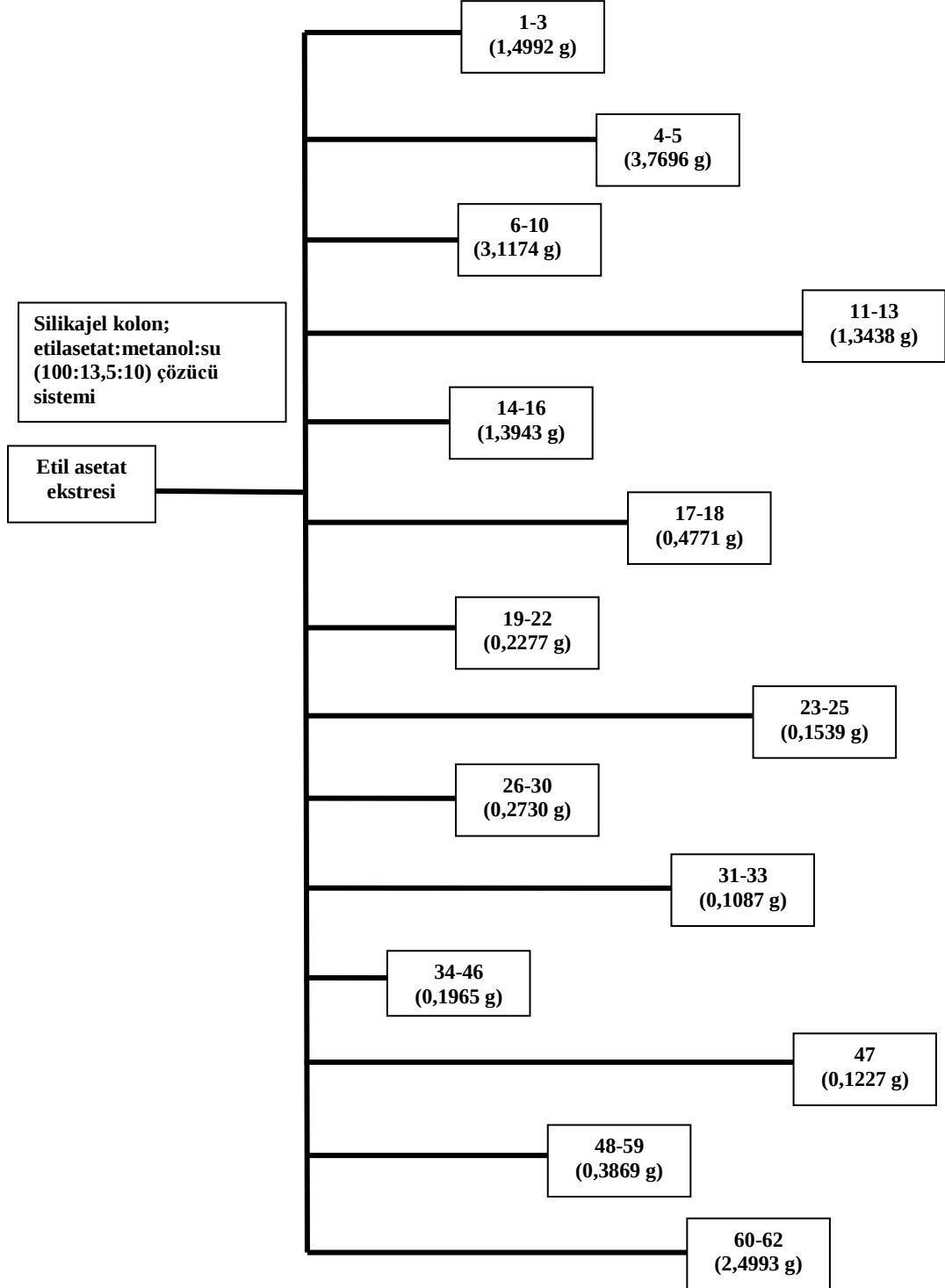


Şekil 3.2. Silikajel kolondan elde edilen fraksiyonların metanol:su (1:1) çözücü sistemiyle ters faz İTK uygulaması (Vanilin- H_2SO_4 reaktifi ile muamele edildikten sonra)

3.1.1.2.2. Silikajel Kolon Uygulamalarına Ait Bulgular

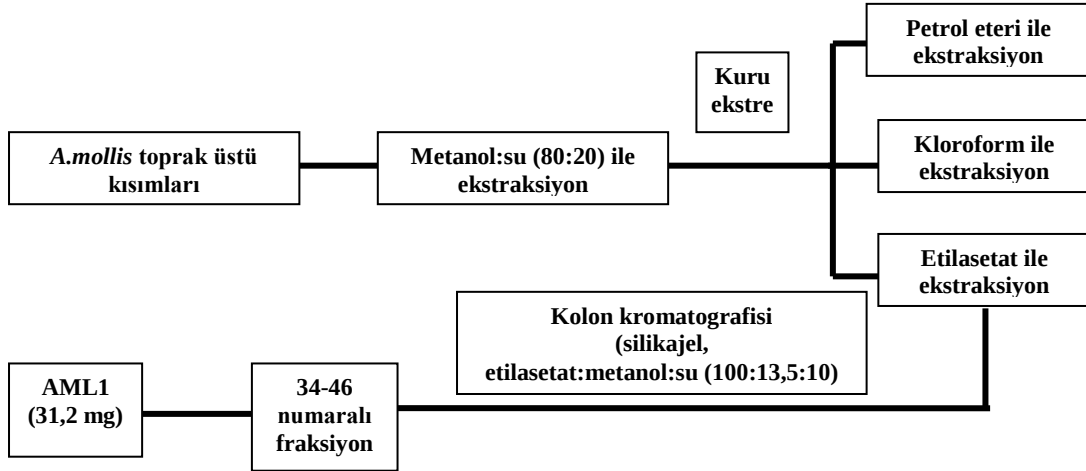
Sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucu elde edilen etilasetat fazı 21,4730 g tartıldı ve silikajel (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm, Merck ASTM) kolondan etilasetat:metanol:su (100:13,5:10) çözücü sistemiyle izokratik akış ile elüeedilerek 62 fraksiyon toplandı.

Toplanan fraksiyonların İTK analizleri yapılarak benzer kimyasal yapıları içerdiği düşünülen fraksiyonlar Şekil 3.3.'te görüldüğü gibi birleştirildi ve tartıldı.



Şekil 3.3. Silikajel kolon sonucu elde edilen fraksiyonlar

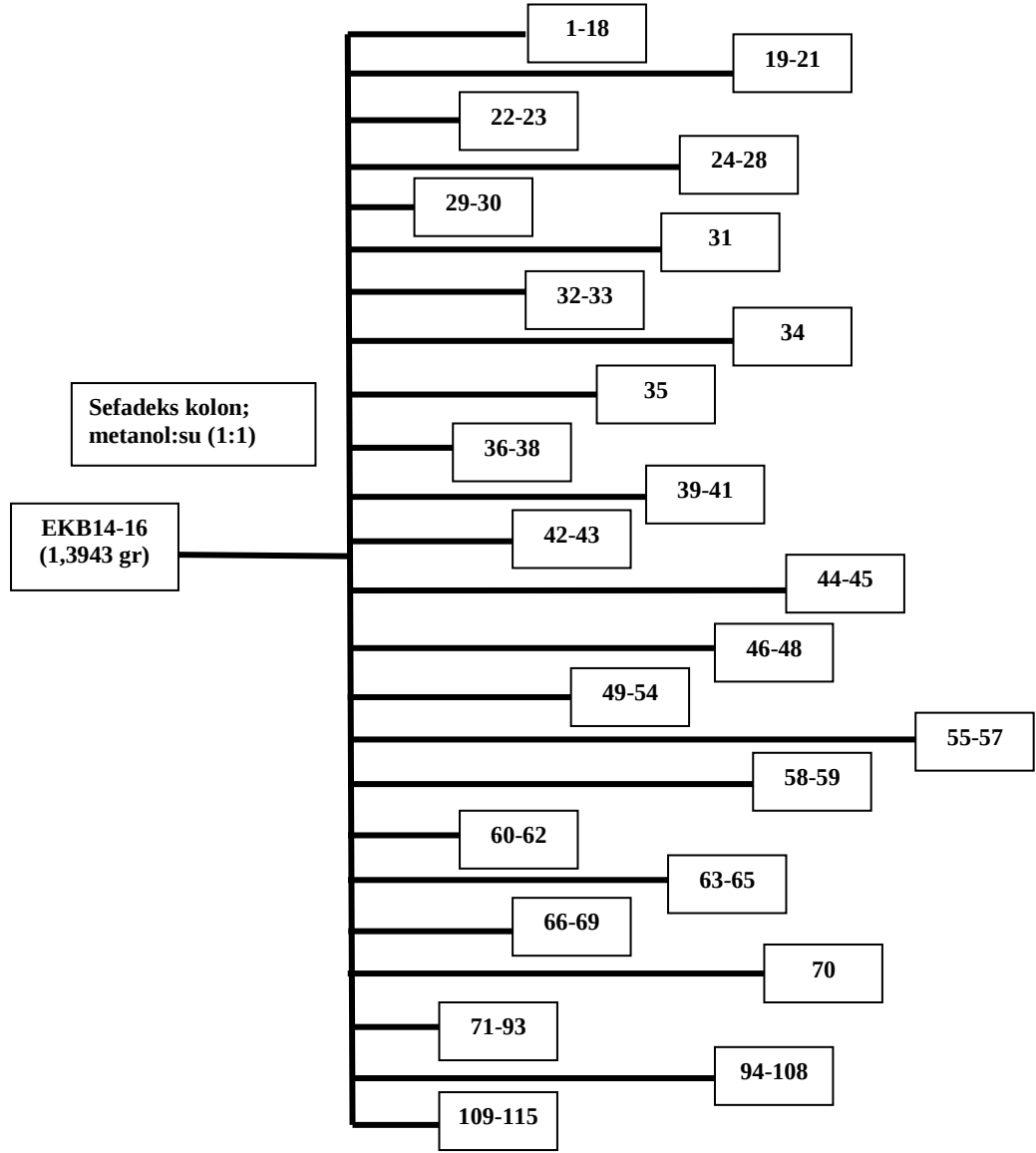
Silikajel kolondan elde edilen EKB34-46 numaralı fraksiyonda çökelek oluşumu gözlemlendi. Süzülerek alınan çökeleğin YPSK analizi yapıldı ve bileşiğe AML1 kodu verildi. İzole edilen bileşik 31,2 mg olarak tartıldı. AML1 bileşiğinin izolasyon şeması şekil 3.4.'te verilmiştir.



Şekil 3.4. AML-1 bileşiğinin izolasyon şeması

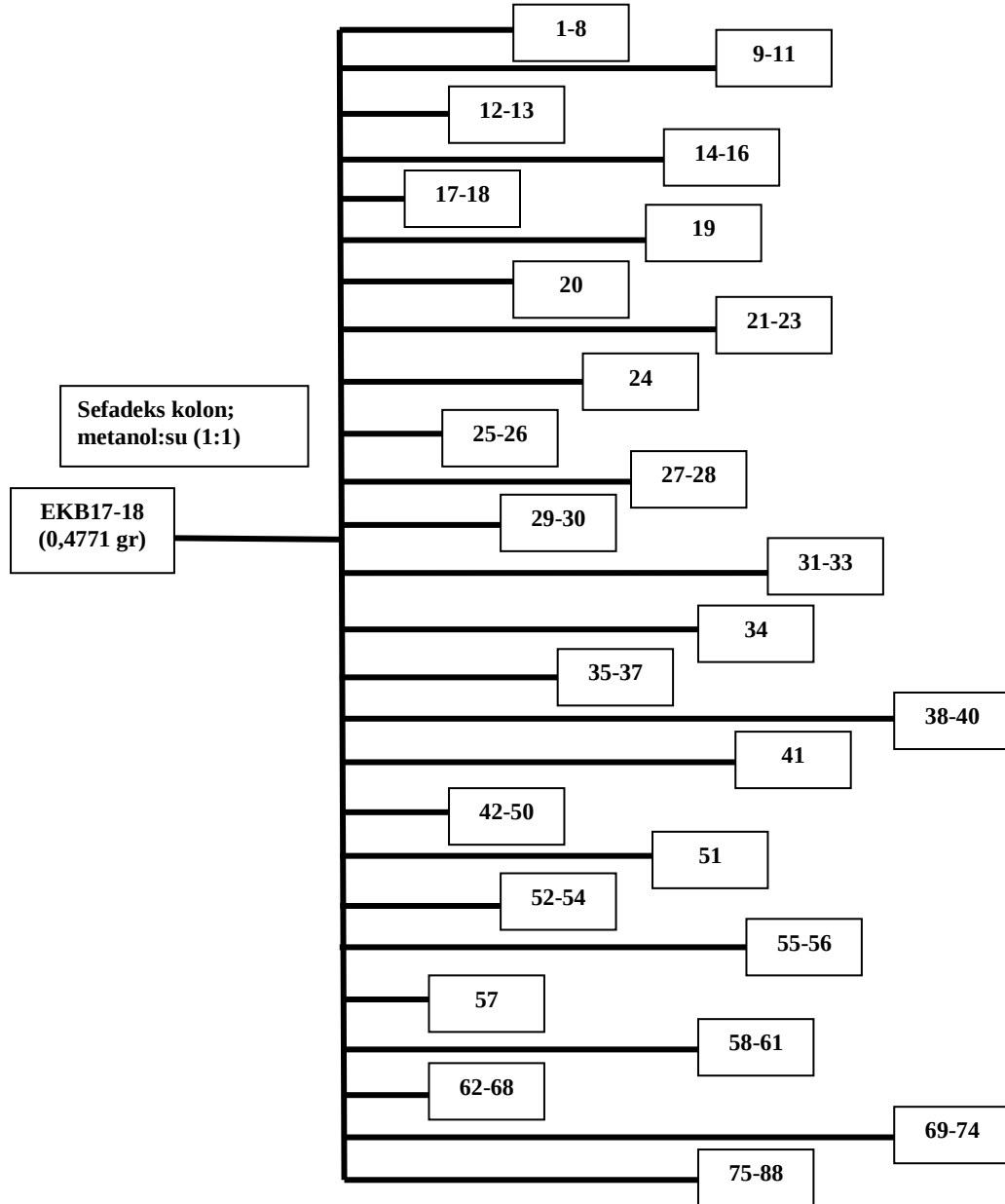
3.1.1.2.3. Sefadeks Kolon Uygulamalarına Ait Bulgular

Silikajelkolondan elde edilen EKB14-16 ve EKB17-18 fraksiyonları sırayla sefadeks kolona uygulanarak metanol ile elüe edildi. EKB14-16 fraksiyonundan 115; EKB17-18 fraksiyonundan 88 fraksiyon toplandı. Fraksiyonların ters faz silikajel plaklar (Merck, 1.05559) kullanılarak metanol:su (1:1) çözücü sistemiyle İTK profillerine bakıldı. Benzer kimyasal yapıları taşıdığı düşünülen fraksiyonlar Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.'da görüldüğü gibi birleştirildi.



Şekil 3.5. EKB14-16 fraksiyonun sefadeks kolondan elde edilen alt fraksiyonları

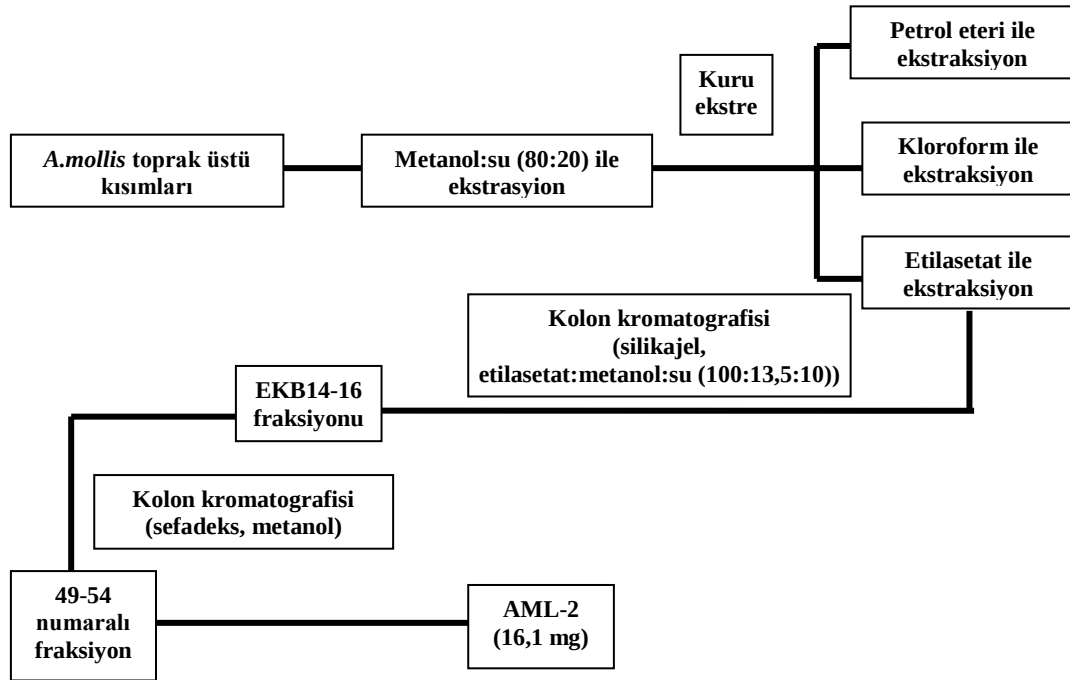
EKB17-18 fraksiyonunun uygulandığı sefadeks kolondan toplanan ve birleştirilen 42-50 numaralı fraksiyonda bekleme sonunda çökme gerçekleşti. Fraksiyonun Whatman kağıdından süzülmesiyle elde edilen çökelek YPSK ile analiz edildi. Analiz sonucunda saf olduğu tayin edilen bileşiğin AML-1 kodlu bileşik ile aynı olduğu görüldü.



Şekil 3.6. EKB17-18 fraksiyonunun sefadeks kolondan elde edilen alt fraksiyonları

EKB17-18 fraksiyonunun sefadeks kolonundan toplanarak birleştirilen 62-68 numaralı fraksiyonda bekleme sonucunda çökelek oluşumu gözlemlendi. Whatman kağıdından süzülerek alınan çökeleğin YPSK analizi yapılarak yeterince temiz olmadığına karar verildi. Metanol:su çözücü sistemi ve ters faz silikajel plaklar kullanılarak preperatif İTK yapıldı ve sürüklenme sonucunda altta kalan bant kazınarak alındı. Bileşik metanolde çözülerek silikajelden uzaklaştırıldı ve çözücü uçuruldu. Bileşiğin YPSK analizi yapıldı ve AML-1 bileşiği ile aynı olduğu tespit edildi.

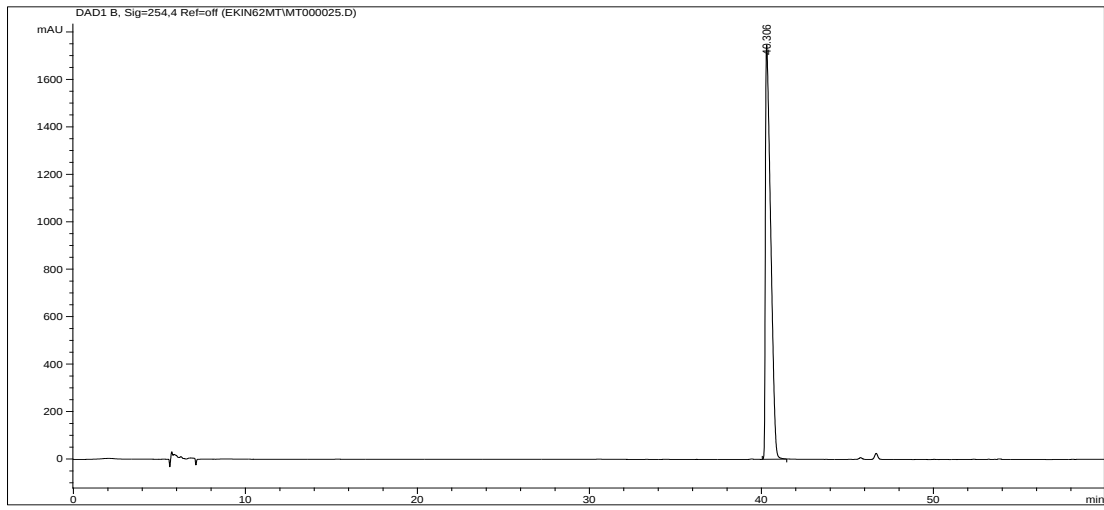
EKB14-16 fraksiyonunun sefadeks fraksiyonlamasında elde edilen 49-54 numaralı fraksiyonda bekleme sonucunda çökme gözlemlendi. Çökelek süzülerek YPSK analizi yapıldı. Bileşik AML-2 olarak isimlendirildi ve 16,1 mg olarak tartıldı. AML-2 bileşiğinin izolasyon şeması şekil 3.7.'de verilmiştir.



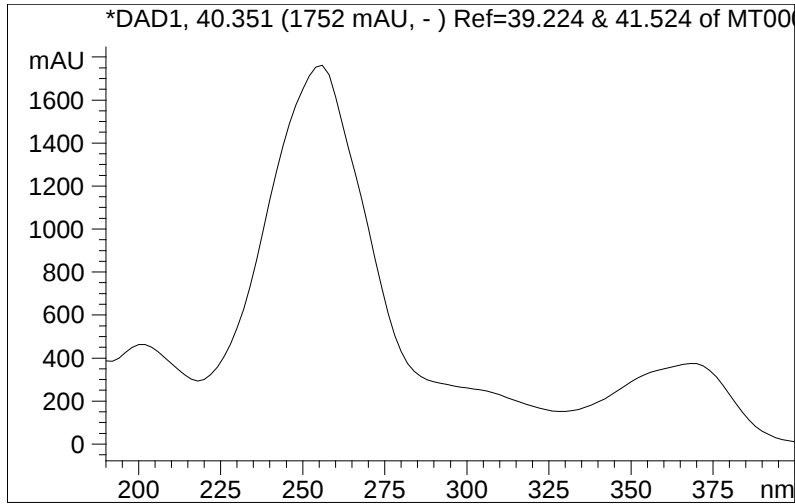
Şekil 3.7. AML-2 bileşiğinin izolasyon şeması

3.1.1.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine Ait Bulgular

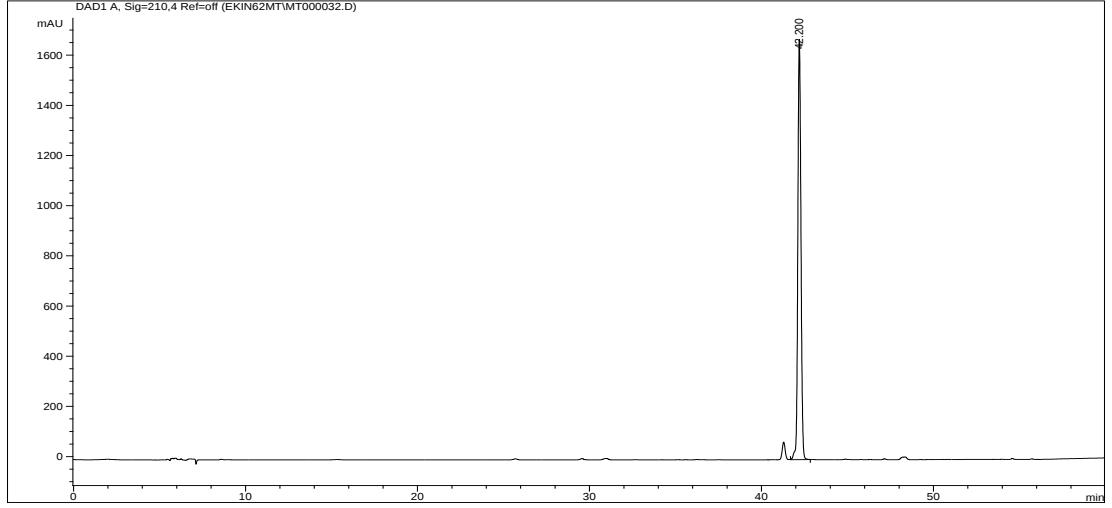
Kolon kromatografisinin her aşamasında, fraksiyonlar ile izole edilen AML-1 ve AML-2 bileşiklerinin YPSK analizleri yapıldı. İzolasyon çalışmalarına ait YPSK kromatogramları ile bileşiklerin UV spektrumları verilmiştir (şekil 3.8, şekil 3.9, şekil 3.10, şekil 3.11).



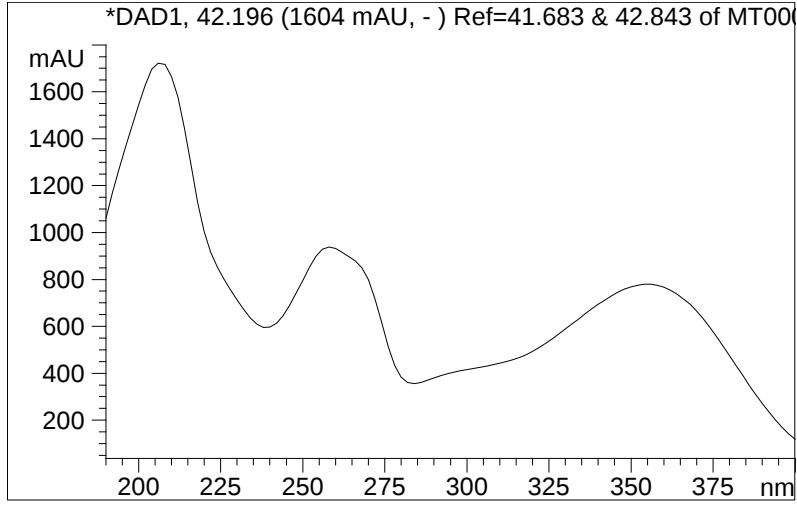
Şekil 3.8. AML-1 bileşiğinin YPSK kromatogramı, 254 nm



Şekil 3.9. AML-1 bileşiğinin UV spektrumu



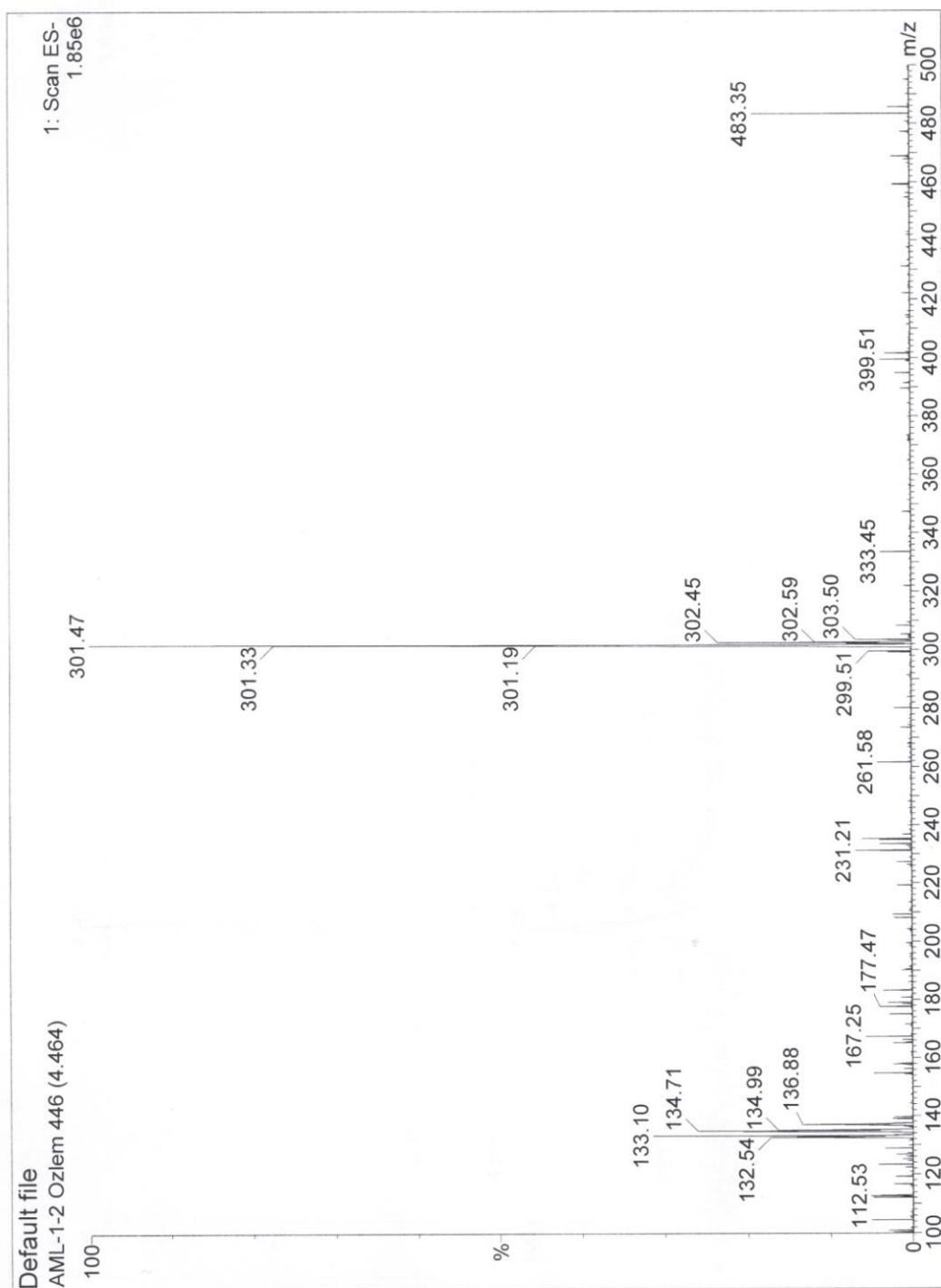
Şekil 3.10. AML-2 bileşiğinin YPSK kromatogramı, 210 nm

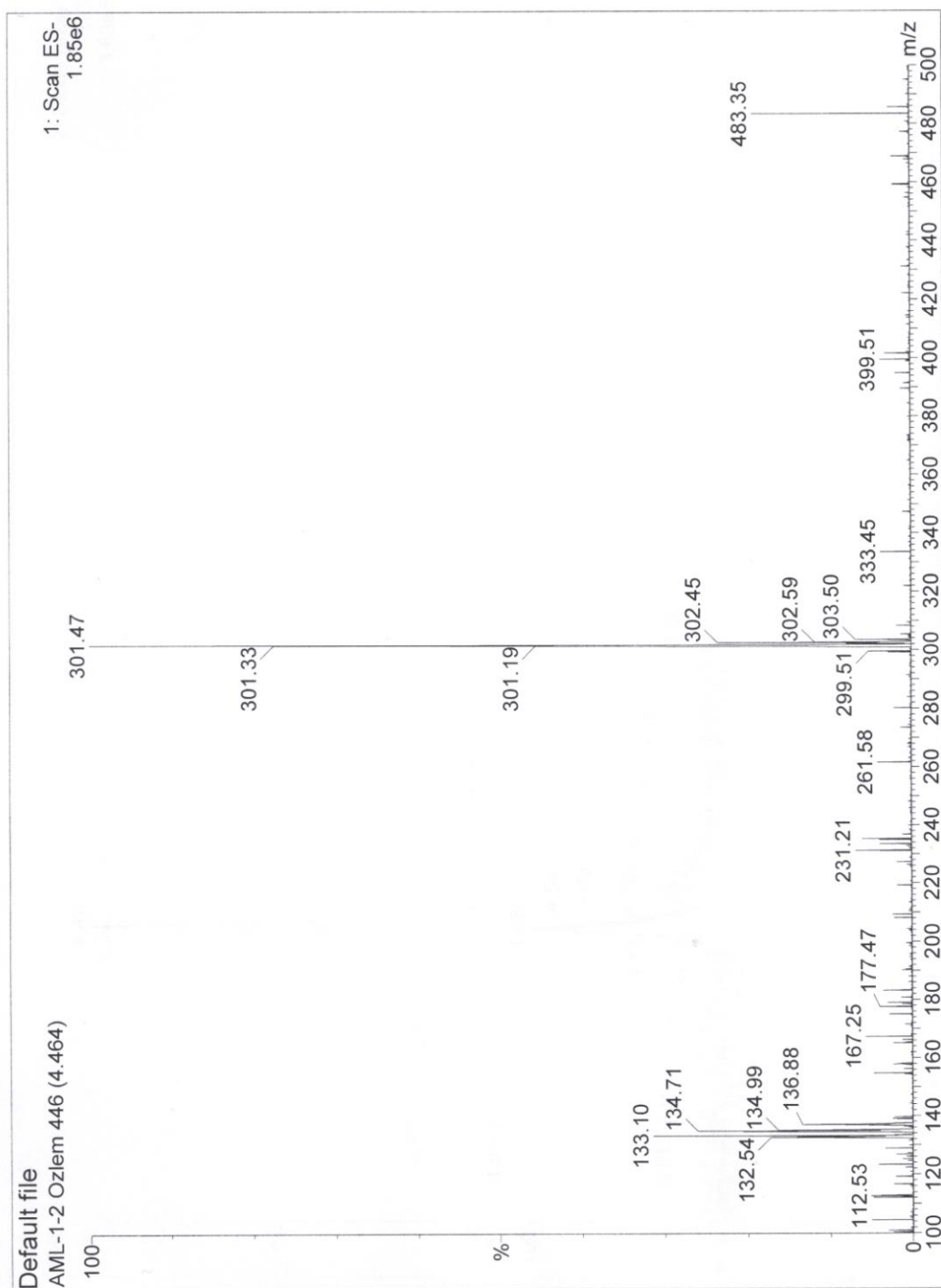


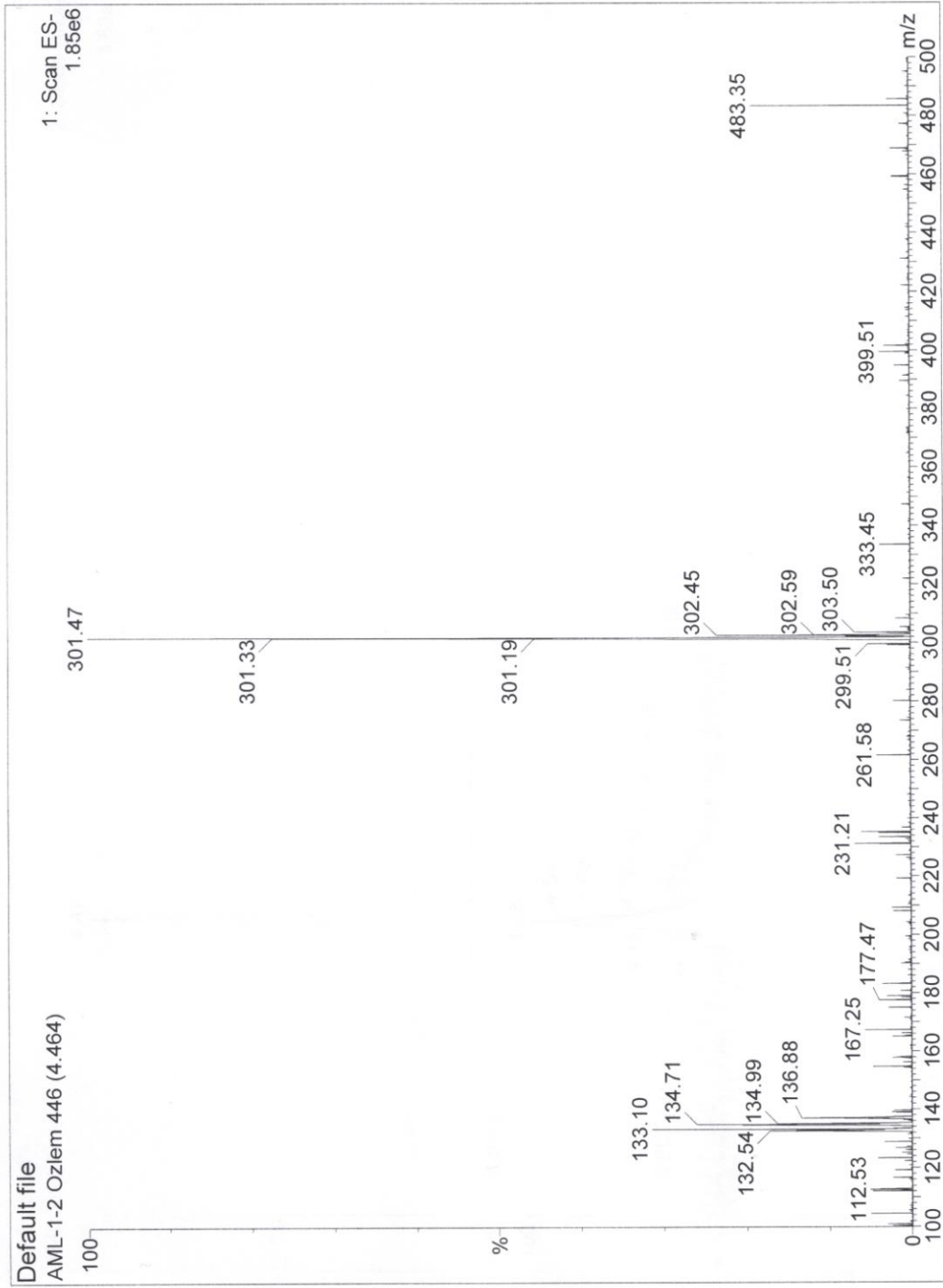
Şekil 3.11. AML-2 bileşiğinin UV spektrumu

3.1.1.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapılarının Aydınlatılması

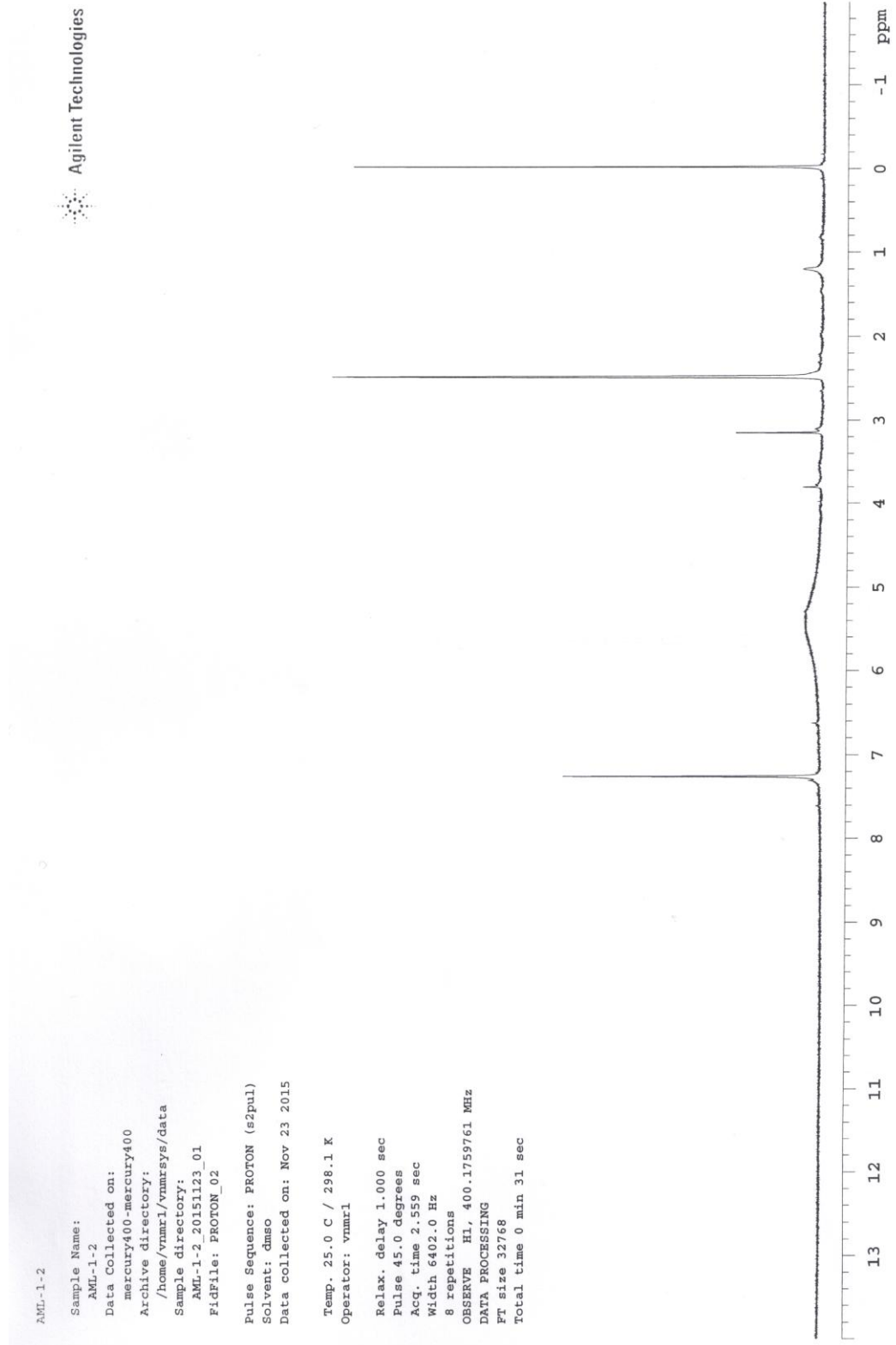
3.1.1.3.1. AML-1 Bileşiğinin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular



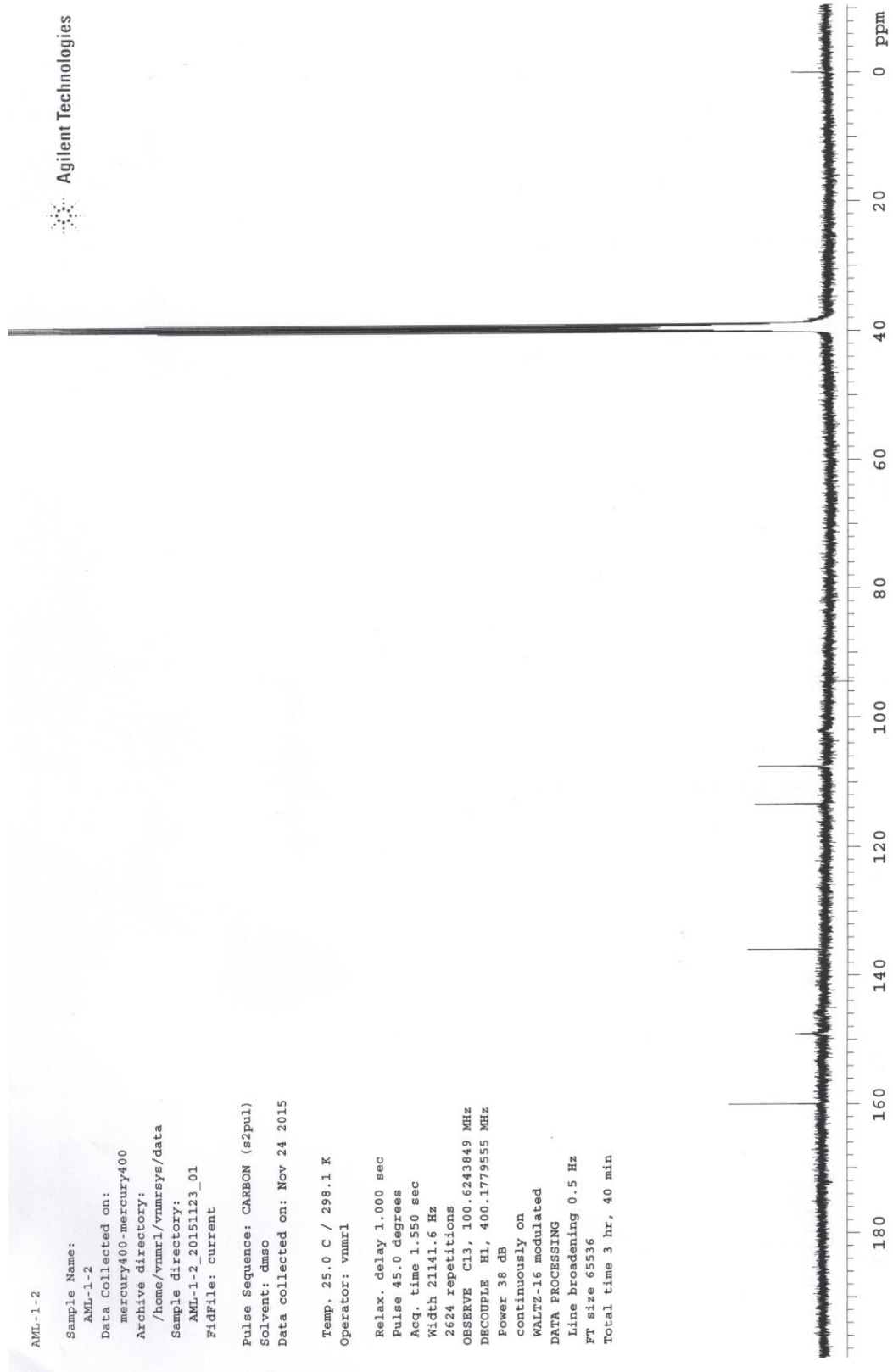




Şekil 3.12. AML-1 bileşiğinin KS spektrumu



Şekil 3.13. AML-1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

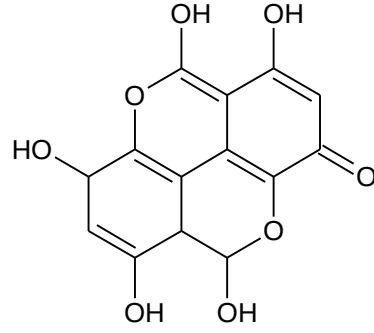


Şekil 3.14. AML-1 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Çizelge 3.1. AML-1 bileşiğinin ^1H ve ^{13}C NMR bulguları

Kimyasal kayma	Proton	C	δ (ppm)
-	-	C-1	-
-	-	C-2	113.36
-	-	C-3	-
-	-	C-4	149.05
7.25 (2H, s)	H-5	C-5	-
-	-	C-6	107.55
-	-	C-7	159.95
-	-	C-1'	113.36
-	-	C-2'	135.90
-	-	C-3'	-
-	-	C-4'	149.05
7.25 (2H, s)	H-5'	C-5'	-
-	-	C-6'	107.55
-	-	C-7'	159.95

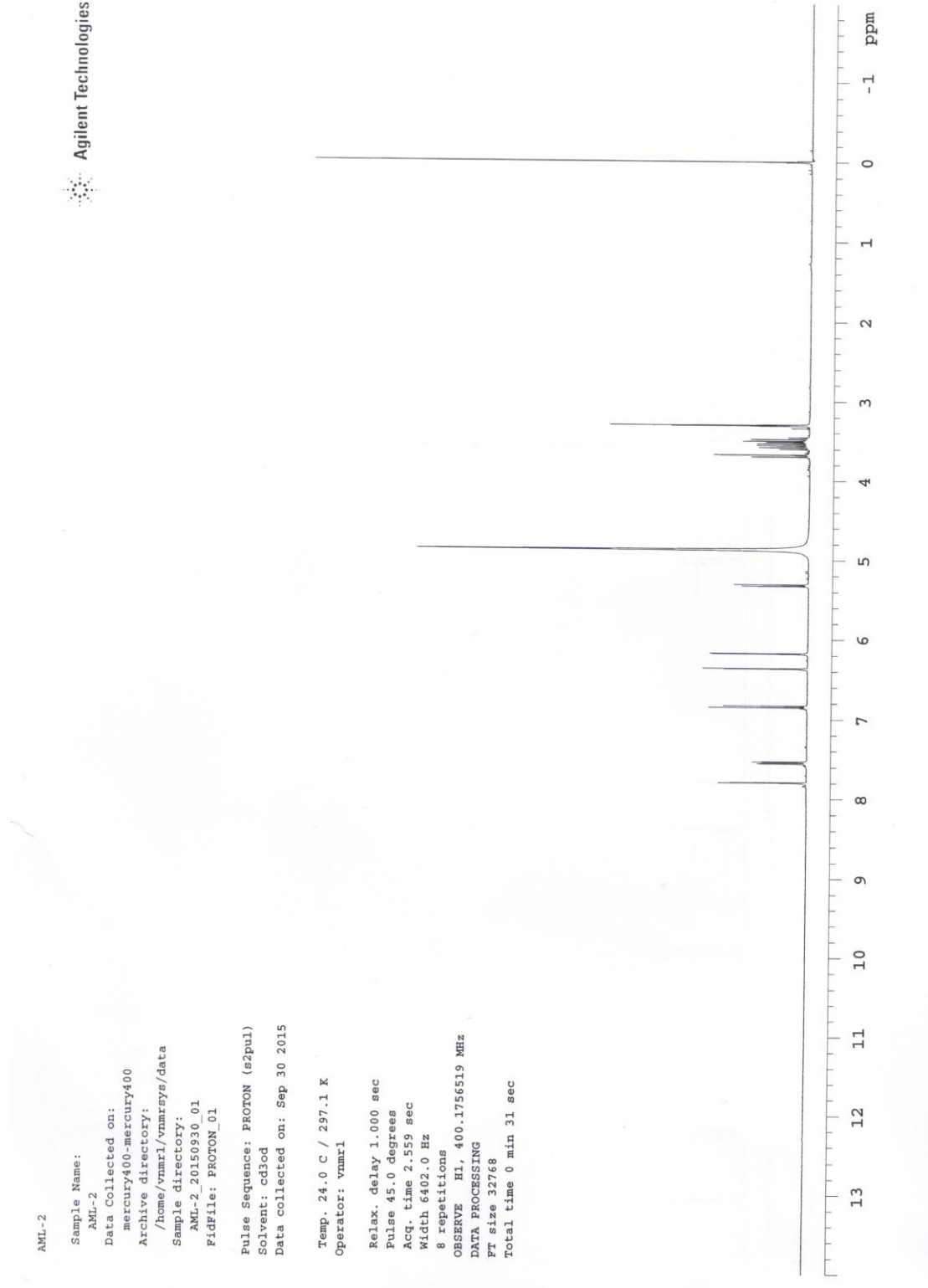
AML-1 kodlu bileşiğin YPSK analizi ve UV spektrumu incelendiğinde *A. mollis* toprak üstü ekstresinde bulunan major maddelerden biri olduğu görülmüş ve *Alchemilla* türlerinde daha önce varlığı tespit edilen elajik asit olabileceği düşünülmüştür. Yapılan YPSK analizi sonucunda standart olarak alınan elajik asit (Sigma Aldrich) ile karşılaştırılmıştır. Elajik asit ve AML-1 kodlu bileşiğin UV spektrumları (şekil 3.9) yanında retansiyon zamanlarının (şekil 3.8) da aynı olduğu görülmüştür. AML-1 kodlu bileşiğin, ESI-KS (şekil 3.12) ile ölçülen molekül ağırlığı 301.47 [M-H] olarak tespit edilmiş, ayrıca ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları (çizelge 3.1) da alınarak literatür bilgileri ile kıyaslanmıştır. ^1H -NMR spektrumu (şekil 3.13) incelendiğinde δ 7.25 ppm'de görülen (2H, s) sinyalin aromatik halkaya bağlı iki protonu (H-5 ve H-5') işaret etmektedir. ^{13}C -NMR spektrumunda (şekil 3.14) 5 karbon atomuna δ 113.36 (C-1, C-1'), δ 135.90 (C-2, C-2'), δ 149.05 (C-4, C-4'), δ 107.55 (C-6, C-6'), δ 159.95 (C-7, C-7') ait sinyal gözlenmiştir. Tüm bu veriler literatür verileri ile kıyaslandığında (Li ve ark., 1999) AML-1 kodlu bileşiğin elajik asit olduğu ortaya konmuştur (şekil 3.15).



Molekül Adı	Elajik asit
Molekül Ağırlığı	302,197
Molekül Formülü	C ₁₄ H ₆ O ₈
Özelliği	Sarımsı beyaz, amorf toz

Şekil 3.15. AML-1 bileşiğinin yapı tayini bulguları

3.1.1.3.2. AML-2 Bileşığının Yapı Tayini ile İlgili Bulgular



Şekil 3.16.AML-2 bileşığının ¹H-NMR spektrumu

AML-2

Sample Name:

AML-2

Data Collected on:

mercury400-mercury400

Archive directory:

/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:

AML-2_20150930_01

FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)

Solvent: cd3od

Data collected on: Sep 30 2015

Temp. 24.0 C / 297.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.304 sec

Width 25125.6 Hz

64 repetitions

OBSERVE C13, 100.6241000 MHz

DECOUPLE H1, 400.1776314 MHz

Power 38 dB

continuously on

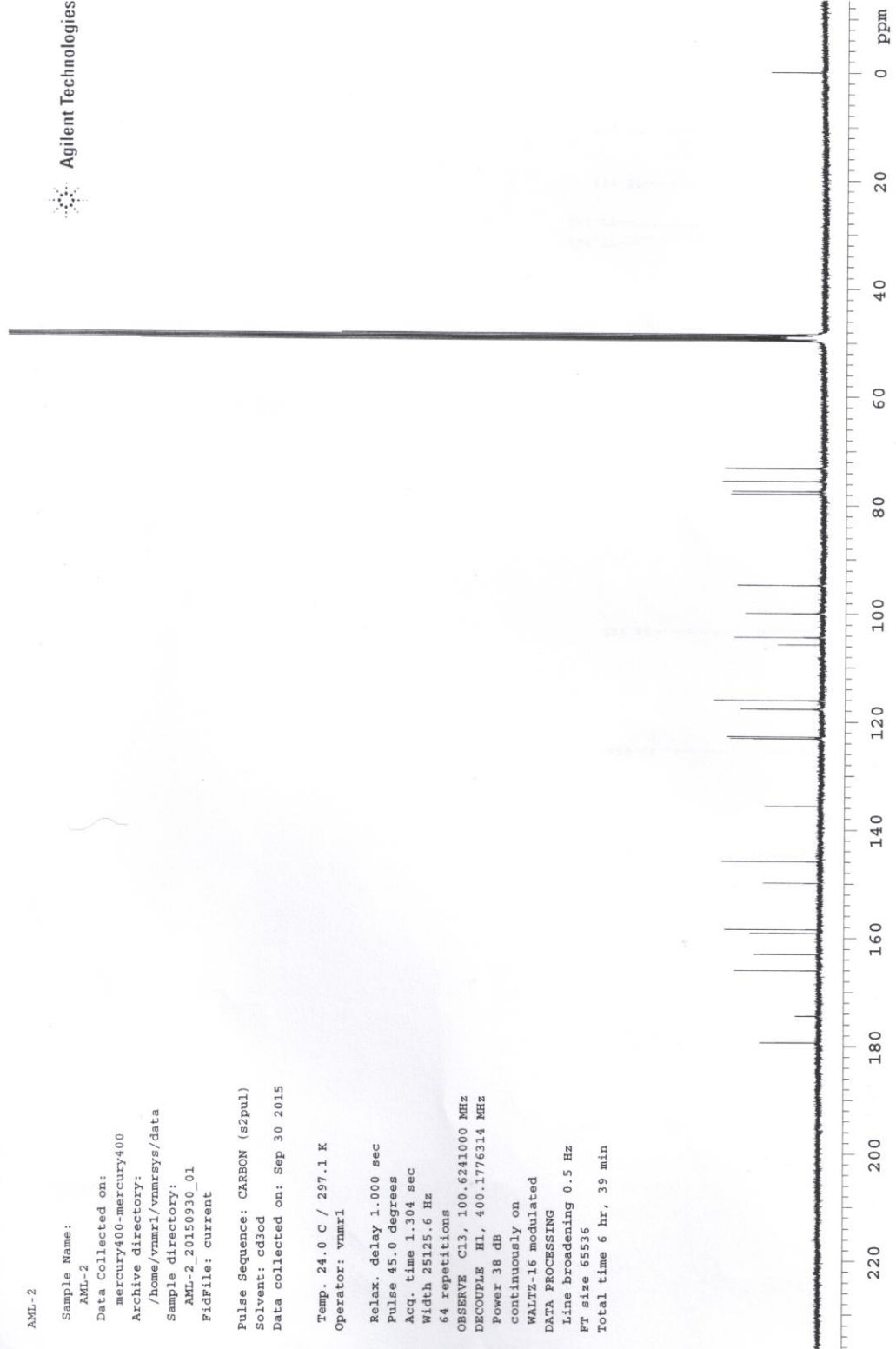
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

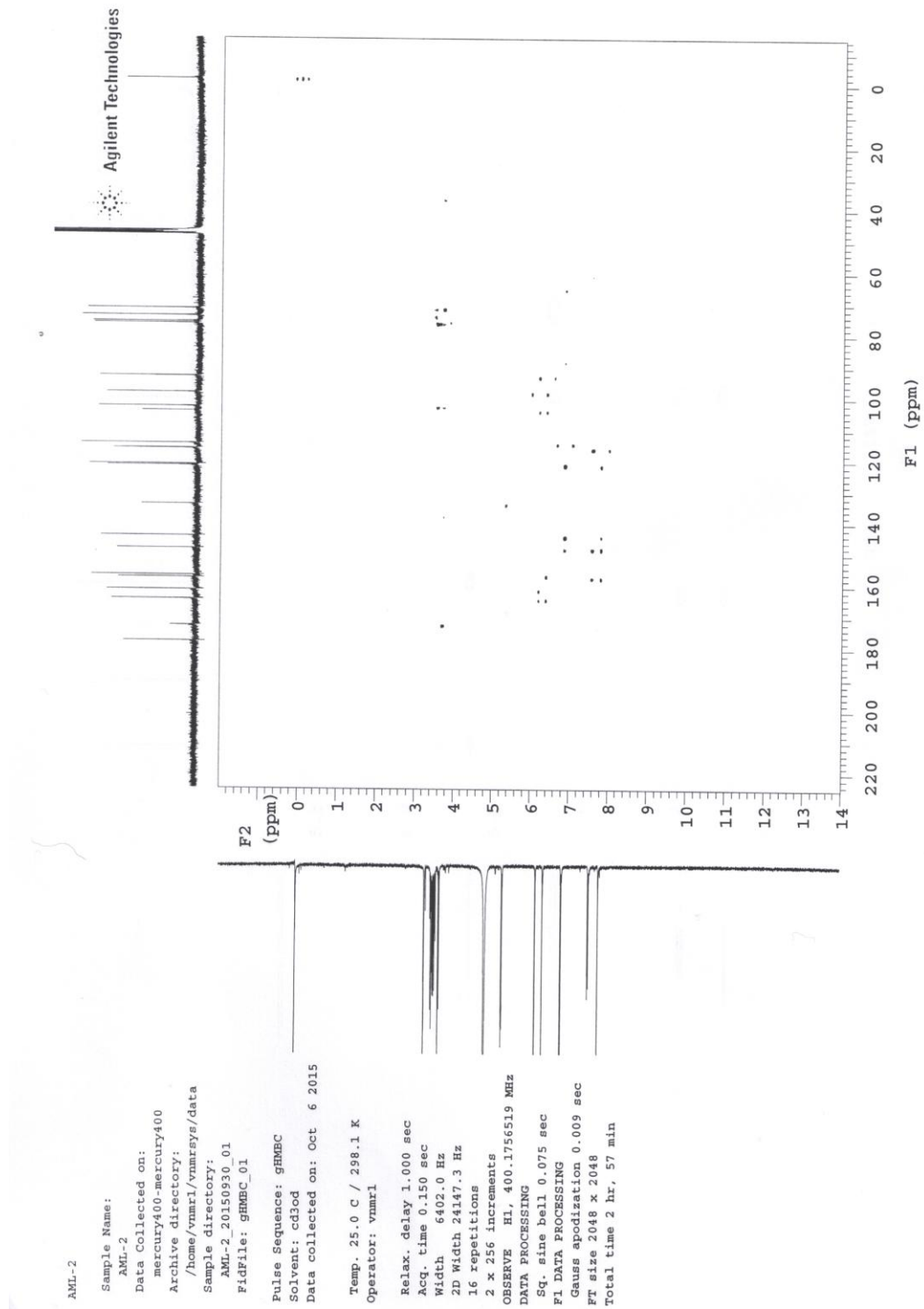
Line broadening 0.5 Hz

FT size 65536

Total time 6 hr, 39 min



Şekil 3.17.AML-2 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.18.AML-2 bileşiğinin HMBC spektrumu

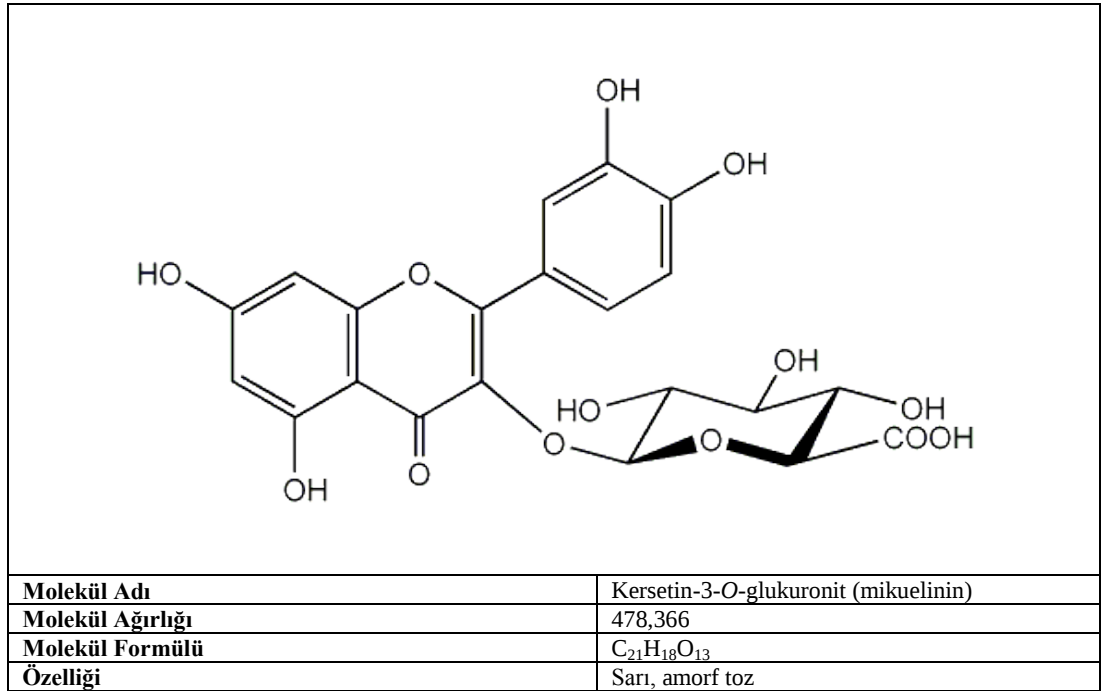
Çizelge 3.2. AML-2 bileşiğinin ^1H ve ^{13}C NMR bulguları

Kimyasal kayma	Proton	C	δ (ppm)
-	-	-	-
-	-	C-2	159.71
-	-	C-3	135.67
-	-	C-4	179.38
-	-	C-5	163.01
6.18 (1H, d, $J=2.4$ Hz)	H-6	C-6	99.95
-	-	C-7	166.03
6.36 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	H-8	C-8	94.78
-	-	C-9	158.48
-	-	C-10	105.71
-	H-1'	C-1'	122.84
7.79 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	H-2'	C-2'	116.13
-	H-3'	C-3'	145.94
-	H-4'	C-4'	149.90
6.84 (1H, d, $J=8.4$ Hz)	H-5'	C-5'	117.72
7.54 (1H, dd, $J=2.0, 8.8$ Hz)	H-6'	C-6'	123.18
5.31 (1H, d, $J=7.6$ Hz)	H-1''	C-1''	104.40
3.67-3.00	H-2''	C-2''	77.90
	H-3''	C-3''	77.38
	H-4''	C-4''	75.53
	H-5''	C-5''	73.17
	H-6''	C-6''	174.46

AML-2 kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (şekil 3.16) incelendiğinde δ 6.18 (1H, d, $J=2.4$ Hz) ve δ 6.36 (1H, d, $J=2.0$ Hz) ppm'lerde gözlenen sinyaller birbirine göre meta konumda yer alan, sırasıyla H-6 ve H-8 konumlarını; δ 7.79 (1H, d, $J=2.0$ Hz), δ 6.84 (1H, d, $J=8.4$ Hz) ve δ 7.54 (1H, dd, $J=2.0, 8.8$ Hz) ppm'lerde gözlenen sinyaller ise trisüstitüe aromatik halkayı, sırasıyla H-2', H-5' ve H-6' konumlarını işaret etmektedir. ^{13}C -NMR spektrumunda (şekil 3.17) 21 karbon atomuna ait sinyal gözlenmiştir. δ 179.38 ppm'de gözlenen kuaterner karbon atomuna ait sinyal karbonil grubunun varlığını (C-4) işaret etmektedir. Bu veriler AML-2 kodlu bileşiğin kersetol türevi olduğunu ortaya koymaktadır. ^1H -NMR spektrumunda anomerik protona ait olan δ 5.31 ppm'de gözlenen dublet ($J=7.6$ Hz, 1H) β pozisyonundan bağlı bir ozun varlığını düşündürmektedir. ^{13}C -NMR spektrumunda görülen δ 174.46 ppm'de gözlenen kuaterner karbon atomuna ait sinyal ikinci karbonil grubunun varlığını göstermektedir ki bu ozun karbonil grubu taşıdığına işaret etmektedir.

^1H -NMR ve ^{13}C -NMR verileri (çizelge 3.2) değerlendirildiğinde kersetol halkası yanında glukronik asit halkasının varlığı görülmektedir. HMBC spektrumunda δ 5.31

ppm'deki anomerik proton sinyalinin δ 135.67 ppm'deki karbon atomu sinyali ile etkileşmesi glukuronik asitin kersetol halkasına 3. konumdan bağlandığını göstermektedir. Bu bilgiler AML-2 kodlu bileşiğin kersetol-3-O- β -glukronit yani mikuelianin olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca elde edilen veriler literatür verileri ile kıyaslanmıştır ve AML-2 bileşiğinin daha önce *A. vulgaris*'den izole edilen mikuelianin (şekil 3.19) bileşiği olduğu doğrulanmıştır (Nugroho ve Lee., 2014; Vijayalakshmi ve Madhira, 2014).

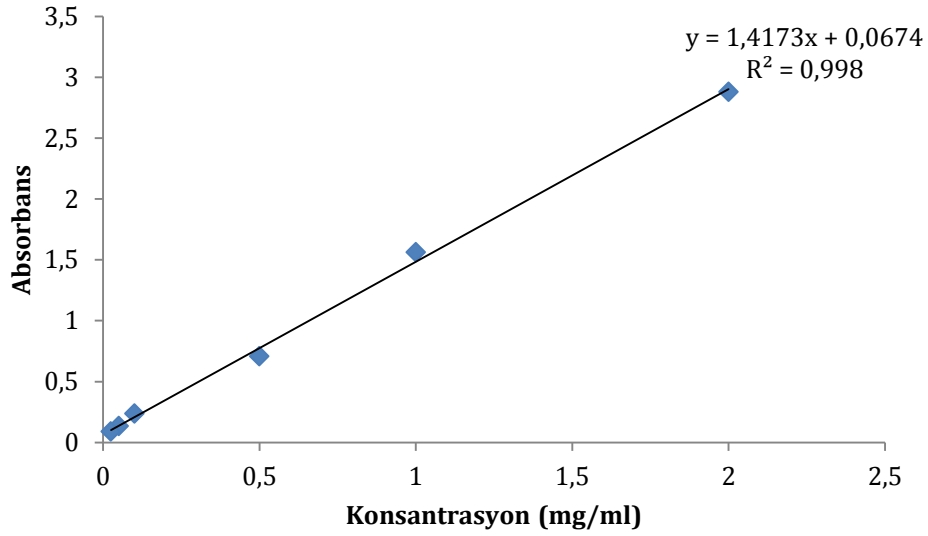


Şekil 3.19. AML-2 bileşiğinin yapı tayini bulguları

3.1.2. Farmakope Analizlerine Ait Bulgular

3.1.2.1. Tanen Miktar Tayinine Ait Bulgular

Gallik asidin farklı konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara ait okunan absorban değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiği ve kalibrasyon denklemi şekil 3.20.'de verilmiştir.



Şekil 3.20. Gallik asit için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi

Bitki ekstratlarının absorbans değerleri denklemde yerine konarak ekstratlerdeki total polifenol miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) üzerinden hesaplandı ve çizelge 3.3'te verildi.

Çizelge3.3. Bitki kısımlarındaki total polifenol miktarları (mg GAE/g bitki)

	Total polifenol miktarı (mg GAE/g bitki)
<i>A.mollis</i> (toprak üstü)	298,52±89,87
<i>A.mollis</i> (kök)	244,00±72,73
<i>A.persica</i> (toprak üstü)	295,22±80,00
<i>A.persica</i> (kök)	331,69±117,27

Deri tozu ile muamele edilen bitki ekstratlarına ait absorbans değerleri aynı kalibrasyon denkleminde yerine konarak deri tozu tarafından absorblanmayan polifenollerin miktarı hesaplandı. Çizelge 3.1.'de verilen total polifenol miktarları ile deri tozu tarafından absorblanmayan polifenol miktarları arasındaki fark hesaplanarak bitkilerdeki tanen miktarına ulaşıldı (Çizelge 3.4.).

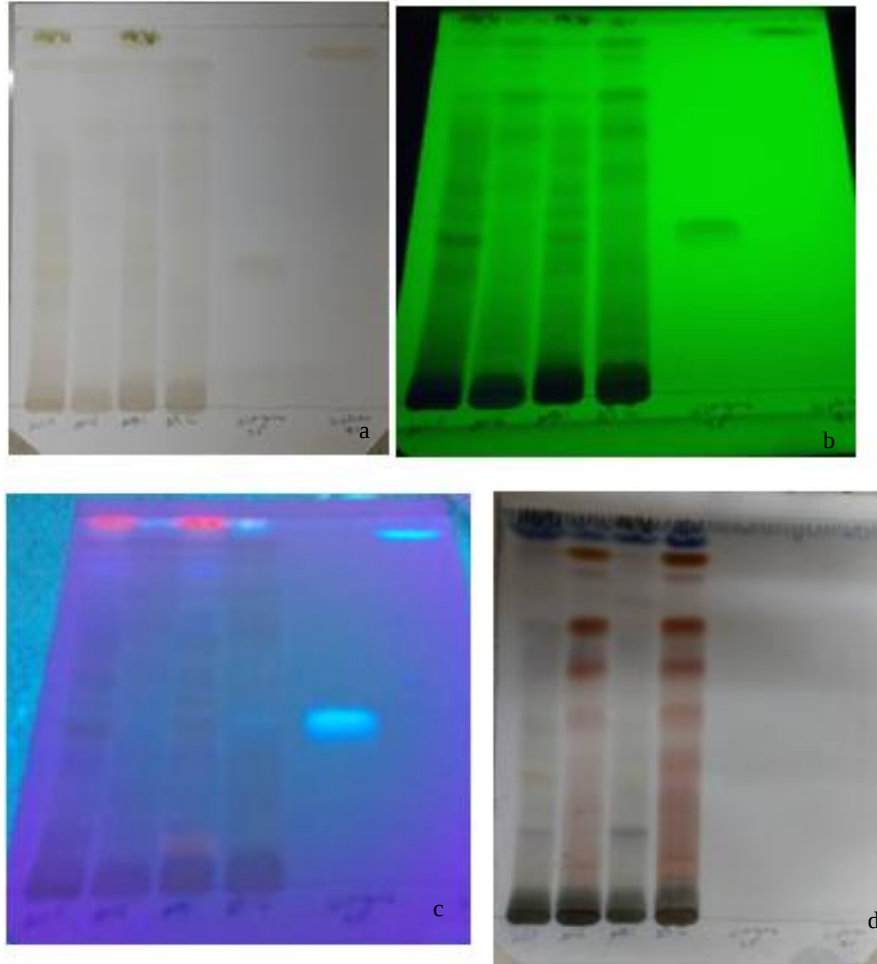
Çizelge3.4. Bitki kısımlarındaki tanen miktarı (g/100 g bitki materyali)

	tanen (g/100 g bitki materyali)
<i>A.mollis</i> (toprak üstü)	8,3
<i>A.mollis</i> (kök)	5,68
<i>A.persica</i> (toprak üstü)	12,95
<i>A.persica</i> (kök)	11,3

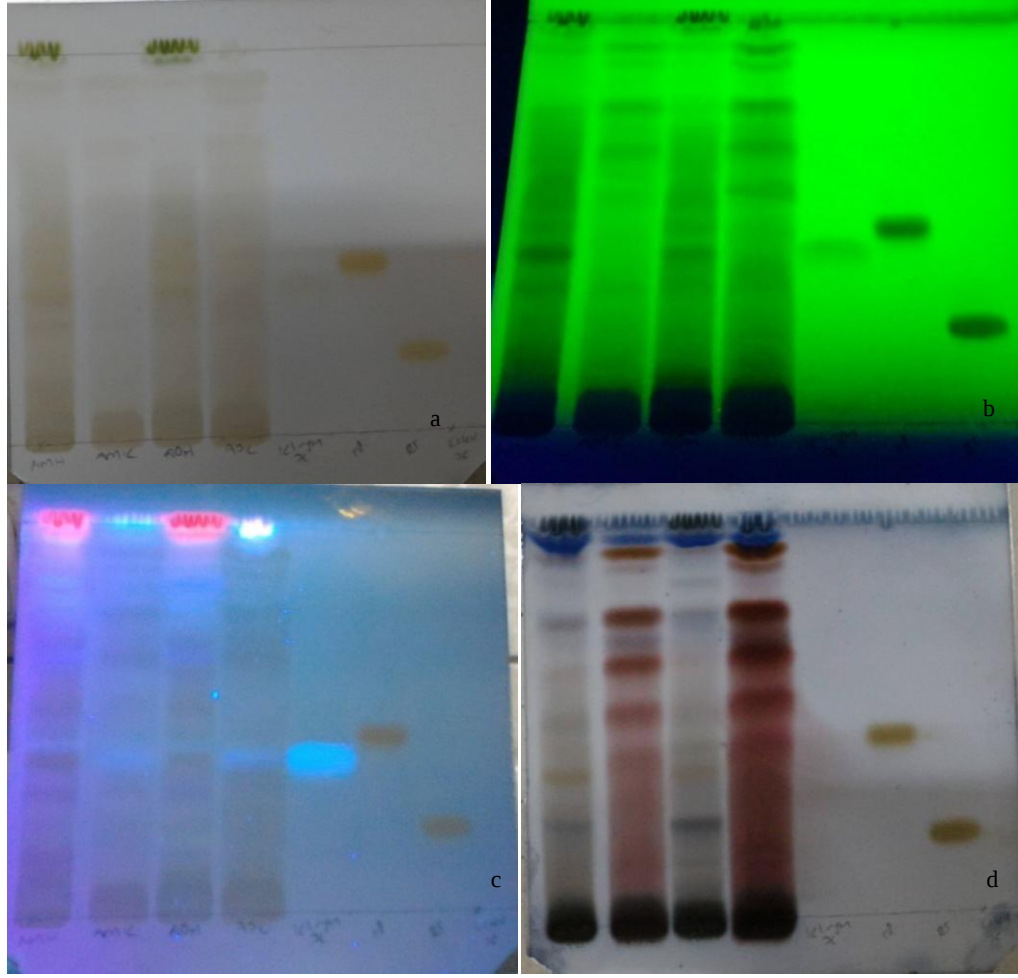
Avrupa Farmakopesi'ne göre *A.vulgaris* toprak üstü kısımlarında tanen miktarı %6'nın üzerinde olmalıdır. *A.mollis* ve *A.persica* kök ve toprak üstü ekstraktları bu şartı sağlamaktadır.

3.1.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi Analizlerine Ait Bulgular

Avrupa Farmakopesi 6.0 ve Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals kitabından yararlanılarak yapılan İTK analiz sonuçları sırasıyla şekil 3.21. ve şekil 3.22.'da verilmiştir.



Şekil 3.21. Bitki ekstraktlarının ve standartların Avrupa Farmakopesi'e göre İTK analizleri; Lekeler sırasıyla *A.mollis* toprak üstü kısmı, *A.mollis* kök, *A.persica* toprak üstü kısmı, *A.persica* kök ekstresi, klorojenik asit ve kafeik asit; **a:**Görünür dalga boyu **b:**UV₂₅₄ nm dalga boyu **c:**UV₃₆₆ nm dalga boyu **d:**Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile muamele edildikten sonra

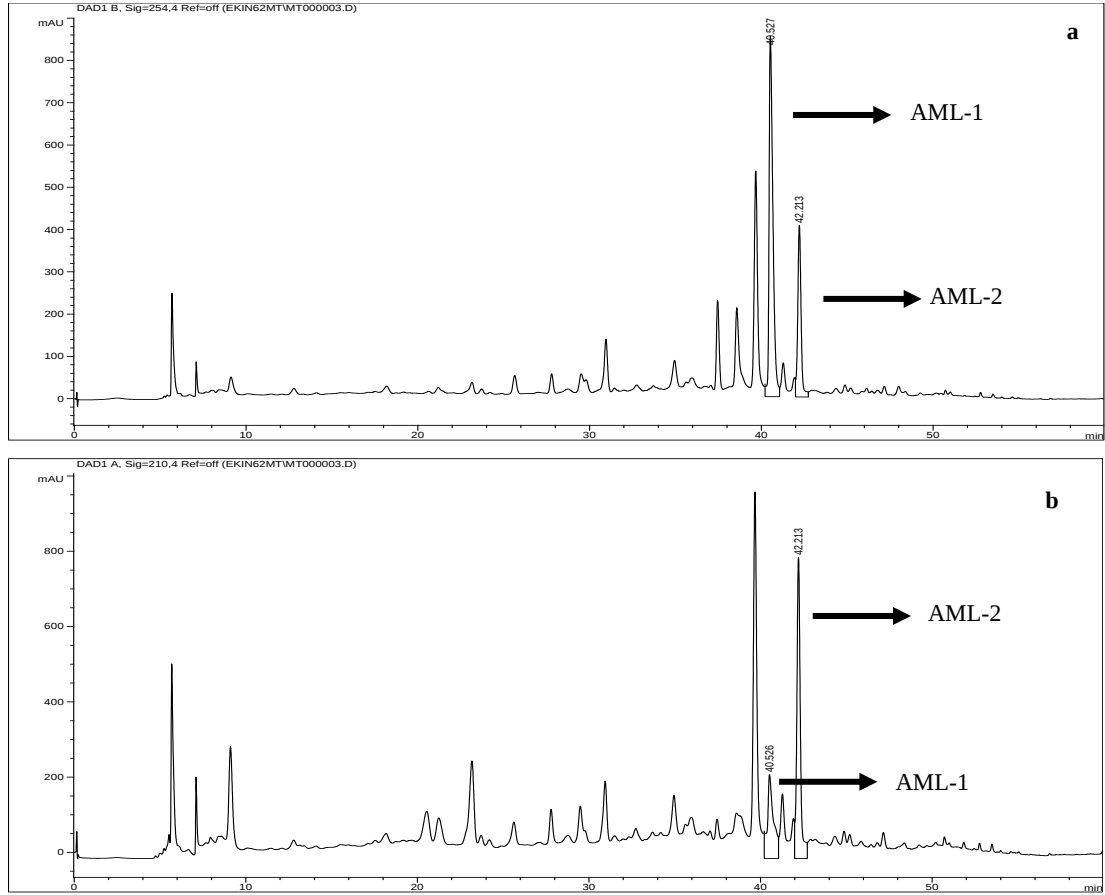


Şekil 3.22. Bitki ekstralarının ve standartların Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals kitabına göre İTK analizleri; Lekeler sırasıyla *A.mollis* toprak üstü kısmı, *A.mollis* kök, *A.persica* toprak üstü kısmı, *A.persica* kök ekstresi, klorojenik asit, hiperozit ve rutina: Görünür dalga boyu **b**: UV₂₅₄ nm dalga boyu **c**: UV₃₆₆ nm dalga boyu **d**: Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile muamele edildikten sonra

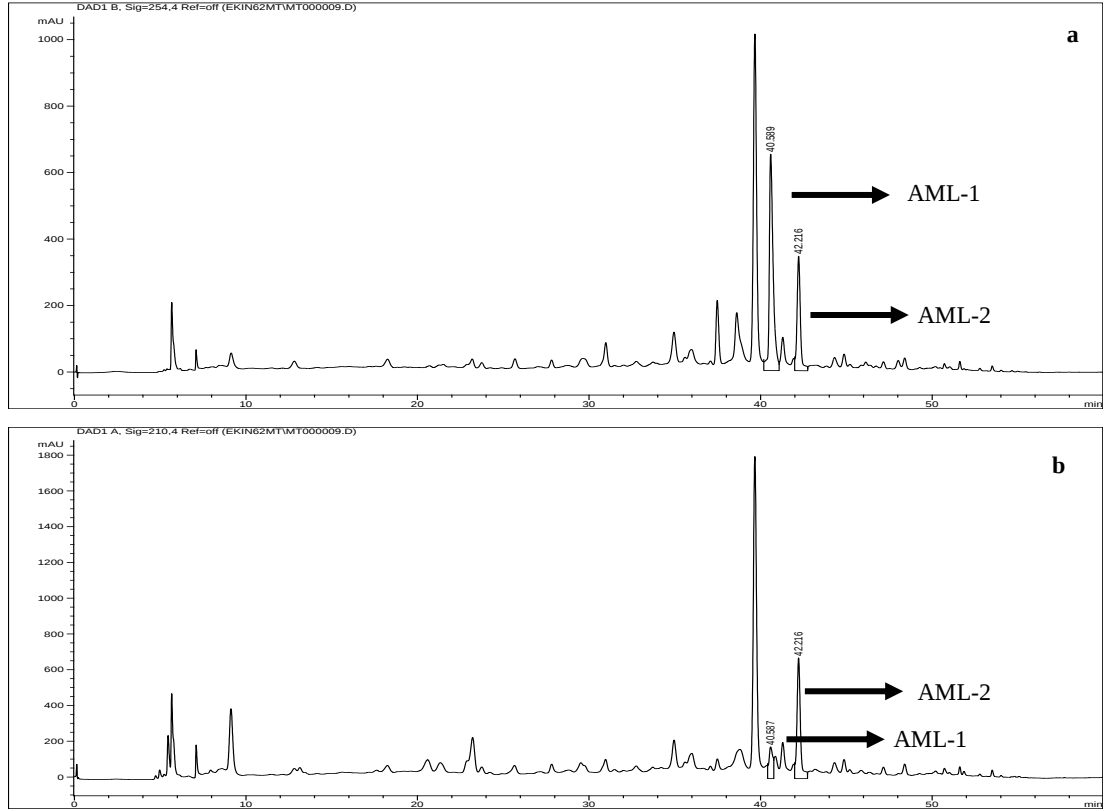
Plaklar incelendiğinde hiperozite ait bantlar *A.mollis* ve *A.persica* toprak üstü kısımlarında tespit edildi. Yapılan İTK çalışmaları sonucunda *A.mollis* ve *A.persica* kök ekstralarında ise klorojenik asite ait bantlar görüldü. Ancak YPSK analizleri sırasında bitki ekstralarında klorojenik asite ait piklere rastlanmadı. Bu durum YPSK ekstralarındaki klorojenik asit miktarının tespit limitinin altında olmasına bağlandı.

3.1.3. YPSK ile Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

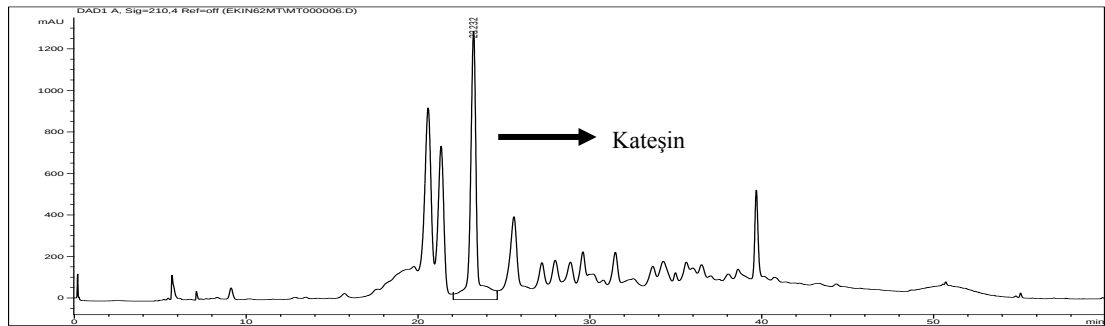
Miktar tayini çalışmaları sırasında *A.mollis* ve *A.persica* toprak üstü kısım ve köklerinden hazırlanan ekstratlar AML-1, AML-2 ve kateşin bileşiklerinin kantitatif analizi için test edildi. Standart olarak kullanılan maddelerin konsantrasyonları; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 mg/ml olarak ayarlandı. Ekstrelerin kromatogramları şekil 3.23.; 3.24; 3.25; 3.26'de verilmiştir.



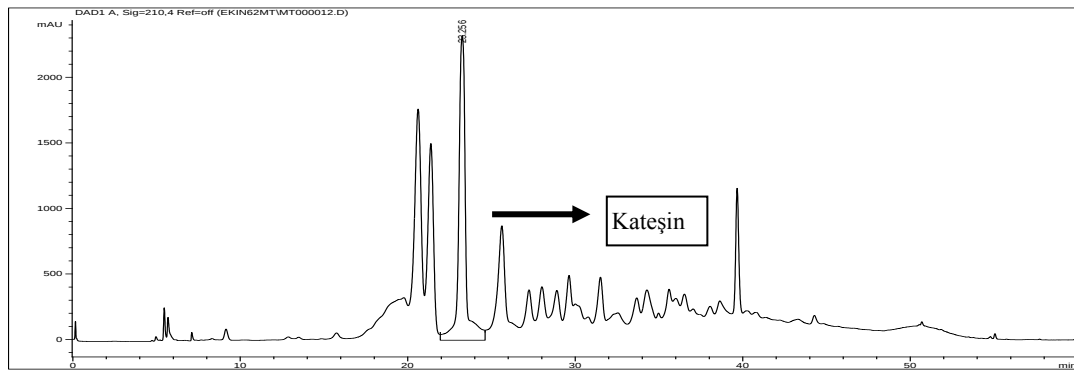
Şekil 3.23. *A.mollis* toprak üstü kısımlarına ait YPSK kromatogramları; sırasıyla UV₂₅₄ nm (a) ve UV₂₁₀ nm (b)



Şekil 3.24. *A. persica* toprak üstü kısımlarına ait YPSK kromatogramları; sırasıyla UV₂₅₄ nm (a) ve UV₂₁₀ nm (b)



Şekil 3.25. *A. mollis* köklerine ait YPSK kromatogramı; UV₂₁₀

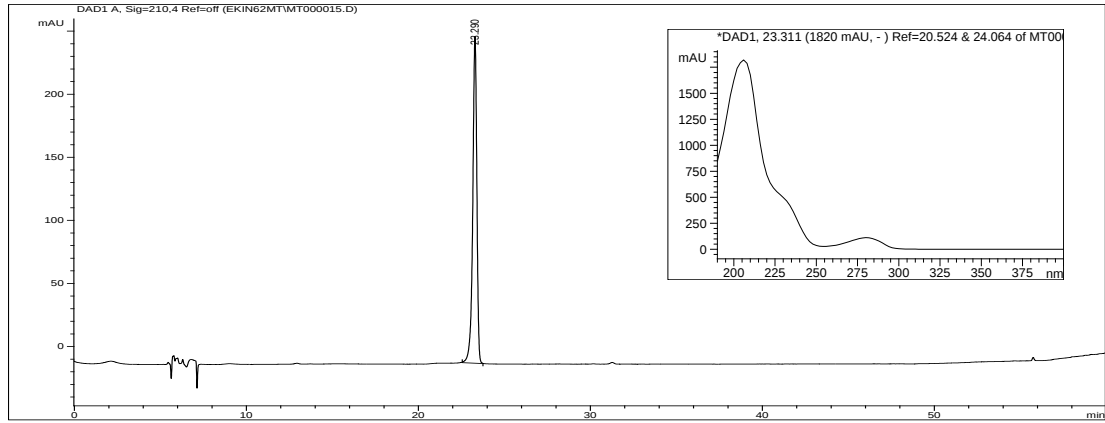


Şekil 3.26. *A. persica* köklerine ait YPSK kromatogramı; UV₂₁₀

Kateşin, AML-1 ve AML-2 bileşiklerinin retansiyon zamanları (çizelge 3.5) ve UV spektrumları ekstrelerle karşılaştırıldığında *A.mollis* ve *A.persica*'nın toprak üstü kısımlarında AML-1 ve AML-2; *A.mollis* ve *A.persica*'nın kök ekstrelerinde ise kateşin olduğu tespit edildi. Kateşinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu şekil 3.27'de verilmiştir.

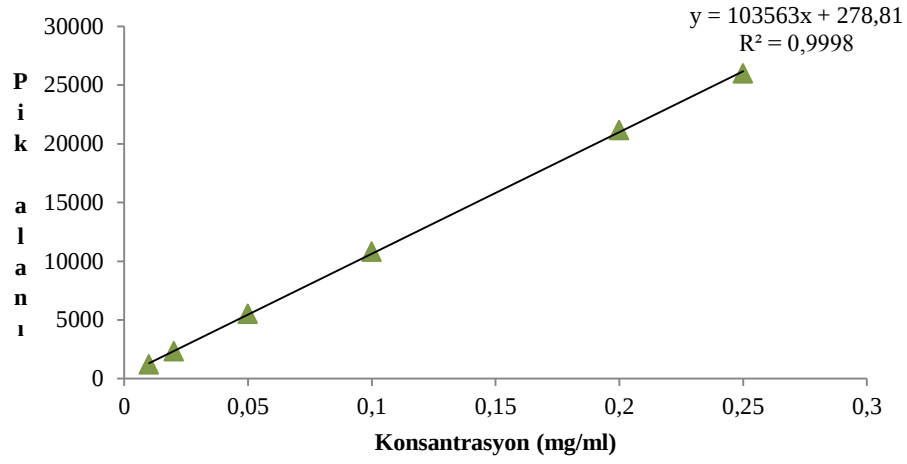
Çizelge 3.5. Standart maddelerin (AML-1, AML-2, Kateşin) retansiyon zamanları (dk)

	Standart madde		
	Kateşin	AML -1	AML-2
Retansiyon zamanları	23,44	40,75	42,25

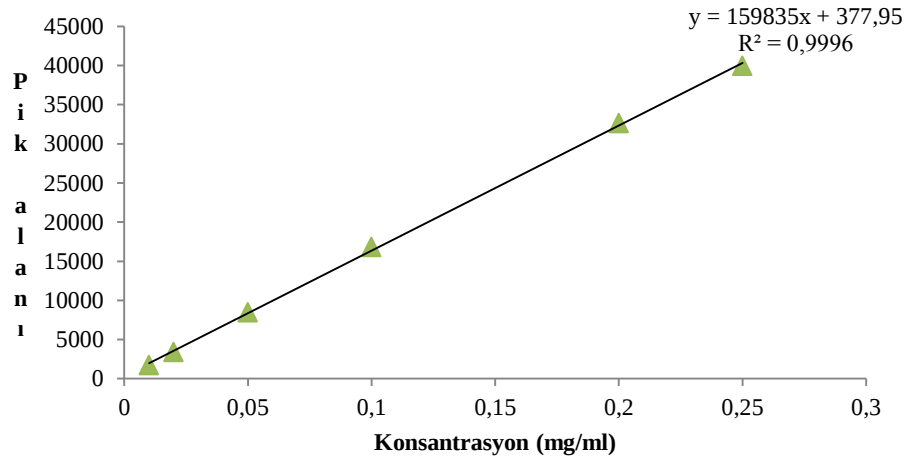


Şekil 3.27. Kateşinin 210 nm'deki YPSK kromatogramı ve UV spektrumu

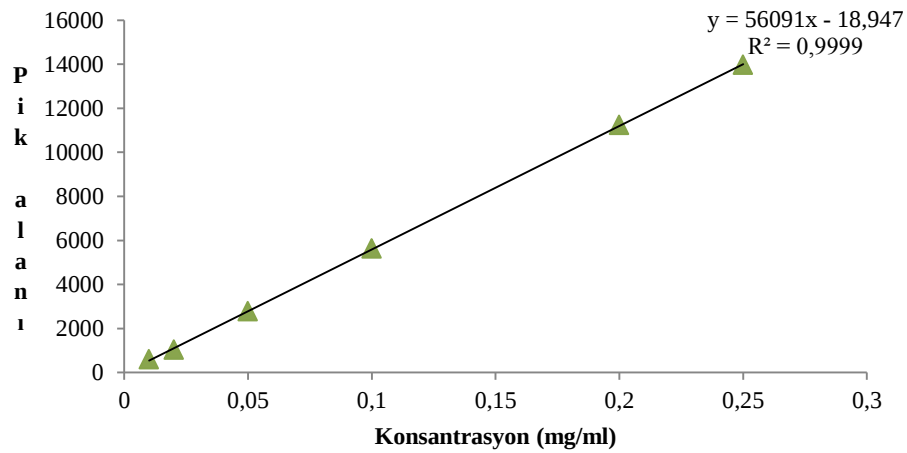
Maddelerin farklı konsantrasyonlarının YPSK analizleri sonucu elde edilen pik alanlarının ortalaması alındı. Konsantrasyonlar ve pik alanlarının ortalamaları kullanılarak kalibrasyon grafikleri ve kalibrasyon denklemleri oluşturuldu (Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30).



Şekil 3.28. Kateşin için kalibrasyon grafiği ve denklemi



Şekil 3.29. AML-1 bileşiği için kalibrasyon grafiği ve denklemi



Şekil 3.30. AML-2 için kalibrasyon grafiği ve denklemi

Kateşin için elde edilen kalibrasyon denkleminde *A.mollis* ve *A.persica* kök ekstraktlarındaki kateşinin pik alanı değerleri yerine konularak ekstraktlardaki kateşin miktarları hesaplandı. *A.mollis* ve *A.persica* toprak üstü kısım ekstraktlarında tespit edilen AML-1 ve AML-2 maddelerinin pik alanı değerleri AML-1 ve AML-2'ye ait kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak her bir ekstrakttaki miktarları hesaplandı (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. *Alchemilla* türlerinin kateşin, AML-1 ve AML-2 miktarları

	Bitki kısımlarındaki madde miktarları (g/100 g bitki materyali)		
	Kateşin	AML-1	AML-2
<i>A.mollis</i> (toprak üstü kısım)	-	1,56±0,01	0,39±0,02
<i>A.mollis</i> (kök)	3,11±0,37	-	-
<i>A.persica</i> (toprak üstü kısım)	-	1,23±0,01	0,34±0,00
<i>A.persica</i> (kök)	6,69±0,05	-	-

Referans maddelerin LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü oranı sırasıyla 3 ve 10 olacak şekilde hesaplandı. Kateşin, AML-1 ve AML-2 için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri çizelge 3.7'de verildi.

Çizelge 3.7. Kateşin, AML-1 ve AML-2'ye ait LOD ve LOQ değerleri

	Standart maddeler		
	Kateşin	AML-1	AML-2
LOD (µg/ml)	0,152	2,6740	0,249
LOQ (µg/ml)	0,508	8,913	0,829

2.2.2. Biyoaktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

2.2.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Yapılan antibakteriyel ve antifungal aktivite tayinlerine ait MİK değerleri çizelge 3.8. ve çizelge 3.9.'da verilmiştir.

Ekstreler ve maddeler test edilen konsantrasyon aralığında *E.coli* ATCC 25922 bakterisine karşı antibakteriyel etki göstermemiştir. Çalışılan her iki *Alchemilla* türünün de toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrenin *B.subtilis* ATCC 6633 suşuna karşı antibakteriyel etkisi saptanmamıştır.*E.faecalis* ATCC 29212 suşuna karşı *A.mollis* kök ekstresi antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Aktivite gösteren ekstrelerin MİK değerleri 2,5-10 mg/ml arasında tespit edilmiştir.

Çizelge 3.8. Ekstrelerin test edilen mikroorganizmalar için MİK değerleri (mg/ml)

Ekstreler		Test edilen mikroorganizmalar için MİK değerleri (mg/ml)					
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
<i>A.persica</i>	Kök	5	10	2.5	-	10	10
	Toprak üstü kısım	5	5	-	-	5	10
<i>A.mollis</i>	Kök	5	-	10	-	10	10
	Toprak üstü kısım	5	5	-	-	10	-

Çizelge 3.9. İzole edilen maddelerin test edilen mikroorganizmalar için MİK değerleri (mg/ml)

Maddeler	Test edilen mikroorganizmalar için MİK değerleri (mg/ml)					
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
AML-1	1.25	-	5	-	-	2.5
AML-2	4	-	-	-	4	4

AML-1 ve AML-2 bileşikleri *E.faecalis* ATCC 29212 ve *E.coli* ATCC 25922 suşlarına karşı aktivite göstermemiştir.AML-1 bileşiğinin *P.aeruginosa* ATCC 27853; AML-2 bileşiğinin ise *B.subtilis* ATCC 6633 suşlarına karşı antibakteriyel etki göstermediği saptanmıştır. Maddeler için tespit edilen diğer MİK değerleri 1,25-4 mg/ml konsantrasyon aralığında tespit edilmiştir.

S.aureus ATCC 29213 suşu üzerinde *A.mollis* toprak üstü kısımlarından izole edilen, aynı zamanda *A.persica* toprak toprak üstü kısımlarında da tespit edilen AML-1 ve

AML-2 bileşiklerinin aktivite göstermesi bitki ekstralarının antimikrobiyal etkisine bu maddelerin katkısının olduğunu düşündürmektedir.

AML-2'nin, *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerinde *A.mollis* toprak üstü kısım ekstresinden çok daha düşük konsantrasyonda etki göstermiştir.

C.albicans ATCC 10231 üzerinde *A.mollis* toprak üstü ekstresi haricindeki ekstralar için MİK değerleri 10 mg/ml olarak tespit edilmiş; AML-1 ve AML-2 bileşikleri için ise MİK değerleri sırasıyla 2,5 ve 4 mg/ml olarak bulunmuştur.

4.TARTIŞMA

Alchemilla cinsi dünyanın bir çok yerinde yayılış göstermekle birlikte ülkemizde Kuzey ve Doğu Anadolu bölgesinde yetişmekte ve 74 türle temsil edilmektedir. Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı olan ancak ülkemizde yetişmeyen *A.vulgaris* dahilen jinekolojik problemlerde, gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında, iltihabi rahatsızlıklarda; haricen ise ekzema ve kızarıklık gibi cilt problemlerinde yetiştiği bölgelerde kullanılmaktadır. Aynı cinse ait bir diğer tür olan *A.mollis* de Avrupa'da "Herba Alchemilla" isimli ticari preparatı halinde geleneksel tedavide anstrenjan, diüretik, antispazmodik olarak ve şiddetli menstrüasyon ile yara tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Erzincan, Kop Geçidi'nden toplanan *A.persica* ile Sivas,Sarıyar'dan toplanan *A.mollis* bitkileri üzerinde farmakognozik araştırmalar yapılmış, her iki türün toprak üstü kısımlarıve kökleriAvrupa Farmakopesi'nin *A.vulgaris* için belirlediği kalite özellikleri açısından test edilmiştir. Bu amaçla tanen içerikleri ayrıca total fenol miktarları tayin edilmiş ve ince tabaka kromatografisi ile klorojenik asit ve kafeik asit analizleri yapılmıştır.Tanen miktar tayini pirogallolun alınamaması sebebiyle gallik asit üzerinden yapılmıştır.

A.mollis ve *A.persica* bitkilerinin toprak üstü kısım ve köklerinin tanen içerikleri sırasıyla % 17,41; 6,76 ve 15,76; 16,46 olarak bulunmuştur. Avrupa Farmakopesi'ne göre en az % 6 olması gereken değerin üzerinde olması nedeniyle tanen içeriği açısından her iki türün de farmakopeye uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir. Ülkemizde yetişmekte olan her iki türün de ESCOP ve Komisyon E monograflarınca onaylanmış antidiyareik kullanım için tanen içerikleri açısından uygun olduğu düşünülmektedir.

İnce tabaka kromatografisi analizlerinde her iki bitkinin de kök ve toprak üstü kısımları, referans olarak seçilen kafeik asit, klorojenik asit, hiperozit ve rutin ile

karşılaştırılmıştır. Kök ekstrelerinde klorojenik asit, toprak üstü kısımlarında ise hiperozit varlığı tespit edilmiştir. Avrupa Farmakope'sine göre *A.vulgaris* toprak üstü kısımlarında kafeik asit ve klorojenik asit bulunmaktadır. Ancak bu çalışmada kullandığımız *A.mollis* ve *A.persica*'nın toprak üstü kısımlarında bu bileşiklere rastlanmamıştır. İTK analiz sonuçları YPSK sonuçları ile de doğrulanmıştır.

A.mollis bitkisinin toprak üstü kısımlarından yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda etil asetatlı fazdan silikajel ve sefadeks kolon kromatografileri kullanılarak kersetin-3-glukuronit (mikuelianin) ve elajik asit bileşikleri izole edilmiştir. İzole edilen maddelerin yapı tayini spektroskopik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

A.mollis ve *A.persica* toprak üstü kısımlarında ve köklerinde YPSK analizleri yapılarak izole edilen bileşiklerin ve ayrıca kateşinin miktar tayini yapılmıştır. Bitkilerin toprak üstü kısımlarında kersetin-3-glukuronit sırasıyla; 0,39 ve 0,34 g/100 g bitki materyali; elajik asit 1,56 ve 1,23 g/100 g bitki materyali olarak saptanmıştır, kateşin tespit edilmemiştir. Kök ekstrelerinde ise yalnızca kateşin tespit edilmiş ve miktarları sırasıyla 3,11 ve 6,69 g/100 g bitki materyali olarak hesaplanmıştır.

Kersetin-3-glukuronit bileşiği daha önce yapılan çalışmalarda *A.vulgaris*, *A.achtarowi* ve *A.mollis* bitkilerinden izole edilmiş olan bir flavonoidtir. *A. vulgaris* toprak üstü kısmında başlıca bulunan flavonoid olarak rapor edilmiştir. Yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında mikuelianin bileşiğinin DPPH radikal süpürücü etki gösterdiği (Shirai ve ark., 2006), arteriosklerozda rol alan vasküler endotel hücre adezyon molekülleri ve kemokinlerin antiinflamatuvar nedenli artışını inhibe ettiği (Lodi ve ark., 2009; Tribolo ve ark., 2008), antiödem etki gösterdiği ve vasküler permeabiliteyi azalttığı (Fan ve ark., 2011), sitokinle stimule edilmiş COX-2 ekspresyonunu doza bağlı olmaksızın inhibe ettiği (O'Leary ve ark., 2004), antidepresan ve anti-stres aktiviteye sahip olduğu (Nugroho ve ark., 2014) rapor edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında kersetin-3-glukuronitin antimikrobiyal aktivitesi (MIK değerleri) *Streptococcus mitis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ve *Porphyromonas gingivalis* için 0,25 mg/ml'nin üzerinde,

Fusobacterium nucleatum için ise 0,25 mg/ml olarak bulunmuştur (Shahzad ve ark., 2015). Bu çalışmada ise *S. aureus* ATCC 29213, *P. Aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* ATCC 10231 üzerinde 4 mg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Elajik asit varlığı *Alchemilla* türleri yapılan fitokimyasal çalışmalarda *A.vulgaris* toprak üstü kısmında YPSK-KS yöntemiyle tespit edilmiştir. Elajik asitin çok sayıda biyolojik aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Kardiyovasküler etkilerinin araştırıldığı in vitro çalışmalarda; prostoglandin indüklü insan monositleri üzerinde prostoglandin ve prostoglandin sentezinde rol oynayan enzimlerin seviyelerini azaltarak antienflamatuar etki gösterdiği, endotel matriks metalopeptidaz-12 aktivitesi göstererek anjiyogenezi engellediği, sıçan aort düz kas hücrelerinde hücre proliferasyonunu ve hücre siklusunu baskılayarak ve tirozinkinazı inhibe ederek aterosklerotik plak oluşumunu engellediği, insan aort endotel hücrelerinde ICAM-1 (Hücre içi adezyon molekülü) ve VCAM-1 (Vasküler hücre adezyon molekülü) ekspresyonu ile oksijen radikali formasyonunu inhibe ederek antienflamatuar ve kardiyoprotektif etki gösterdiği bulunmuştur. Elajik asitin anjiyoprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada in vitro olarak LDL (Düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Larrosa ve ark., 2010). İnsan ağız, kalın barsak ve prostat tümörleri üzerinde yapılan bir çalışmada; elajik asitin 12,5-100 µl/ml doz aralığında ağız tümörlerindeki proliferasyonu %26-88; kolon kanseri hücrelerinde %14-76; prostat tümörlerinde ise %43-94 oranında inhibe ettiği görülmüştür (Seeram ve ark., 2005). Başka bir çalışmada ise elajik asitin 1-100 µmol/L doz aralığında insan akciğer, kalın barsak, meme ve prostat kanseri hücrelerinde sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (Sepulveda ve ark., 2011). Antimikrobiyal etkinliğine dair çalışmalar da bulunmaktadır. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Bacteroides forsythus* gibi ağız patojenlerinin gelişimini inhibe ettiği (Loo ve ark., 2010), *Staphylococcus epidermatis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella typhi* bakterilerine karşı gentamisin ve neomisin ile kıyaslandığında daha güçlü antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Ghudhaib

ve ark., 2010). Ayrıca *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*'a karşı 1.25 mg/ml (Cai ve Wu, 1996), *S.aureus* ATCC 9538 *S.epidermidis* NCTC 11047 *Micrococcus luteus* NCTC 9341 *E.coli* NCTC 8196 *B.subtilis* ATCC 6633 *C.albicans* ATCC 10231'e karşı 0.31-2.5 mg/ml konsantrasyon aralığında (Thiem ve Goslinska, 2004), *H.pylori* G21ve *H.pylori* 10K'ye sırasıyla 0.002mg/ml ve 0.01 mg/ml (Martini ve ark., 2009) konsantrasyonda antimikrobiyal etkinlik görüldüğü bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında ise elajik asitin *S. aureus* ATCC 29213, *B. subtilis*ATCC 6633ve *C. albicans*ATCC 10231 mikroorganizmalarına karşı MİK değerleri sırasıyla 1.25, 5 ve 2.5 mg/ml olarak belirlenmiştir.

A.mollis ve *A.persica* bitkilerinin toprak üstü kısımları ve kökleri ile *A.mollis* toprak üstü kısımlarından izole edilen kersetin-3-glukuronit ve elajik asitin antimikrobiyal aktiviteleri bu çalışmada toplamda 5 bakteri ve 1 maya üzerinde test edilmiştir. Ekstrelerde antimikrobiyal aktivitenin izole edilen maddelerden daha yüksek konsantrasyonda görülmesi, izole edilen bileşiklerin bitkinin aktivitesine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Yara iyileştirici etkinlikleri için kullanılan *Alchemilla* türlerinin antimikrobiyal etkilerinin de yara iyileşmesinde rolü olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Alchemilla türleri üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında fitokimyasal açıdan zengin oldukları ve çok sayıda biyolojik etkilerinin olduğu görülmektedir. Üzerinde en fazla çalışma yapılan ve Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı olan tür *A.vulgaris* olmasına karşın bu tür Türkiye'de yetişmemektedir. Bununla birlikte Türkiye'de yetişen *Alchemilla* cinsleri üzerindeki çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu çalışma, ülkemizde yetişen *A.mollis* ve *A.persica* türlerinin Avrupa Farmakopesi'ne uygunluğunun araştırılarak *A.vulgaris* ile karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu türler, üzerinde yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması, ülkemizde yaygın olarak yetişen türler olmaları ve geleneksel kullanımları göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

Alchemilla türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar flavonozit, tanen ve proantosiyanidin gibi fenolik bileşikler açısından zengin olduklarını ortaya koymaktadır. Biyoaktivite çalışmaları ise bu bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal, yara iyi edici, antienflamatuar, anstrejanetkili olduklarını ve jinekolojik hastalıklarda kullanılabileceklerini göstermektedir.

Yapılan antimikrobiyal aktivite çalışma sonuçları literatür verileri ile karşılaştırıldığında yapılan diğer çalışmalarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bitkilerin toprak üstü ve kök ekstreleri ile izole edilen maddelerin antimikrobiyal aktivite çalışmaları paralel olarak yürütülmüş, kersetin-3-glukuronit ve elajik asitin bu bitkilerdeki antimikrobiyal etkiden sorumlu bileşikler olabileceği görülmüştür.

A.mollis ve *A.persica* bitkilerinde Avrupa Farmakopesi esas alınarak tanen miktar tayini ve ince tabaka kromatografisi analizleri yapılmıştır. Her iki türün de *A.vulgaris*'in etkisinden sorumlu olduğu düşünülen tanen içeriği açısından Avrupa Farmakopesi standartlarına uygun olduğu ortaya konmuştur. Komisyon E ve ESCOP monograflarınca onaylanmış antidiyareik kullanımı için *A. mollis* ve *A. persica*

türleri tanen içerikleri açısından uygundur. Ayrıca *A.vulgaris*'in majör flavonoit türevi mikuelianin bileşiminin her iki türün de toprak üstü kısımlarında bulunan majör bileşikler arasında yer aldığı tespit edilmiştir. Ancak toprak üstü kısımlarında Avrupa Farmakopesi'ne göre bulunması gereken kafeik asit ve klorojenik asit her iki türde de bulunamamıştır. Antidiyareik etkinlik dışındaki biyolojik etkiler için bu iki türün *A.vulgaris* yerine kullanımının belirlenebilmesi için etkiden sorumlu maddelerinin belirlenmesi ve biyolojik aktivite testlerinin yapılması gerekmektedir.

Bu çalışma Türkiye'de yetişen *A.mollis* ve *A.persica* bitkilerinin fitokimyasal içeriklerinin aydınlatılmasına ve ülkemizde yetişen diğer *Alchemilla* türleri üzerindeki çalışmalara yol gösterici olacaktır. *Alchemilla* türleri üzerindeki fitokimyasal çalışmaların ve biyolojik aktivite çalışmalarının yetersiz olduğu görülmektedir. Daha ayrıntılı çalışmaların yapılması bu konudaki bilimsel eksikliğin giderilmesi açısından önemlidir.

ÖZET

Türkiye'de Yetişen Bazı *Alchemilla* Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Alchemilla L. cinsi Rosaceae familyasına ait olup Türkiye'de 74 tür ile temsil edilmektedir. Bu türler özellikle Kuzey ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış göstermektedir. Bu cins içinde en fazla çalışılan tür *A.vulgaris*'tir. Ülkemizde yetişen *Alchemilla* türleri ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle Türkiye'de yetişen *A.mollis* ve *A.persica* bitkileri tez konusu olarak seçilmiş; farmakopeye uygunluğunun, fitokimyasal içeriğinin ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bitkilerin toprak üstü kısımları ve kökleri araştırılarak tanen miktar tayini ve ince tabaka kromatografisi analizleri Avrupa Farmakopesi 6.0'a göre gerçekleştirilmiştir. Tanen miktar tayini sonuçları farmakopeye uygunluk göstermiştir.*A.mollis* bitkisinin toprak üstü kısımlarında izolasyon çalışmaları yapılmış, kolon kromatografisi kullanılarak iki bileşik izole edilmiştir. İzole edilen maddelerin yapı aydınlatmaları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve LC/KS spektroskopik yöntemleri ile yapılarak kersetin-3-glukuronit (mikuelianin) ve elajik olarak tespit edilmiştir.

A.mollis ve *A.persica*'nın toprak üstü kısım ve kök ekstreleri ile izole edilen maddelerin antimikrobiyal aktivitesi 5 farklı bakteri ve bir maya üzerinde mikrodilüsyon yöntemiyle test edilmiştir. *A.mollis* toprak üstü kısımları, kökleri; *A.persica* toprak üstü kısımları, kökleri; elajik asit ve kersetin-3-glukuronit *S.aureus*'a karşı; *A.persica* toprak üstü kısımları, kökleri ile *A.mollis* toprak üstü kısımları *E.faecalis*'e karşı; *A.mollis* ve *A.persica* kökleri ile elajik asit *B.subtilis*'e karşı; *A.mollis* toprak üstü kısımları, kökleri; *A.persica* toprak üstü kısımları, kökleri ile kersetin-3-glukuronit *P.aeruginosa*'ya karşı; *A.mollis* toprak üstü kısımları; *A.persica* toprak üstü kısımları, kökleri; elajik asit ve kersetin-3-glukuronit ise *C.albicans*'a karşı etkili bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler:*Alchemilla*, *Alchemilla mollis*, *Alchemilla persica*, Rosaceae, fitokimya

SUMMARY

Pharmacognostical Studies on Some *Alchemilla* species Growing in Turkey

The genus *Alchemilla* L. which belongs to Rosaceae family, is represented with 74 species in Turkey. These species are distributed especially at the North and East Anatolia. *A. vulgaris* is the most studied species in this genus. Number of studies on *Alchemilla* species which grow in Turkey, are limited. Therefore, Turkish species *A. mollis* and *A. persica* has been selected as subjects and aimed to determine of pharmacopoeial compatibilities; phytochemical compositions and antimicrobial activities.

Aerial parts and stems of the plants were analyzed according to European Pharmacopoeia 6.0, determined their tannin contents and performed their thin layer chromatography analyses. Results of tannin determination were observed to compatibility with pharmacopoeia. Isolation studies were performed on aerial parts of *A. mollis* and two compound were isolated by using column chromatography. The structures of the isolated compounds were determined by using spectroscopic methods such as $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and LC/MS and detected as quercetin-3-glucuronide (miquelianin) and ellagic acid.

Antimicrobial activity of extracts of aerial parts and stems of *A. mollis* ve *A. persica* and isolated compounds were tested on 5 different bacteria and one yeast by microdilution method. Antimicrobial activities was found on aerial parts and stems of *A. mollis* and *A. persica*, ellagic acid and quercetin-3-glucuronide against to *S. aureus*; on aerial parts and stems of *A. persica*, aerial parts of *A. mollis* against to *E. faecalis*; on stems of *A. mollis* ve *A. persica* and ellagic acid against to *B. subtilis*; on aerial parts and stems of *A. mollis* and *A. persica* and quercetin-3-glucuronide against to *P. aeruginosa*; on aerial parts of *A. mollis*, aerial parts and stems of *A. persica*, ellagic acid and quercetin-3-glucuronide against to *C. albicans*.

Keywords: *Alchemilla*, *Alchemilla mollis*, *Alchemilla persica*, Rosaceae, phytochemistry

KAYNAKLAR

- AKBULUT S, BAYRAMOGLU MM (2013). The trade and use of some medical and aromatic herbs in Turkey. *EthnoMedicine*, **7(2)**: 67-77.
- AKBULUT S, BAYRAMOGLU MM (2014). Reflections of socio-economic and demographic structure of urban and rural on the use of medicinal and aromatic plants: the sample of Trabzon Province. *EthnoMedicine*, **8(1)**: 89-100.
- AKBULUT S, OZKAN ZC (2014). Traditional usage of some wild plants in Trabzon region (Turkey). *Kastamonu Univ. Journal of Forestry Faculty*, **14(1)**: 135-145.
- ALTUNDAG E, OZTURK M (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Social and Behavioral Sciences*, **19**: 756-777.
- AVRUPA FARMAKOPESİ 6.0 (2007). Council of Europe, Strasbourg.
- AYAZ FA, HAYIRLIOGLU-AYAZ S, BEYAZOGLU A (1999). Fatty acid composition of leaf lipids of some *Alchemilla* L. (Rosaceae) species from Northeast Anatolia (Turkey). *Grasas y Aceites*, **5**: 341-344.
- AYMERICH P, SAEZ L (2015). *Alchemilla cadinensis* (Rosaceae), a new species from the Pyrenees (SW Europe). *Wildenowia*, **45**: 435-442.
- BABAYAN MS, CHELOMBITKO VA (2007). Amino acid and mineral compositions of *Alchemilla tredecimbola*. *Chemistry of Natural Compounds*, **43(2)**: 241-242.
- BAYTOP (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi . 2.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri LTD ŞTİ.
- BENAIGES A, MARCET P, ARMENGOL R, BETES C, GIRONES E (1998). Study of a plant complex. *International Journal of Cosmetic Science*, **20**: 223-230.
- BURUK K, SOKMEN A, AYDIN F, ERTURK M (2006). Antimicrobial activity of some endemic plants growing in the Eastern Black Sea Region, Turkey. *Fitoterapia*, **77**: 388-391.
- CAI L, WU CD (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, **59**: 987-990.

- CLAIR S (2009). Lady's Mantle: A woman's best friend, *Journal of New Zealand Association of Medical Herbalists*, **Summer**: 14-15.
- COND RAT D, MOSOARCA C, ZAMFIR AD, CRISAN F, SZABO MR, LUPEA AX (2010). Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Central European Journal of Chemistry*, **8(3)**: 530-535.
- COND RAT D, SZABO MR, CRISAN F, LUPEA AX (2009). Antioxidant activity of some phanerogam plant extracts. *Food Science and Technology Research*, **15(1)**: 95-98.
- D'AGOSTINO M, DINI I, RAMUNDO E, SENATORE F (1998). Flavonoid glycosides of *Alchemilla vulgaris* L. *Phytotherapy Research*, **12**: 162-163.
- DAVIS PH (ed.) (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 4. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- DENEV P, KRATCHANOVA M, CIZ M, LOJEK A, VASICEK O, BLAZHEVA D, NEDELICHEVA P, VOJTEK L, HYRSI P (2014). Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. *Acta Biochimica Polonica*, **61(2)**: 359-367.
- DJIPA CD, DELMEE M, QUERTIN-LECLERCQ J (2000). Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **71**: 307-313.
- DUCKSTEIN SM, LOTTER EM, MEYER U, LINDEQUIST U, STINTZING FC (2013). Phenolic constituents from *Alchemilla vulgaris* L. and *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. at different dates of harvest, *Journal of Biosciences*, **68**: 529-540.
- ERGENE B, BAHADIR ACIKARA O, BAKAR F, SALTAN G, NEBIOGLU S (2010). Antioxidant activity and phytochemical analysis of *Alchemilla persica* Rothm. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara.*, **39(2)**: 145-154.
- ESCOP Monographs, MILLS MS, HUTCHINS R *Alchemilla herba-Alchemilla/Lady's Mantle* (2013). *European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) Monographs*, Online series, ESCOP Notaries House, United Kingdom.
- FALCHERO L, COPPA M, ESPOSTI S, TAVA A (2008). Essential oil composition of *Alchemilla alpina* L. em. Buser from Western Alpine Pastures. *Journal of Essential Oil Research*, **20**: 542-544.
- FALCHERO L, COPPA M, FOSSI A, LOMBARDI G, RAMELLA D, TAVA A (2009). Essential oil composition of lady's mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) growing wild in Alpine pastures. *Natural Product Research*, **23(15)**: 1367-1372.

- FAN D, ZHOU X, ZHAO C, CHEN H, ZHAO Y, GONG X (2011). Anti-inflammatory, antiviral and quantitative study of quercetin-3-O- β -glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L. *Fitoterapia*, **82**: 805-810.
- FRAISSE D, HEITZ A, CARNAT A, CARNAT A-P, LAMAISSON J-L (2000). Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*, *Fitoterapia*, **71**: 463-464.
- GHUDHAIB KK, HANNA ER, JAWAD AH (2010). Effect of ellagic acid on some types of pathogenic bacteria. *Journal of Al-Nahrain University*, **13(2)**: 79-85.
- GUZEL Y, GUZELSEMME M, MISKI M (2015). Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. *Journal of Ethnopharmacognosy*, **174**: 118-152.
- HAYIRLIOGLU S, BEYAZOGLU O (1997). Five new *Alchemilla* (Rosaceae) records for the flora of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, **21(5)**: 309-312.
- KALANKAN G, OZKAN ZC, AKBULUT S (2015). Medicinal and aromatic wild plants and traditional usage of them in Mount Ida (Balıkesir/Turkey). *Journal of Applied Biological Sciences*, **9(3)**: 25-33.
- KAVAL I, BEHCET L, CAKILCIOGLU U (2014). Ethnobotanical study on medicinal plants in Geçitli and its surrounding (Hakkari-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **155**: 171-184.
- KAYA B, MENEMEN Y, SALTAN FZ (2012a). Flavonoids in the endemic species of *Alchemilla* L., (Section *Alchemilla* L. subsection *Calycanthum* Rothm. Ser. *Elatae* Rothm.) from North-East Black Sea region in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, **44(2)**: 595-597.
- KAYA B, MENEMEN Y, SALTAN FZ (2012b). Flavonoid compounds identified in *Alchemilla* L. species collected in the North-Eastern Black Sea region of Turkey. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, **9(3)**: 418-425.
- KESHAVARZI Z, HESAMI Z (2013). Comparison between antifungal effect of *Alchemilla vulgaris* (Paye Shir) with two chemical drugs (Ketoconazole, Fluconazole) on *Candida albicans* and *Malassezia furfur*. 2nd Iranian Congress on Medical Mycology, Shiraz, Iran.
- KISELOVA Y, IVANOVA D, CHERVENKOV T, GEROVA D, GALUNSKA B, YANKOVA T (2006). Correlation between the In vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytotherapy Research*, **20**: (961-965).

- KOMISYON E, KLEIN S, RISTER R, RIGGINS C Lady's Mantle (*Alchemillae herba*) (1998). The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines, American Botanical Council, Germany.
- KRIVOKUCA M, NIKETIC M, MILENKOVIC M, GOLIC N, MASIA CARLA, SCALTRITO MM, SISTO F, KUNDAKOVIC T (2015). Anti-*Helicobacter pylori* activity of four *Alchemilla* species (Rosaceae). *Natural Product Communications*, **10(8)**: 1369-1371.
- KUPELI AKKOL E, DEMIREL MA, BAHADIR ACIKARA O, SUNTAR I, ERGENE B, ILHAN M, OZBILGIN S, SALTAN G, KELES H, TEKIN M (2015). Phytochemical analyses and effects of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *Alchemilla persica* Rothm. in rat endometriosis model. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **292**: 619-928.
- LARROSA M, GARCIA-CONESA MT, ESPIN JC, TOMAS-BARBERAN FA (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 513-539.
- LI XC, ELSOHLY HN, HUFFORD CD, CLARK AM (1999). NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **37**: 856-859.
- LODI F, JIMENEZ R, MORENO L, KROON PA, NEEDS PW, HUGHES DA, SANTOS-BUELGA C, GONZALES-PARAMAS A, COGOLLUDO A, LOPEZ-SEPULVEDA R, DUARTE J, PEREZ-VIZCAINO F (2009). Glucuronated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis*, **204**: 34-39.
- LOO WTY, JIN LJ, CHEUNG MNB, CHOW LWC (2010). Evaluation of ellagic acid on the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay. *African Journal of Biotechnology*, **9(25)**: 3938-3943.
- MAKAU JN, WATANABE K, KOBAYASHI N (2013). Anti-influenza activity of *Alchemilla mollis* extract: Possible virucidal activity against influenza virus particles. *Drug Discoveries & Therapeutics*, **7(3)**: 189-195.
- MARTINI S, D'ADDARIO C, COLACEVICH A, FOCARDI S, BORGHINI F, SANTUCCI FIGURA N, ROSSI C (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **34(1)**: 50-59.
- WICHTL M (2004). *Alchemillae herba*, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis, s: 16.
- MAZZIO EA, SOLIMAN FK (2009). In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. *Phytotherapy Research*, **23**: 385-398.

- MOLLER C, HANSEN SH, CORNETT C (2008). Characterization of tannin-containing herbal drugs by HPLC. *Phytochemical Analysis*, **20**: 231-239.
- MUKEMRE M, BEHCET L, CAKILCIOGLU U (2015). Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Çatak (Van-Turkey). *Journal of Ethnopharmacognosy*, **166**: 361-374.
- MUTAFTCHLEV K, TZACHEV K (2003). Determination of manganese (II) in some medicinal plants and their decoctions by a kinetic spectrophotometric method. *Phytochemical Analysis*, **14**:160-163.
- NEAGU E, PAUN G, ALBU C, RADU GL (2015). Assessment of acetylcholinesterase and tyrosine inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **52**: 1-6.
- NIKOLOVA M, DINCHEVA I, VITKOVA A, BADJAKOV I (2012). Phenolic acids and free radical scavenging activity of *Alchemilla jumrukczalica* Pawl. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, **3(3)**: 802-804.
- NUGROHO A, LEE KT (2014). Quantification of antidepressant miquelianin in mature and immature fruits of Korean *Rubus* species. *Natural Product Sciences*, **20(4)**: 258-261.
- OKTYABRYSKY O, VYSOCHINA G, MUZYKA N, SAMOILOVA Z, KUKUSHKINA T, SMIRNOVA G (2009). Assessment of anti-oxidant activity of plant extracts using microbial test systems. *Journal of Applied Microbiology*, **106**: 1175-1183.
- O'LEARY KA, PASCUAL-TEREASA S, NEEDS PW, BAO YP, O'BRIEN NM, WILLIAMSON G (2004). Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research*, **551**: 245-254.
- OLAFSDOTTIR ES, OMARSDOTTIR S, JAROSZEWSKI JW (2001). Constituents of three Icelandic *Alchemilla* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**: 959-962.
- OZHATAY FN, KULTUR S, GURDAL MB (2011). Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey V. *Turkish Journal of Botany*, **35**: 589-624.
- OZHATAY N, KULTUR S (2006). Check-list of a additional taxa to the supplement Flora of Turkey III. *Turkish Journal of Botany*, **30**: 281-316.
- OZUDOGRU B, AKAYDIN G, ERIK S, YESILADA E (2011). Inferences from an ethnobotanical field expedition in the selected locations of Sivas and Yozgat provinces (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **137(1)**: 85-98.
- PAPER DH, FRANZ G (1998). Use of an extract of *Alchemilla vulgaris* to inhibit angiogenesis, Patent.

- PAWLACZYK I, CZERCHAWSKI L, PILECKI W, LAMER-ZARAWSKA E, GANCARZ R (2009). Polyphenolic -polysaccharide compounds from selected medicinal plants of Asteraceae and Rosaceae families: Chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, **9(77)**: 568-575.
- PLOTNIKOVA MB, ALIEV OI, ANDREEVA VY, VASIL'EV AS, KALINKINA GI (2006). Effect of *Alchemilla vulgaris* extract on the structure and function of erythrocyte membranes during experimental arterial hypertension. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **141(6)**: 708-711.
- POLAT R, CAKILCIOGLU U, KALTALIOGLU K, ULUSAN MD, TURKMEN Z (2015). An ethnobotanical study on medicinal plants in Espiye and its surrounding (Giresun-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **163**: 1-11.
- POLAT R, SATIL F, CAKILCIOGLU U (2011). Medicinal plants and their use properties of sold market in Bingöl (Turkey) district. *Biological Diversity and Conservation*, **4(3)**: 25-35.
- SAGIROGLU M, ARSLANTURK A, AKDEMIR ZK, TURNA M (2012). An ethnobotanical survey from Hayrat (Trabzon) and Kalkandere (Rize/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, **5(1)**: 31-43.
- SAID O, SAAD B, FULDER S, KHALIL K, KASSIS E (2011). Weight loss in animals and humans treated with "Weighlevel" a combination of four medicinal plants used in traditional Arabic and Islamic medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicines*, **2011**: 1-6.
- SARAC DU, OZKAN ZA, AKBULUT S (2013). Ethnobotanic features of Rize/Turkey province. *Biological Diversity and Conservation*, **6(3)**: 57-66.
- SEERAM NP, ADAMS LS, HENNING SM, NIU Y, ZHANG Y, NAIR MG, HEBER D (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**: 360-367.
- SEPP S, PAAL J (1998). Taxonomic continuum of *Alchemilla* (Rosaceae) in Estonia. *Nordic Journal of Botany*, **18(5)**: 519-535.
- SEPULVEDA L, ASCACIO A, RODRIGUEZ-HERRERA R, AGUILERA-CARBO A, AGUILAR CN (2011). Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology*, **10(22)**: 4518-4523.
- SHAHZAD M, MILLHOUSE E, CULSHAW S, EDWARDS CA, RAMAGE G, COMBET E (2015). Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food & Function*, **6**: 719-729.

- SHIRAI M, KAWAI Y, YAMANISHI R, KINOSHITA T, CHUMAN H, TERAOKA J (2006). Effect of conjugated quercetin metabolite, quercetin-3-glucuronide, on lipid hydroperoxide-dependent formation of reactive oxygen species in differentiated PC-12 cells. *Free Radical Research*, **40**(10): 1047-1053.
- SHRIVASTAVA R (2011). Clinical evidence to demonstrate that simultaneous growth of epithelial and fibroblast cells is essential for deep wound healing. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **92**: 92-99.
- SHRIVASTAVA R, CUCUAT N, JOHN GW (2007). Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats. *Phytotherapy research*, **21**: 369-371.
- SHRIVASTAVA R, JOHN GW (2006). Treatment of aphthous stomatitis with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine. *Clinical Drug Investigation*, **26**(10): 567-573.
- SUFKA KJ, ROACH JT, CHAMBLISS WG, BROOM SL, FELTENSTEIN MW, WYANDT CM, ZENG L (2001). Anxiolytic properties of botanical extracts in the chick social separation-stress procedure, *Psychopharmacology*, **153**: 219-224.
- TADDESE S, ASRES K, GEBRE-MARIAM T (2003). Formulation of topical antimicrobials containing the extracts of *Alchemilla pedata* and *Maesa lanceolata*. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, **21**: 13-21.
- TAKIR S, ALTUN IH, SEZGI B, SUZGEC-SELCUK S, MAT A, UYDES-DOGAN BS (2015). Vasorelaxant and blood pressure lowering effects of *Alchemilla vulgaris*: A comparative study of methanol and aqueous extracts. *Pharmacognosy Magazine*, **11**(41): 163-169.
- TAKIR S, SEZGI B, SUZGEC-SELCUK S, EROGLU-OZKAN E, BEUKELMAN KJ, MAT A, UYDES-DOGAN BS (2014). Endothelium-dependent vasorelaxant effect of *Alchemilla vulgaris* methanol extract: a comparison with the aqueous extract in rat aorta. *Natural Product Research*, **28**(23): 2182-2185.
- TANKER N, TANKER M, COŞKUN M (2014). *Farmasötik Botanik*. 4. Baskı. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. p.: 212-214.
- THIEM B, GOSLİŃSKA O (2004). Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia*, **75**: 93-95.
- TOBYN G, DENHAM A, WHITELEGG M (2011). *The Western Herbal Tradition 2000 Years of Medicinal Plant Knowledge*, Churchill Livingstone Elsevier, China.
- TRENDAFILOVA A, TODOROVA M, NIKOLOVA M, GAVRILOVA A, VITKOVA A (2011). Flavonoid constituents and free radical scavenging activity of *Alchemilla mollis*. *Natural Product Communications*, **6**(12): 1851-1854.

- TRENDAFILOVA A, TODOROVA M, GAVRILOVA A, VITKOVA A (2012). Flavonoid glycosides from Bulgarian endemic *Alchemilla achtarowii* Pawl. *Biochemical Systematics and Ecology*, **43**: 156-158.
- TRIBOLO S, LODI F, CONNOR C, SURI S, WILSON VG, TAYLOR MA, NEEDS PW, KROON PA, HUGHES DA (2008). Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, **197**: 50-56.
- TROUILLAS P, CALLISTE CA, ALLAIS DP, SIMON A, MARFAK A, DELAGE C, DUROUX JL (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*, **80**: 399-407.
- TURK M, KAYA B, MENEMEN Y, OGUZTUZUN S (2011). Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells in vitro. *The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*, **5(18)**: 4566-4571.
- VIJAYALAKSHMI A, MADHIRA G (2014). Anti-psoriatic activity of flavonoids from *Cassia tora* leaves using the rat ultraviolet B ray photodermatitis model. *Revista Brasileira de Farmacia*, **24**: 322-329.
- VITKOVA A, NIKOLOVA M, DELCHEVA M, TASHEV A, GAVRILOVA A, ANEVA I, DIMITROV D (2015). Influence of species compositions on total phenolic content and antioxidant properties of *Herba Alchemillae*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **21(5)**: 990-997.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Ekin
Soyadı : KURTUL
Doğum yeri ve tarihi : Sivas – 24.08.1989
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefon :Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim dalı - 0 554 997 31 90

II. Eğitimi

2006-2012 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans Eğitimi)
2003-2006 Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi (Lise Eğitimi)
1995-2003 TED Kayseri Koleji (İlköğretim)

Yabancı Dili İngilizce

III. Ünvanları

2012 - Eczacı

IV. Mesleki Deneyimi

2014 – (Devam Ediyor) Araştırma görevlisi
(Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı)

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI. Bilimsel İlgi Alanları

ATASOY A, KURTUL E, BAHADIR ACIKARA Ö (2015). Isolation and Identification of Flavonoid Glycoside from Aerial Parts of *Zosima absinhifolia* (Vent.) Link. *11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, 9-12 June, Ankara, Turkey.

KURTUL E, KARABAY AZ, BAHADIR ACIKARA Ö, TEKİN M (2015). Antileucemic activity of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and its constituents; hyperoside and isoquercetin. *1th International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy*, 31 August-2 September, Istanbul, Turkey.

VII. Bilimsel Etkinlikleri

Antidepresan Etkili Bitkiler, 2015 (Yüksek Lisans Semineri)

VIII-Diğer Bilgiler