



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI

***Alchemilla pseudocartalinica* Juz. Bitkisi
Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar ve Biyolojik
Aktivite Çalışmaları**

Çağla UZUNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Gülin RENDA

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.... /.... /.....

Çağla UZUNKAYA

İMZA

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve bugün burada olmamı en az benim kadar çok isteyen rahmetli babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, hiçbir zaman desteklerini benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sevgili değerli hocam Prof. Dr. Gülin RENDA ve varlığı, güler yüzü ve destekleri ile Arş. Gör. İçim GÖKKAYA'ya, tezimin ilerleyişinde desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Burak BARUT'a; Arş. Gör. Didem AKKAYA'ya, Arş. Gör. Gökçe SEYHAN'a engin bilgileri ile beni donatan Farmakognozi Ana Bilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

KTÜ Eczacılık Fakültesi dekanımız Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN'e,

Lisans ve yüksek lisans öğrencilik sürecim boyunca bana katkı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki tüm hocalarıma,

Bu süreçte her zaman yanımda olan ve gözlerinin içi her zaman gurula bakan sevgili babama,

Kendisine teşekkür sözü verdiğim, canım çalışma arkadaşım Beyza AYDOĞMUŞ'a,

Tez çalışmamı, “*Alchemilla pseudocartalinica* Juz bitkisi üzerinde fitokimyasal araştırmalar ve biyolojik aktivite çalışmaları” başlıklı, TYL-2023-10648 numaralı proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çağla UZUNKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

vii

ŞEKİLLER DİZİNİ

viii

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xiii

ÖZET

x

ABSTRACT

xi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

4

2.1. Botanik Bilgiler

4

2.1.1. Rosaceae Familyasının Genel Özellikleri

4

2.1.2. *Alchemilla* L. Cinsinin Genel Özellikleri

4

2.1.3. *Alchemilla* L. Cinsine Ait Tayin Anahtarı

9

2.1.3.1. Grup Tayin Anahtarı

9

2.1.3.2. Tür Tayin Anahtarı

9

2.1.4. *Alchemilla pseudocartalinica* Juz. Türünün Botanik Özellikleri

11

2.2. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

12

2.2.1. Fenolik Asitler

12

2.2.2. Tanenler

19

2.2.3. Terpenik Bileşikler

26

2.2.4. Diğerleri

29

2.3. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları

32

2.3.1. Antimikrobiyal Etki

32

2.3.2. Antioksidan Etki

33

2.3.3. Antienflamatuvar Etki

34

2.3.4. Antitümör ve Sitotoksik Aktivite	35
2.3.5. Yara İyi Edici Etki	35
2.3.6. Kadın Hastalıkları Üzerine Etki	36
2.3.7. Antidiyabetik Aktivite	37
2.3.8. Anjiyoprotektif Aktivite	37
2.3.9. Hepatotoksisiteye Karşı Koruyucu Etki	38
2.3.10. Diğer Aktiviteler	38
2.4. <i>Alchemilla</i> Türlerinin Halk Arasında Kullanımı	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM	42
3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	42
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Katı Maddeler ve Çözücüler	42
3.1.2. Bitki Materyali	44
3.1.3. Kromatografik Yöntemler	44
3.1.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi	44
3.1.3.2. Vakum Sıvı Kromatografisi	44
3.1.3.3. Açık Kolon Kromatografisi	45
3.1.3.4. Normal Faz Silikajel Kolon Kromatografisi	45
3.1.3.5. Sefadeks Kolon Kromatografisi	46
3.1.3.6. Ters Faz Silika Jel Kolon Kromatografisi	46
3.1.3.7. Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi	46
3.1.3.8. Poliamit Kolon Kromatografisi	47
3.1.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama	47
3.1.5. İzolasyon Çalışmaları	50
3.1.6. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerikleri	52
3.1.7. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi Çalışmaları	51
3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	52
3.2.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	52
3.2.2. Fosfomolibdenyum İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi	52
3.2.3. Metal Şelat Yapma Kapasitesi	52
3.2.4. Demir İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi	53
3.2.5. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu	53
3.2.6. Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu	53

3.2.7. α -Glukozidaz İnhibitör Etkinlik	54
3.2.8. İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
4.1. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri	55
4.1.1. Kersetin 7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> - β -D-glukuronopiranozit (CAP-1)	55
4.1.2. α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (CAP-2)	61
4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoit İçerik	66
4.3. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi Analiz Sonuçları	67
4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	72
4.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi	72
4.4.2. Fosfomolibdenyum İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi	73
4.4.3. Metal Şelat Yapma Kapasitesi ve Demir İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi	74
4.4.4. α -Glukozidaz ve Tirozinaz İnhibitör Etki	74
4.4.5. Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu	77
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	78
6. KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. <i>Alchemilla</i> türlerinin Türkiye'deki yayılışı	5
Tablo 2a. <i>Alchemilla</i> türlerinde bulunan gallik asit türevleri	13
Tablo 2b. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen benzoik asit türevleri	14
Tablo 2c. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen hidroksisinnamik asit türevleri	15
Tablo 3a. <i>Alchemilla</i> türlerinde bulunan kemferol ve glikozitleri	16
Tablo 3b. <i>Alchemilla</i> türlerinde bulunan kersetin ve glikozitleri	17
Tablo 3c. <i>Alchemilla</i> türlerinde bulunan luteolin, izoramnetin ve türevleri	18
Tablo 3d. <i>Alchemilla</i> türlerinde bulunan apigenin türevleri	19
Tablo 4a. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenler (elajik asit)	20
Tablo 4b. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenler (pedinkulagin ve türevleri)	21
Tablo 4c. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenler	22
Tablo 4d. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen kondanse tanenler (kateşin, epikateşin)	23
Tablo 4e. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen kondanse tanenler	24
Tablo 5a. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen ursolik asit yapısındaki pentasiklik triterpenler	27
Tablo 5b. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilmiş olan triterpenler	28
Tablo 6. <i>Alchemilla</i> türlerindeki diğer bileşikler	30
Tablo 7. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri	43
Tablo 8. Kullanılan aletler ve cihazlar	43
Tablo 9. Ekstrelerin ve alt ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri	66
Tablo 10. Fraksiyonların toplam fenolik içerikleri	67
Tablo 11. LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri	68
Tablo 12. Ekstrelerdeki fitokimyasalların kantitatif tayini (mg/g)	71
Tablo 13. Ekstrelerin, alt ekstrelerin ve fraksiyonların DPPH radikal süpürme aktiviteleri	72
Tablo 14. Ekstrelerin, alt ekstrelerin ve fraksiyonların PRAP değerleri	73

Tablo 15.	Ekstrelerin, alt ekstrelerin ve fraksiyonların tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları	74
Tablo 16.	Fraksiyonların tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları	75
Tablo 17.	Ekstrelerin ve alt ekstrelerin α -glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları	76
Tablo 18.	Fraksiyonların α -glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları	76
Tablo 19.	İzole edilen bileşiklerin α -glukozidaz ve tirozinaz inhibitör etkileri	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Tablo 2a’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti	13
Şekil 2.	Tablo 2b’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti	14
Şekil 3.	<i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen bazı flavonoitler	14
Şekil 4.	Tablo 2c’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti	15
Şekil 5.	Tablo 3a’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti	16
Şekil 6.	Tablo 3b’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti	17
Şekil 7.	Tablo 3c’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti	19
Şekil 8.	Tablo 3d’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti	20
Şekil 9.	Elajik asit	20
Şekil 10.	Tablo 4b’de gösterilen <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenlerin ana iskeleti	21
Şekil 11.	Tablo 4c’de gösterilen <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenlerin ana iskeleti	22
Şekil 12.	Tablo 4d’de gösterilen <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen kondanse tanenlerin ana iskeleti	23
Şekil 13.	Tablo 4d’de gösterilen <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen kondanse tanenlerin ana iskeleti	24
Şekil 14.	Tablo 4d’de gösterilen <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen ursolik asit yapısındaki pentasiklik triterpenlerin ana iskeleti	27
Şekil 15.	<i>A.pseudocartanilica</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarının ekstraksiyon şeması	48
Şekil 16.	<i>A.pseudocartanilica</i> bitkisinin toprak altı kısımlarının ekstraksiyon şeması	48
Şekil 17.	<i>A. pesuedocartalinica</i> toprak üstü kısımlarına ait izolasyon şeması	50
Şekil 18.	Kersetin 7-O- β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukuronopiranozit	55

Şekil 19.	Kersetin 7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> - β -D-glukuronopiranozit (CAP-1)'in ^1H -NMR Spektrumu-55	57
Şekil 20.	Kersetin 7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> - β -D-glukuronopiranozit (CAP-1)'in ^{13}C -NMR Spektrumu	58
Şekil 21.	Kersetin 7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> - β -D-glukuronopiranozit (CAP-1)'in 2-D COSY Spektrumu	59
Şekil 22.	Kersetin 7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> - β -D-glukuronopiranozit (CAP-1)'in HSQC Spektrumu	60
Şekil 23.	α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit	61
Şekil 24.	α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (CAP-2)'in ^1H -NMR Spektrumu	62
Şekil 25.	α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (CAP-2)'in ^{13}C -NMR Spektrumu	63
Şekil 26.	α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (CAP-2)'in 2-D COSY Spektrumu	64
Şekil 27.	α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (CAP-2)'in 2-D HSQC Spektrumu	65
Şekil 28.	LC-MS/MS yöntemi ile incelenen standart fenolik bileşikleri gösteren kromatogram, (kök metanol ekstresi ve toprak üstü metanol ekstresi) ile LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen ekstrelerin kromatogramı	70

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin transaminaz
AST	Aspartat transaminaz
Caco-2	Kolon kanseri hücre hattı
CH ₂ Cl ₂	Diklorometan
<i>d</i>	Dublet
<i>dd</i>	Dublet dublet
DPPH	1,1-difenil-2-pikrihidrazil radikali
dk	Dakika
E	Endemik
<i>g</i>	Gram
GK-KS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GK-KS)
HMBC	Heteronükleer Çoklu Bağ Kolerasyonu
HSQC	Heteronükleer Tek Kuantum Tutarlılığı
Hz	Hertz
IC ₅₀	Yüzde ellisini inhibe eden konsantrasyon
İTK	İnce tabaka kromatografisi
<i>J</i>	Etkileşme sabiti
<i>k</i>	Kuartet
KK	Kolon kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
<i>m</i>	Multiplet
M _A	Moleküler ağırlık
mg	Miligram
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
Mhz	Megahertz
mL	Mililitre
MS	Kütle spektroskopisi
NMR	Nükleer manyetik rezonans

OBSK	Orta basınçlı sıvı kromatografisi
PC-3	Prostat kanseri hücre hattı
s	Singlet
t	Triplet
UV	Ultraviyole
VSK	Vakumlu sıvı kromatografisi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
¹³C-NMR	¹³ C Nükleer Manyetik Rezonans
¹H-NMR	¹ H Nükleer Manyetik Rezonans

ÖZET

***Alchemilla pseudocartalinica* Juz. Bitkisi Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları**

Alchemilla cinsi (Rosaceae) Türkiye’de 26’sı endemik 78 türle temsil edilmektedir. Bazı *Alchemilla* türleri halk arasında öksürükte, astımda, bronşitte ve yara iyi edici olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar *Alchemilla* türlerinden fenolik ve terpenik yapıda bileşikler izole edilmiştir. Ülkemizde doğal olarak yetişen türlerden biri olan ve yapılan etnobotanik araştırmalarda Doğu Anadolu Bölgesi’nde ishale karşı, diüretik ve tonik olarak kullanıldığı kaydedilen *Alchemilla pseudocartalinica* Juz. üzerinde yapılmış bir izolasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Tez kapsamında *A. pseudocartalinica*’nın çeşitli biyolojik aktivitelerinin araştırılması ve aktif bulunan ekstrenin fitokimyasal içeriğinin kromatografik tekniklerle aydınlatılması amaçlanmıştır.

A. pseudocartalinica türünün toprak üstü kısımlarından ve köklerinden %80 metanol ekstraktları ve ham ekstraktlardan sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile alt ekstraktlar elde edilmiştir. *n*-Hekzan, diklorometan, *n*-butanol ve su alt ekstraktlarının asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, tirozinaz ve α -glukozidaz inhibitör etkinlikleri *in vitro* çalışmalarla araştırılmıştır. Ayrıca tüm ekstraktların fosfomolibdenyum indirgeyici antioksidan kapasitesi (PRAP), metal şelat yapma kapasitesi, demir indirgeyici antioksidan kapasitesi (FRAP) ölçülmüştür. α -Glukozidaz inhibitör aktivitesi en yüksek bulunan su alt ekstresi kolon kromatografisi yöntemleri kullanılarak fraksiyonlanmış ve elde edilen fraksiyonların etkinliği aynı test sisteminde araştırılmıştır. En aktif bulunan fraksiyondaki major maddenin yapısı kersetin 7-*O*- β -D-glukopiranozil-3-*O*- β -D-glukuronopiranozit olarak aydınlatılmıştır. Ayrıca, ekstraktların kimyasal profilinin aydınlatılması için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Toprak üstü metanol ekstresinde elajik asit (38.42 μ g/g) ve kök metanol ekstresinde kateşin (185.30 μ g/g) bileşiklerinin en yüksek oranda bulunan bileşikler olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama, Ekstraksiyon, Enzim İnhibisyonu, Rosaceae

SUMMARY

Phytochemical Studies and Biological Activity Studies on *Alchemilla pseudocartalinica* Juz.

The genus *Alchemilla* (Rosaceae) is represented by 78 species in Turkey, 26 of which are endemic. Some species of *Alchemilla* are used in folk medicine for coughs, asthma, bronchitis, and wound healing. Phenolic and terpenic compounds have been isolated from *Alchemilla* species up to date. No isolation study was found on *Alchemilla pseudocartalinica* Juz., one of the species growing naturally in our country and recorded to be used as a diuretic and tonic against diarrhea in the Eastern Anatolia Region in ethnobotanical studies. Within the scope of the thesis, it was aimed to investigate various biological activities of *A. pseudocartalinica* and to elucidate the phytochemical content of the active extract by chromatographic techniques.

The 80% methanol extracts were obtained from the aerial parts and roots of *A. pseudocartalinica* species, and sub-extracts were obtained from the crude extracts by liquid-liquid extraction method. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, tyrosinase, and α -glucosidase inhibitory activities of *n*-hexane, dichloromethane, *n*-butanol, and water sub-extracts were investigated by *in vitro* studies. In addition, the phosphomolybdenum-reducing antioxidant capacity (PRAP), metal chelating capacity, and iron-reducing antioxidant capacity (FRAP) of all extracts were measured. The water sub-extract with the highest α -glucosidase inhibitory activity was fractionated using column chromatography methods and the activity of the obtained fractions was investigated in the same test system. The structure of the major substance in the most active fraction was elucidated as quercetin 7-O- β -glucopyranosyl-3-O- β -glucuronopyranoside. In addition, LC-MS/MS method was used to elucidate the chemical profile of the extracts. Elagic acid (38.42 $\mu\text{g/g}$) in the aerial part methanol extract and catechin (185.30 $\mu\text{g/g}$) in the root methanol extract were found to be the compounds with the highest content.

Keywords: Antioxidant, Biological Activity Guided Fractionation, Enzyme Inhibition, Extraction, Rosaceae

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde gerek kırsal kesimde gerekse şehirlerde hastalıkların tedavisinde faydalanılan doğal kaynakların önemli bir kısmını bitkiler oluşturmaktadır (1, 2). Pek çok medeniyete ev sahipliği yapmış olan ve bu nedenle zengin etnobotanik bilgi birikimine sahip olan ülkemizin bitki çeşitliliğinin eczacılık bakımından araştırılması ve değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde yayılış gösteren cinslerden biri olan *Alchemilla* L. cinsi, Rosaceae familyası içerisinde sınıflandırılmakta ve dünyada 1000'den fazla (3), Türkiye'de ise 77 *Alchemilla* türü bulunmaktadır (4, 5). Türkiye florası incelendiğinde *Alchemilla* türlerinin çoğunluğunun Kuzey Anadolu Bölgesi'nde yoğun bir şekilde yayılış göstermekle birlikte, ülkenin tamamına dağılmış durumda olduğu görülmüştür (5, 6).

Alchemilla türlerinin geniş yayılışlarına bağlı olarak halk arasında bazı hastalıkların tedavisinde kullanıldıklarına dair literatür verileri bulunmaktadır (7). Avrupa'da yetişen *A. vulgaris* L. türünün toprak üstü kısımlarının halk arasında diüretik, astrenjan, antispazmodik, konvulsif hastalıkların tedavisinde ve aşırı menstürasyonda kür olarak kullanıldığı bildirilmiştir (8). İsveç'te geleneksel halk tıbbında *A. vulgaris*'in toprak üstü kısımlarının inflamatuvar hastalıklara karşı ve yara iyi edici olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (9). İrlanda'da yapılan bir çalışmayla, Kildare bölgesinde *A. vulgaris*'ten hazırlanan bir merhem impetigo tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (10). Aynı türden hazırlanan ekstreler Fransa'da antihemorajik, diyareye karşı ve astrenjan olarak kullanılmakta (11), Estonya'da bitkinin yaprak ve çiçeklerinden soğuk algınlığı, ateş ve boğaz ağrısında yararlanılmaktadır (12). İspanya'nın Katalonya bölgesinde *Alchemilla alpina* L.'nin toprak üstü kısımlarından antimikotik ve ağız boğaz antiseptiği olarak faydalanılmaktadır (13). Ülkemizde yapılan halk ilacı çalışmalarında da *Alchemilla* türlerinin tedavi edici olarak kullanımına rastlanmaktadır. *A. pseudocartalinica* Doğu Anadolu Bölgesinde "yıldız nişanı" olarak bilinmekte ve yaprakları infüzyon şeklinde kabızlıkta, diüretik ve tonik olarak kullanılmaktadır (14) Yozgat ve Sivas'ta *A. mollis* "gürvelik" adıyla bilinmekte ve taze köklerinden gıda maddesi olarak faydalanılmaktadır (15). *A. hessii* bitkisinin ise yapraklarından hazırlanan lapanın Hakkâri'de yara iyi edici olarak kullanıldığı bildirilmiştir (16).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Alchemilla* türlerinden fenolik bileşikler ve terpenik yapıda bileşikler izole edilmiştir (11). *Alchemilla* türlerinin yüksek miktarda tanen yapısında bileşikler içerdiği ve bitkiden farmakopelerde belirtilen yöntemlerle elde edilen tanen içeriğinin büyük bir kısmını pirogallol bileşiğinin oluşturduğu bilinmektedir (17). *Alchemilla* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal analiz ve biyolojik aktivite çalışmaları *A. vulgaris* türü üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu türün fenolik asit (salisilik protokateşik, kafeik, trans-sinamik, gentisik, klorojenik ve vanilik asit), tanen, triterpen (ursolik asit, oleanolik asit) ve flavonoid (rutin, hiperozit, kersitrin, orientin, viteksin) yapısında maddeler içerdiği bulunmuştur (18, 19).

Alchemilla türlerinin antioksidan, antienflamatuar, antiproliferatif ve yara iyi edici etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (7, 8, 11, 18, 19). *A. barbatiflora*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraların antioksidan etkileri, tirozinaz, α -glukosidaz ve asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri incelenmiş, en aktif bulunan su alt ekstresinin fitokimyasal içeriği araştırılmıştır. Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama tekniği ile yapılan çalışmada, su ekstresinin aktif fraksiyonlarından kateşin ve bir kateşin dimer dahil olmak üzere yedi metabolit (prosiyanidin B3, kersetin-3-O- β -D-glukuronik asit (miquelianin), kersetin-3-O- β -D-galaktozit (hiperozit), kersetin-3-O- β -D-arabinozit (guaiaverin), kemferol-3-O- β -D-ksilopiranozit, kemferol-3-O-(6''-kumaroil- β -D-glikozit) (tilirozit) izole edilmiştir (20). *A. vulgaris*'in ticari preparatından hazırlanan metanollü ve sulu ekstralarının serbest radikal süpürücü aktivitesiyle lipid, protein ve DNA oksidasyonuna karşı koruyucu aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada metanol ekstresi 50 μ g/mL konsantrasyonda DPPH'ı %74 oranında inhibe ederken, sulu ekstre 25 μ g/ml konsantrasyonda %77 oranında radikal süpürücü etki göstermiştir. Sulu ekstrenin lipid peroksidasyonu üzerinde metanollü ekstreye göre daha aktif olduğu görülmüştür. Her iki ekstrede de 4 mg/mL konsantrasyonda DNA oksidasyonu üzerine etki çalışmasında maksimum inhibitör etki gözlenmiştir. Sonuçlar *A. vulgaris* ekstralarının antioksidan aktivitesi nedeniyle gıda, kozmetik ve ilaç sanayisinde hammadde olarak kullanılabileceğini göstermektedir (8).

Ülkemizde yetişen *Alchemilla* türlerinin büyük çoğunluğu Karadeniz Bölgesi'nde yayılış göstermektedir. Bu nedenle *Alchemilla* cinsi üzerindeki fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarının artırılması bölgenin bitki popülasyonunun eczacılık bakımından

değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma kapsamında, Trabzon'dan toplanan *Alchemilla pseudocartalinica* türünün enzim inhibitör aktivitesi ile antioksidan etkisinin ve etkidenden sorumlu madde profilinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Rosaceae Familyasının Genel Özellikleri

Rosaceae familyasındaki bitkiler odunsu veya otsu, bazen dikenli yapıdadırlar. Yapraklar alternan, sıklıkla dişli kenarlı, genellikle stipulalı, basit veya birden fazla parçalıdır. Reseptakulum farklılık gösterir, ağaçlarda ve çalılarda sıklıkla kısa sürgünler üzerindedir. Çiçekler hermafrodit ya da tek eşeyli, aktinomorf, perigin ya da epigindir. 4-5 parçalı serbest kaliks, epikaliks bulunur ya da mevcut değildir. 4-5 parçalı ve serbest korolla mevcut ya da değildir. Stamenler 1 ya da 1'den fazla. Ovaryum üst durumludan alt durumluya kadar olabilir, 1 ya da daha fazla karpellidir. Karpeller genelde serbest; stilus terminal, lateral veya ginobaziktir. Meyve etli veya kuru aken, nüks, drupa ya da folikül tipindedir. Meyveler çoğunlukla agregat şekilde olup tohumlar genel olarak endospermasızdır. Bu familya, doğal olarak yetişen çok sayıda meyve ağacı ve onların kültür ortamında yetişmiş formlarını içermektedir. Familya tayin anahtarında *Alchemilla* cinsine ulaşmak için izlenecek basamaklar aşağıda sunulmuştur (21).

1. Yapraklar birleşik, ayrı yaprakçıklar taşır

1. Yapraklar basit, bazen derin loblu ya da tamamen ayrılmış

2. Çalı veya ağaçlar, çiçeklerin petalleri vardır, epikaliks bulunmaz

2. Tek veya çok yıllık otsu bitkiler; çiçekler petalsız; epikaliks bulunur

3. Stamenler 1(-2); küçük, tek yıllık, yoğun karşılıklı yaprakları olan simoz çiçek durumları.....22. *Aphanes*

3. Stamenler 4(-10); çok yıllık, salkım veya panikulalı simoz çiçek durumları.....21. *Alchemilla*

2.1.2. *Alchemilla* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Yaprakları palmat veya kısmi palmat şeklinde çok yıllık otsu, odunsu rizoma sahiptir. Çiçek durumu birleşik simoz şeklindedir. Yaprakları 4(-5) parçalıdır. Hipantiyum urseolat şeklinde, epikalis mevcut, korolla bulunmamaktadır. Petalsız ve stamenler çiçek tablasının dış çevresine yerleşmiş şekilde 4(-5) adettir. Meyvesi tek akenli, bütün ya da parçalı ince kuru hipantiyum ile sarılı durumdadır. Türkiye'de yetişen türlerin çoğunluğu Kuzey

Anadolu’da yayılış gösterirken, yakın türler Kafkasya, Kırım ve/veya İran bölgelerinde bulunur (5). Türkiye’de yayılış gösteren *Alchemilla* türleri Tablo 1’de listelenmiş ve endemik olanlar belirtilmiştir (22).

Tablo 1. Türkiye’de yayılış gösteren *Alchemilla* türleri

<i>Alchemilla</i> Türü	Yetiştği Bölge	Halk Arasında Kullanılan İsmi
<i>A. abchasica</i>	Doğu Karadeniz	Abaza Pençesi
<i>A. akdoganica</i> (E)	Doğu Karadeniz	Doğan Pençesi
<i>A. amoena</i> (E)	Batı Karadeniz	Sinop Pençesi
<i>A. ancerensis</i> (E)	Doğu Karadeniz	Ancer Pençesi
<i>A. armeniaca</i> (E)	Yukarı Fırat Bölümü	Koyak Pençesi
<i>A. ayazii</i> (E)	Doğu Karadeniz	Ayaz Pençesi
<i>A. ayderensis</i> (E)	Doğu Karadeniz	Ayder Pençesi
<i>A. barbatiflora</i>	Doğu Karadeniz	
<i>A. basakii</i> (E)	Doğu Karadeniz	Başak Pençesi
<i>A. beyazogllii</i> (E)	Doğu Karadeniz	Bey Pençesi
<i>A. boluensis</i> (E)	Batı Karadeniz	Bolu Şebnemlisi
<i>A. bornmuelleri</i> (E)	Yukarı Kızılırmak Bölümü	Özge Şebnemli
<i>A. bursensis</i> (E)	Güney Marmara, İç Batı Anadolu	Bursa Pençesi
<i>A. buseriana</i> (E)	Hakkâri, Adana	Berit pençesi
<i>A. caucasica</i>	Güney Marmara, Batı ve Doğu Karadeniz, Erzurum Kars	Kaf şebnemlisi
<i>A. chlorosericea</i>	Doğu Karadeniz	Yeşil pençe
<i>A. cimilensis</i> (E)	Doğu Karadeniz	Cimil keltatı
<i>A. ciminensis</i> (E)	Yukarı Fırat Bölümü	Keşiş keltatı
<i>A. compactilis</i>	Batı ve Doğu Karadeniz, Yukarı Murat-Van, Adana, Hakkari	Aslan pençesi
<i>A. crinita</i>	Erzurum-Kars ve Yukarı Murat-Van Bölümleri	Yivli keltat
<i>A. daghestanica</i>	Karadeniz	Dağ pençesi

Tablo 1. (Devam)

<i>A. dura</i>	Erzurum-Kars ve Yukarı Murat-Van, Karadeniz	Balaban pençesi
<i>A. elevitensis (E)</i>	Karadeniz	Yayla pençesi
<i>A. ellenbergiana</i>	Karadeniz, Kızılırmak, Yukarı Murat-Van	Çayır keltatı
<i>A. epipsila</i>	Karadeniz	Sürmene pençesi
<i>A. erythropoda</i>	Batı ve Doğu Karadeniz, Yukarı Murat-Van ve Erzurum- Kars	Al şebnemli
<i>A. erzincanensis</i>	Yukarı Fırat Bölümü	Erzincan keltatı
<i>A. fissa</i>	Karadeniz	Yarık keltat
<i>A. gigantodus</i>	Karadeniz	Koca keltat
<i>A. glabricaulis (E)</i>	Karadeniz	Köse keltat
<i>A. grossheimii</i>	Karadeniz	Çam keltatı
<i>A. hamzaoglui (E)</i>	Karadeniz	Han pençesi
<i>A. haraldi</i>	Karadeniz	Efe pençesi
<i>A. hayirlioglii (E)</i>	Karadeniz	Hanım pençesi
<i>A. hemsinica (E)</i>	Doğu Karadeniz	Hemşin keltatı
<i>A. hessii</i>	Hakkari	Acem keltatı
<i>A. heterophylla</i>	Batı ve Doğu Karadeniz Yukarı Sakarya, Erzurum-Kars, Yukarı Fırat	Oyalı keltat
<i>A. hirsutiflora (E)</i>	Güney Marmara	Yıldıznişanı
<i>A. hirtipedicellata</i>	Doğu Karadeniz	Kıllıpençe
<i>A. holocycla (E)</i>	Orta Karadeniz, Orta ve Yukarı Kızılırmak, Konya, Yukarı Fırat ve Adana	Top keltat
<i>A. holotricha</i>	Doğu Karadeniz	Kaba keltat
<i>A. ikizdereensis (E)</i>	Doğu Karadeniz	Dere pençesi
<i>A. kackarensis (E)</i>	Doğu Karadeniz	Keltat
<i>A. lithophila</i>	Yukarı Kızılırmak Bölümü	Yıldız pençesi
<i>A. microscopia</i>	Doğu Karadeniz	Yer keltatı

Tablo 1. (Devam)

<i>A. minusculiflora</i>	Karadeniz	Bodur keltat
<i>A. mollis</i>	Güney Marmara, Karadeniz ve Yukarı Kızılırmak Bölümü	Su keltatı
<i>A. monticola</i>	Batı Karadeniz	Yayla keltatı
<i>A. oligotricha</i>	Ege Bölgesi ve Yukarı Kızılırmak Bölümü	Yozgat keltatı
<i>A. orduensis (E)</i>	Orta Karadeniz	Ordu keltatı
<i>A. oriturcica (E)</i>	Yukarı Fırat Bölümü	Türk pençesi
<i>A. orthotricha</i>	Doğu Karadeniz	Dokuztepe
<i>A. oxysepala</i>	Doğu Karadeniz ve Erzurum-Kars	Sivri keltat
<i>A. paracompactilis (E)</i>	Adana	Çayır pençesi
<i>A. pectiniloba</i>	Batı Karadeniz ve Yukarı Sakarya	Dişlipençe
<i>A. percica</i>	Erzurum-Kars, Murat-Van ve Hakkari	Acem şebnemlisi
<i>A. plicatissima</i>	Doğu Karadeniz	Etekli pençe
<i>A. plicatula</i>	Güney Marmara	Etekli keltat
<i>A. porrectidens</i>	Batı Karadeniz	Dişlek keltat
<i>A. procerrima (E)</i>	Yukarı Murat ve Van	Boylu keltat
<i>A. pseudocartalinica</i>	Güney Marmara, İç Batı Anadolu, Karadeniz, Yukarı ve Orta Kızılırmak Erzurum-Kars, Yukarı Murat, Van	Kartal pençesi
<i>A. pseudomollis</i>	Doğu Karadeniz	Esnekpençe
<i>A. rivularis (E)</i>	Adana	Yamaç pençesi
<i>A. retinervis</i>	Doğu Karadeniz ve Orta Karadeniz	Damarlı keltat
<i>A. rizensis (E)</i>	Doğu Karadeniz	Rize keltatı
<i>A. sciadiophylla (E)</i>	Adana	Hatay pençesi
<i>A. sericea</i>	Doğu Karadeniz, Yukarı Murat-Van ve Hakkari	Akpençe
<i>A. sericata</i>	Batı Karadeniz ve Erzurum-Kars	İpek keltatı
<i>A. sintenisii</i>	Doğu Karadeniz	Su pençesi

Tablo 1. (Devam)

<i>A. smirnovii</i>	Doğu Karadeniz	Bayır keltatı
<i>A. speciosa</i>	Doğu Karadeniz	Aslanotu
<i>A. surculosa</i>	Karadeniz Bölgesi, Yukarı Murat-Van Bölümü	Dere keltatı
<i>A. stevenii</i>	Doğu Karadeniz	Kaya keltatı
<i>A. straminea</i>	Batı Karadeniz	İlgaz pençesi
<i>A. stricta (E)</i>	Batı Karadeniz, Erzurum, Kars	Şebnemli
<i>A. tiryalensis (E)</i>	Doğu Karadeniz	Murgul keltatı
<i>A. trabzonica</i>	Doğu Karadeniz	Trabzon keltatı
<i>A. transcaucasica</i>	Doğu Karadeniz	Rize pençesi
<i>A. valdehirsuta</i>	Doğu ve Batı Karadeniz, Erzurum, Kars	Oltu keltatı
<i>A. venosa (E)</i>	Doğu Karadeniz	Otlak pençesi
<i>A. ziganadagensis</i>	Doğu Karadeniz	Zigana keltatı

Avrupa’da geniş yayılış gösteren *Alchemilla* türlerinin eşeysiz ürediği bilinmektedir. Tohumları çiçeğin içerisinde erken geliştiği için polenleri kısmen veya tamamen verimsizdir. Bu durumun Türkiye’de yetişen birçok *Alchemilla* türü için de geçerli olduğu varsayılmaktadır. *Alchemilla* türlerinin tayini için geliştirilmiş olan tayin anahtarı, reseptakulumu ve olgun bazal yaprakları olan ve gelişimini tamamlamış türler için tasarlanmıştır. Mevsim dışı büyüme ya da kesildikten sonraki ikinci büyümede yaprak şekilleri ve tüy yapısı çok farklılık göstermektedir. Yaprak tanımı olgun yaprakları işaret etmekte, sinüs tanımı ise iki bazal lobun kenarları arasındaki açı ya da boşluğu ifade etmektedir. Bazı türlerde loblar arasında belirli belirsiz, dişsiz, V şeklinde (nadiren U şeklinde) kesiler gelişmiştir. Bu kesik bitişindeki dişin uzunluğunun iki katını aştığında uzun olarak tanımlanır. Diş sayısı orta lobun tek tarafından üst dişi dahil etmeden ölçülür. Bu özellikler dikkate alınarak yazılmış olan *Alchemilla* tür tayin anahtarı aşağıda sunulmuştur (5).

2.1.3. *Alchemilla* L. Cinsine Ait Tayin Anahtarı

2.1.3.1. Grup Tayin Anahtarı

1. Yapraklar tabandan ya da tabana yakın kısmi bölünmüş Grup A
1. Yapraklar en fazla 1/2 (2/3) loblanır
2. Sepalleri hipantiyumundan ayırt edici şekilde uzun; epikaliks lobları sepallerinden daha uzun ya da sepalleri kadar uzun (nadiren kısa); akenler hipantiyumundan daha uzun
3. Gövde ve petiyoller patent, erekto-patent tüylü Grup C
3. Gövde ve petiyoller tüysüz veya basık tüylü veya kısmen basık tüylü
4. Hipantiyumların tümü kısmen tüylü Grup D
4. Hipantiyumların tümü tüysüz Grup E
2. Sepaller hipantiyumdan kısa ya da onun kadar uzun; epikaliks lobları çoğunlukla sepallerden kısa; akenler hipantiyumdan biraz uzun ya da değil Grup B

A. pseudocartalinica türü Grup B'ye dahildir. Grup B için tür tayin anahtarı aşağıda verilmiştir (5).

2.1.3.2. Tür Tayin Anahtarı

Grup B

1. Bütün bitki pediselleri dahil bütün uzunluğu boyunca yoğunlukla tüylü
2. Petiollerdeki ve gövdenin alt yarısındaki tüylerin bir kısmı bükülmüş
3. Yaprak lobları $\pm$ trunkat, belirgin dişsiz kesilerle ayrılmış, yaprak dişi 4-5(-6) adet
.....6. erythropoda
3. Yaprak lobları yuvarlak ya da neredeyse üçgen, aralarında derin olmayan dişsiz girintiler bulunur, yaprak dişleri 6-7(-8) adet.....11. lithophila
2. Gövde ve petioller üzerindeki tüyleri basık, bükülmemiş
4. Tüyler genellikle basık ya da kısmen basık 30 cm'ye kadar olan.....4. sericata
4. Tüyler erekto-patent veya patent 10 cm'ye kadar olan bitkiler
5. Tüyler erekto-patent; bazı pediseller tüysüz ya da kısmi tüylü.....10. plicatissima
5. Tüyler erekto-patent veya patent; bütün pediseller patent tüy tabakasına sahip
.....5. caucasia

1. Bitkinin bazı kısımları (bazen pedisellerin sadece yarı ucu ya da yukarı yaprak yüzeyinin bir kısmı) tüysüz
6. Hipantiyum tüylü
 7. Bazı pediseller tüylü, en azından uç kısmı
 8. Yukarı yaprak yüzeyi seyrek ya da parçalı tüylü, bazen tüysüz.....7.surculosa
 8. Yukarı yaprak yüzeyi çoğunlukla yoğun ve eşit dağılmış şekilde tüylü
 9. Gövdenin alt kısmı ve petiollerdeki tüyler erekto-patent; 10 cm'ye kadar boylanan cüce bitki.....10.plicatissima
 9. Gövdenin alt kısmı ve petiollerdeki tüyler basık veya aşağı bükülmüş; 25(-40) cm'e kadar boylanan orta boylu bitkiler
 10. 7-8 lobu olan dış hatta orbikular yapraklar; petiseller değişken tüylü, aynı üzerinde bazen tüylü ve tüysüz.....12.valdehirsuta
 10. 7 lobu olan $\pm$ reniform yapraklar; uç kısımda bütün pediseller tüylü
.....13.groshaini
7. Pedisellerin hepsi tüysüz
 11. Yaprak lobları derin, dişsiz kesilerle ayrılmış; dişler genişliğinden daha uzun
..... 8.pectiniloba
 10. Yaprak lobları arasındaki kesiler küçük ya da hiç yok; dişler genişliği kadar uzun
 12. Gövdenin alt kısımları ve petiollerdeki bazı tüyler aşağı bükülmüş
 13. Dış hatlarda yapraklar orbikular bazal loblar birbirleri üzerinde veya birbirlerine dokunmaktadır.....17.compactilis
 10. Dış hatlarda yapraklar reniform bazal loblar geniş bir biçimde ayrı.....16.crinita
 12. Gövdenin alt kısımları ve petiollerdeki bütün tüyler patent veya erekto-patent
 14. Cüce bitkiler (8 cm'den küçük olanlar); dış hatlarda yapraklar geniş bazal sinüslerle reniform.....9.microscopica
 10. Orta boydan 50 cm' e kadar olan uzun boylu bitkiler; dar veya kapalı bazal sinüslerle yapraklar dış hatlarda orbikular
 15. Gövde ve petiollerdeki tüyler erekto-patent; hipantiyum çok tüylü
..... 15.stevenii
 15. Gövde ve petiollerdeki tüyler patent; hipantiyum kısmen tüylü
.....14.monticola
6. Hipantiyum tüysüz (nadiren az seyrek tüylü)

16. Gövdenin alt kısmı ve petiollerin yaz yaprakları patent veya bükülmüş tüylere sahip
17. Üst yaprak yüzeyi tüysüz veya kısmen tüylü.....18.heterophylla
17. Üst yaprak yüzeyi tüylü
18. Petiollerin bahar yaprakları tüysüz; gövdenin üst yarısı tüysüz (reseptakulumun tamamı dahil olmak üzere).....19.oligotricha
18. Tüm petioller tüylü; gövde en azından ikinci çiçekli dala kadar tüylü
19. Ana hattaki yapraklar orbikular, bazal loblar birbirleri üzerinde veya birbirlerine dokunmaktadırlar.....17.compactilis
19. Dış hattaki yapraklar reniform, bazal loblar geniş bir biçimde ayrı16.crinita
16. Gövde ve yaprak saplarından herhangi biri tüysüz veya basık tüylü veya az basık tüylü
20. Yaprakların altındaki ana damarların merkezden uzak yarısındaki seyrek yatık tüyler ve yaprak dişlerindeki birkaç silya dışında tamamen tüysüz bitki22.straminea
20. En azından petiollerdeki yaz yaprakları, basık veya hafif basık tüylere sahip
21. Ana hattaki yapraklar dar veya kapalı bazal sinüs ile çevrili reniform-orbikular; yaprak dişleri keskin, eşit.....20.minusculiflora
- 21.Ana hattaki yapraklar geniş bazal sinüsler ile çevrili reniform şeklinde olabilir; yaprak dişleri eşit değil subakut veya obtus şekilde olabilir21.pseudocartalinica

2.1.4. *Alchemilla pseudocartalinica* Juz. Türünün Botanik Özellikleri

Orta boyludan uzuna, 50 cm'e kadar boylanan sağlam, çiçekli gövdeye sahip bir bitkidir. İki boğum arasındaki tüyler basıktır, reseptakulum tüysüzdür. Yapraklar hemen hemen reniform, 7 cm genişliğinde, geniş bazal sinüslü, 7-8 loblu, loblar yarım daire veya ters üçgen şeklindedir. Loblar arasında dişsiz kesiler bulunmaz. 5-7(-8) adet yaprak dişi bulunur, özellikle geniş yapraklarda dişler birbirine eşit değildir. Yapraklar subakut, hemen hemen obtus şekillidir. Yaprığın üst yüzeyi tüysüzdür, sadece damarlar üzerinde alt kısımlarda basık tüyler görülür. Petioller çoğunlukla basık tüylüdür (5).

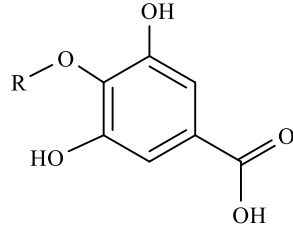
2.2. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Literatürde *Alchemilla* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda *Alchemilla* türlerinde fenolik asit, flavonoid ve tanen yapısında bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ile izole ve karakterize edilen kimyasal bileşikler (fenolik asitler, tanenler, flavonoidler ve diğerleri) derlenerek Tablo 2-6'da verilmiştir.

2.2.1. Fenolik Asitler

Bulgaristan için endemik bir tür olan *Alchemilla jumrukczalica* Pawl ve *Alchemilla vulgaris* bitkilerinin yapraklarının sulu-metanol ekstresi gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kullanılarak (GK-KS) incelenmiş, 10 serbest ve 17 bağlı fenolik asitin varlığı ve miktarları tespit edilmiştir. Her iki bitki için de en yüksek miktardaki serbest fenolik asitler; gentisik asit ($4.64 \pm 0.74 \mu\text{g/g} - 5.12 \pm 0.72 \mu\text{g/g}$), protokateşik asit ($4.46 \pm 0.63 \mu\text{g/g} - 4.72 \pm 0.66 \mu\text{g/g}$), kafeik asit ($2.48 \pm 0.69 \mu\text{g/g} - 2.78 \pm 0.68 \mu\text{g/g}$) ve salisilik asit ($3.09 \pm 0.71 \mu\text{g/g} - 2.99 \pm 0.72 \mu\text{g/g}$) olarak bulunmuştur. Bitkinin yüksek antioksidan özellik ($\text{IC}_{50}: 12.09 \mu\text{g/ml}$) göstermesi fenolik asit varlığına bağlanılmıştır (19).

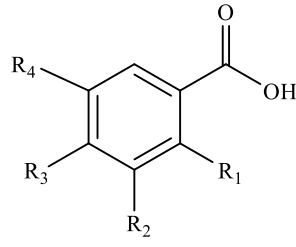
Literatürde *Alchemilla* türlerinde bulunan fenolik yapıları bileşikler derlenerek Tablo 2a-c'de verilmiştir (Şekil 1-5).



Şekil 1. Tablo 2a’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti

Tablo 2a. *Alchemilla* türlerinde bulunan gallik asit türevleri

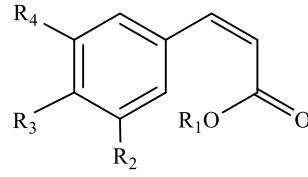
Bileşik	R	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Gallik asit	H	<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü	(23)
		<i>A. mollis</i>	Yaprak (sap dahil)	(24)
		<i>A. acutiloba</i>	Yaprak ve kök	(25)
		<i>A. persica</i>	Toprak üstü	(26)
		<i>A. glabra</i>	Toprak üstü	(27)
Gallik asit 4-O-glukozit	glukoz	<i>A. persica</i>	Toprak üstü	(26)



Şekil 3. Tablo 2b’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti

Tablo 2b. *Alchemilla* türlerinden izole edilen benzoik asit türevleri

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Benzoik asit	H	H	H	H	<i>A.vulgaris</i>	Yaprak	(28)
<i>p</i> -Hidroksi benzoik asit	H	H	OH	H	<i>A.vulgaris</i>	Toprak üstü, kök	(29)
					<i>A. acutiloba</i>	Yaprak, kök	(25)
2,5-Dihidroksi benzoik asit	OH	H	H	OH	<i>A.vulgaris</i>	Tamamı	(30)
3,4-Dihidroksi benzoik asit	H	H	OH	OH	<i>A. vulgaris</i>	Tamamı	(31)
Salisilik asit	OH	H	H	H	<i>A. glabra</i>	Toprak üstü	(27)
					<i>A. acutiloba</i>	Yaprak ve kök	(25)
Siringik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü, kök	(29, 32)
Gentisik asit	OH	H	H	OH	<i>A. acutiloba</i>	Yaprak, kök	(25)
					<i>A. mollis</i>	Toprak üstü	(33)

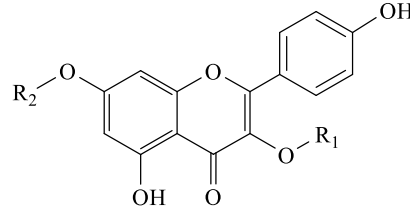


Şekil 4. Tablo 2c’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti

Tablo 2c. *Alchemilla* türlerinden izole edilen hidroksisinnamik asit türevleri

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Sinnamik asit	H	H	H	H	<i>A. vulgaris</i>	Yaprak, kök	(32, 34)
3,4,5-Metoksi sinnamikasit	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	<i>A. vulgaris</i>	Yaprak,	(34)
Kafeik ait	H	H	OH	OH	<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü yaprak ve kök	(29, 32, 34)
					<i>A. acutiloba</i>	Yaprak, kök	(25)
					<i>A. mollis</i> , <i>A. glabra</i>	Toprak üstü	(27, 33)
Klorojenik asit	1,4,5-Trihidroksi-sikloheksan karbosilikasit	H	OH	OH	<i>A. mollis</i>	Yaprak (sap dahil)	(24)
					<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü yaprak ve kök	(29, 34)
					<i>A. persica</i> , <i>A. glabra</i>	Toprak üstü	(26, 27)
Neoklojenik asit	1,4,5-Trihidroksi-sikloheksan karbosilikasit	H	OH	OH	<i>A. vulgaris</i>	Tamamı	(31)
Ferulik asit	H	H	OH	OCH ₃	<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü, kök	(29)
					<i>A. acutiloba</i>	Yaprak, kök	(25)
<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	OH	H	<i>A. vulgaris</i>	Yaprak, toprak üstü ve kök	(29, 34)
					<i>A. acutiloba</i>	Yaprak, kök	(25)
Sinapinik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü, kök	(29)
Rozmarinik asit		H	OH	OH	<i>A. acutiloba</i>	Yaprak, kök	(25)

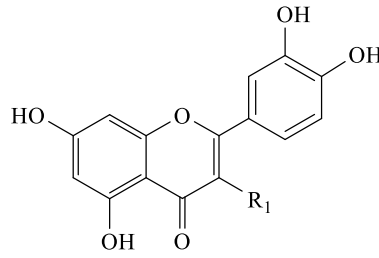
Literatürde *Alchemilla* türlerinde bulunan flavonoit yapıları derlenerek Tablo 3a-d’de verilmiştir (Şekil 5-8).



Şekil 5. Tablo 3a’de gösterilen basit fenolik yapıları bileşiklerin ana iskeleti

Tablo 3a. *Alchemilla* türlerinde bulunan kemferol ve glikozitleri

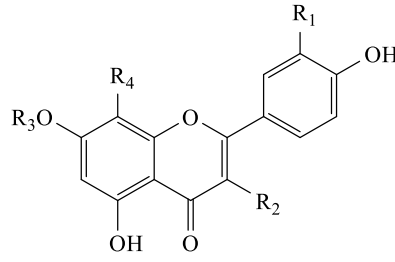
Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Kemferol	H	H	<i>A. acutiloba</i>	Toprak üstü, kök	(25)
			<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü	(35)
Astragalin	glukoz	H	<i>A. acutiloba</i>	Toprak üstü, kök	(25)
			<i>A. achtarowii</i>	Toprak üstü	(36)
			<i>A. speciosa</i>	Yaprak	(37)
Variabilozit G	4''-E-p-kumaroil-robinobioz	H	<i>A. achtarowii</i>	Toprak üstü	(36)
Trifolin	galaktozit	H	<i>A. achtarowii</i>	Toprak üstü	(38)
Tilirozit	6''-E-p-kumaroil-glukoz	H	<i>A. barbatiflora</i> , <i>A. speciosa</i> , <i>A. achtarowii</i>	Toprak üstü	(20, 36, 37)
Kemferol-3-O-β-D-glukronit	glukronit	H	<i>A. speciosa</i>	Yaprak	(37)
Kemferol-3-O-β-D-ksilopiranozit	β-D-ksiloz		<i>A. barbatiflora</i>	Toprak üstü	(20)
Nikotiflorin	ramnoz-glukoz	H	<i>A. persica</i>	Toprak üstü	(26)
Kemferol 3,7-diramozit	ramnoz	ramnoz	<i>A. vulgaris</i>	yaprak	(34)



Şekil 6. Tablo 3b’de gösterilen flavonoit yapılı bileşiklerin ana iskeleti

Tablo 3b. *Alchemilla* türlerinde bulunan kersetin ve glikozitleri

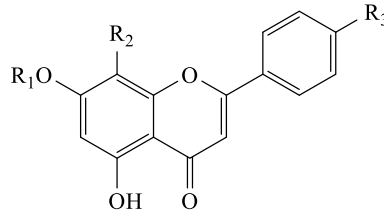
Bileşik	R ₁	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Kersetin	OH	<i>A. acutiloba</i>	Toprak üstü, kök	(39)
Guajaverin	<i>O-α-L-arabinoz</i>	<i>A. barbatiflora</i> , <i>A. xanthochlora</i> , <i>A. achtarowii</i>	Toprak üstü	(37, 40, 41)
Rutin	<i>O- glukoz-(6→1)ramnoz</i>	<i>A. hirtipedicellata</i> , <i>A. procerrima</i> , <i>A. sericata</i> , <i>A. stricta</i>	Yaprak	(42)
		<i>A. mollis</i>	Toprak üstü	(33)
Mikuelianin	<i>O-glukronit</i>	<i>A. barbatiflora</i> , <i>A. achtarowii</i>	Toprak üstü	(20, 37)
Hiperozit	<i>O-galaktoz</i>	<i>A. barbatiflora</i>	Toprak üstü	(20)
		<i>A. hirtipedicellata</i> , <i>A. procerrima</i> , <i>A. sericata</i> , <i>A. stricta</i>	Yaprak	(42)
İzokersitrin	<i>O-glukoz</i>	<i>A. achtarowii</i> , <i>A. vulgaris</i> ,	Toprak üstü	(37, 43)
Kersitrin	<i>O-ramnoz</i>	<i>A. hirsutiflora</i> <i>A. orduensis</i>	Toprak üstü	(42)
Kersetin-3- <i>O-α-D</i> -arabinofuranozit	<i>O-arabinofuranoz</i>	<i>A. speciosa</i>	Yaprak	(38)



Şekil 7. Tablo 3c’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti

Tablo 3c. *Alchemilla* türlerinde bulunan luteolin ve izoramnetin ve türevleri

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Luteolin	OH	H	H	H	<i>A. acutiloba</i>	Toprak üstü, kök	(39)
Orientin	OH	H	H	<i>C-β-D-glukoz</i>	<i>A. hirtipedicellata</i> , <i>A. procerrima</i> , <i>A. sericata</i>	Yaprak	(42)
Sinarozit	OH	H	<i>β-D-glukoz</i>	H	<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü	(44)
İzoramnetin	OCH ₃	OH	H	H	<i>A. acutiloba</i>	Toprak üstü, kök	(39)
İzoramnetin-3-glukozit	OCH ₃	O- <i>β-D-glukoz</i>	H	H	<i>A. acutiloba</i>	Toprak üstü, kök	(39)



Şekil 8. Tablo 3d’de gösterilen basit fenolik yapılı bileşiklerin ana iskeleti

Tablo 3d. *Alchemilla* türlerinde bulunan apigenin türevleri

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Apigenin	H	H	OH	<i>A. caucasia</i>	Toprak üstü	(45)
Viteksin	H	<i>C-β-D-glukoz</i>	OH	<i>A. hirtipedicellata</i> , <i>A. procerrima</i> , <i>A. sericata</i>	Yaprak	(42)
Kozmosiin	glukoz	H	OH	<i>A. vulgaris</i> , <i>A. mollis</i>	Toprak üstü	(44, 33)
Akasetin	H	H	OCH ₃	<i>A. vulgaris</i>	Yaprak	(34)

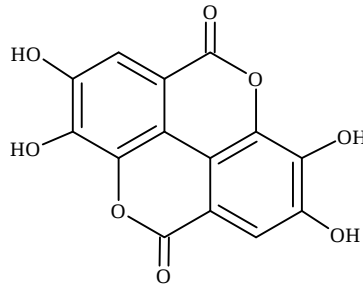
Kuzeydoğu Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren 8 endemik tür (*Alchemilla armeniaca*, *Alchemilla erzincanensis*, *Alchemilla cimilensis*, *Alchemilla orduensis*, *Alchemilla ikizdereensis*, *Alchemilla oriturcica*, *Alchemilla bursensis*, *Alchemilla hirsutiflora*) üzerinde bir çalışmada flavonoit yapısındaki bileşikler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılarak incelenmiş ve genel olarak flavonol-*O*- glikozitleri ile flavon-*C*- glikozitlerinin varlığı tespit edilmiştir. Türlerde flavonol *O*-glikoziti yapısında rutin (kersetin-3-*O*-rutinozit), hiperozit (kersetin-3-*O*-galaktozit), izokersetin (kersetin-3-*O*-glukopiranozit), kersitrin (kersetin-3-*O*-ramnozit) bileşikleri, flavon-*C*-glikoziti yapısında orientin (luteolin-8-*C*-glikozit) ve viteksin (apigenin-8-*C*-glikozit) bileşikleri tanımlanmıştır (42).

2.2.2. Tanenler

ESCOP Monograflarında *A. vulgaris*’in pirogallol üzerinden hesaplanan tanen içeriğinin en az %6.0 olması gerektiği rapor edilmiştir. HPLC ile elajitanenler (%5-8); agrimonin (%3.5-3.8), levigatin F (%0.9), monomer pedunkulagin (%1.2) belirlenmiştir (46).

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 (23).

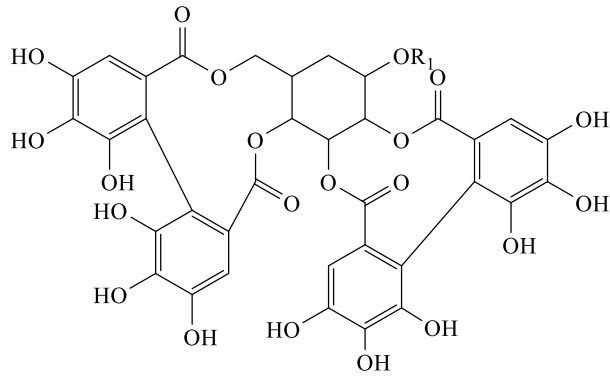
Literatürde *Alchemilla* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu izole ve karakterize edilen tanen yapısındaki bileşikler derlenerek Tablo 4a-e’de verilmiştir (Şekil 9-13).



Şekil 9. Elajik asit

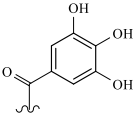
Tablo 4a. *Alchemilla* türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenler (elajik asit)

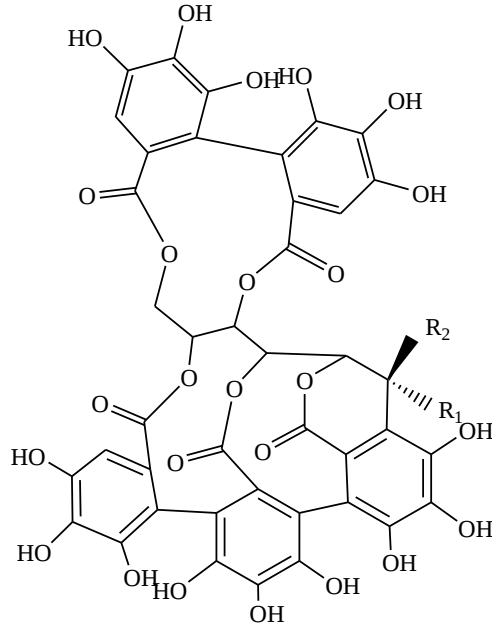
Bileşik	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Elajik asit	<i>A. vulgaris</i>	Yaprak (sap dahil), toprak üstü, kök	(24, 32, 47, 48)
	<i>A. mollis</i>	Yaprak (sap dahil), kök	(24, 32)
	<i>A. xanthochlora</i>	Toprak üstü	(49)
	<i>A. glabra</i>	Toprak üstü	(50)
	<i>A. fissa</i>	Toprak üstü	(50)
	<i>A. viridiflora</i>	Toprak üstü	(50)
	<i>A. monticola</i>	Toprak üstü	(50)



Şekil 10. Tablo 4b’de gösterilen *Alchemilla* türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenlerin ana iskeleti

Tablo 4b. *Alchemilla* türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenler (pedunkulagin ve türevleri)

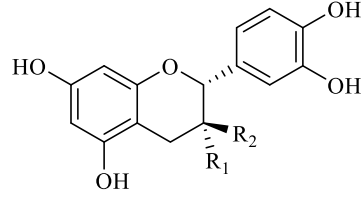
Bileşik	R ₁	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Pedunkulagin	H	<i>A. persica</i>	Toprak üstü ve kök	(51, 52)
		<i>A. vulgaris</i> , <i>A. mollis</i>	Yaprak (sap dahil)	(24)
		<i>A. xanthochlora</i>	Toprak üstü	(53)
Kasuariktin		<i>A. persicaria</i>	Toprak üstü ve kök	(50, 52)



Şekil 11. Tablo 4c’de gösterilen *Alchemilla* türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenlerin ana iskeleti

Tablo 4c. *Alchemilla* türlerinden izole edilen hidrolize olabilen tanenler

Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Kastalagin	OH	H	<i>A. vulgaris</i> , <i>A. mollis</i>	Yaprak (sap dahil)	(24)
Veskalagin	H	OH	<i>A. vulgaris</i> , <i>A. mollis</i>	Yaprak (sap dahil)	(24)



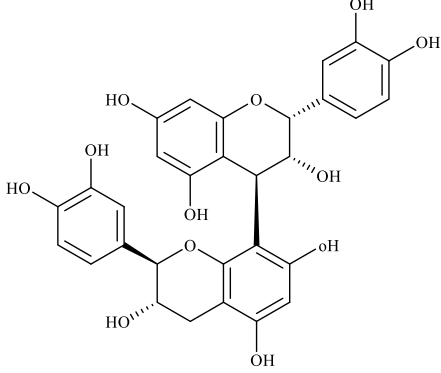
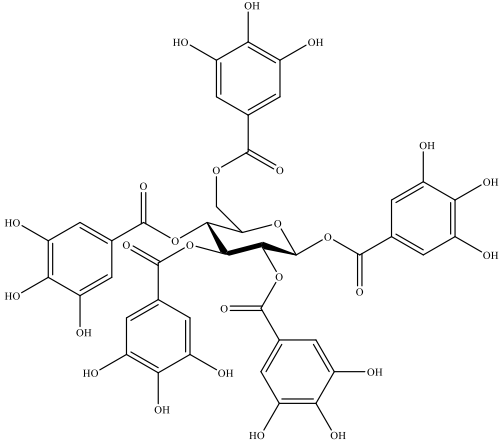
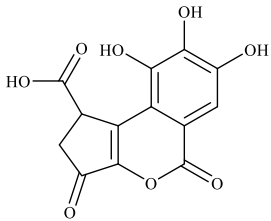
Şekil 12. Tablo 4d’de gösterilen *Alchemilla* türlerinden izole edilen kondanse tanenlerin ana iskeleti

Tablo 4d. *Alchemilla* türlerinden izole edilen kondanse tanenler (kateşin, epikateşin)

Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Kateşin	H	OH	<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü ve kök	(29, 32, 34)
			<i>A. barbatiflora</i>	Toprak üstü	(20)
			<i>A. monticola</i>	Toprak üstü	(19)
			<i>A. mollis</i>	Toprak üstü	(33)
			<i>A. persica</i>	Toprak üstü	(26)
			<i>A. caucasia</i>	Toprak üstü	(45)
			<i>A. glabra</i>	Toprak üstü	(27)
Epikateşin	OH	H	<i>A. vulgaris</i> , <i>A. mollis</i>	Yaprak (sap dahil)	(24)
			<i>A. vulgaris</i>	Yaprak	(34)
			<i>A. mollis</i>	Toprak üstü	(33)
			<i>A. persica</i>	Toprak üstü	(26)
			<i>A. glabra</i>	Toprak üstü	(27)

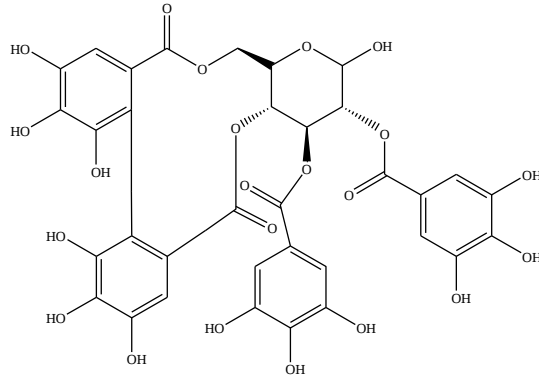
Şekil 13. Tablo 4d’de gösterilen *Alchemilla* türlerinden izole edilen kondanse tanenlerin ana iskeleti

Tablo 4e. *Alchemilla* türlerinden izole edilen kondanse tanenler

Bileşik	Formül	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Prosiyanidin B1		<i>A.persica</i>	Toprak üstü	(26)
Pentagalloylglukoz		<i>A.viridiflora</i>	Toprak üstü	(39)
Brevifolin karboksilik asit		<i>A.viridiflora</i>	Toprak üstü	(39)

Tablo 4e. (Devam)

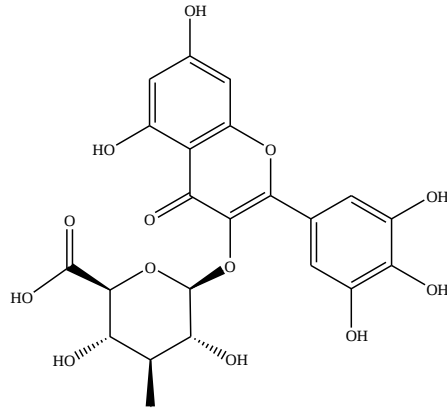
Tellimagrandin I



A. viridiflora

Toprak
üstü (39)

**Mirisetin 3-O-
glukronit**



A. viridiflora

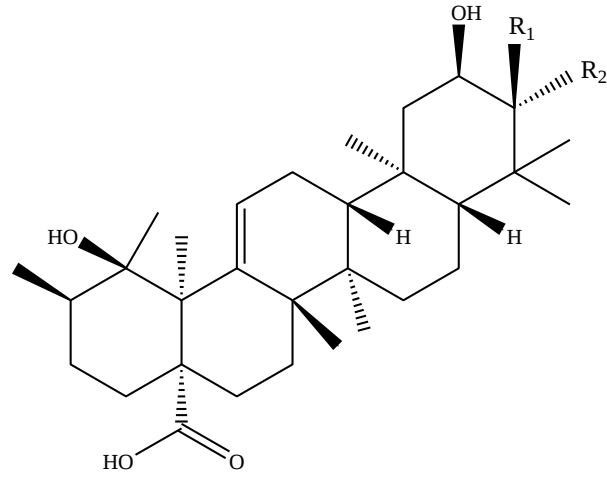
Toprak
üstü (39)

2.2.3. Terpenik Bileşikler

Alchemilla türlerinin uçucu bileşen analizi ile ilgili literatürde kısıtlı çalışma bulunmaktadır. *A. subrenata* yapraklarında ve çiçeklerinde linoleik asit (sırasıyla 4060.2 mg/kg ve 2630.5 mg/kg) ile palmitik asit (5197.0 mg/kg ve 2200.8 mg/kg) bulunduğu belirlenmiştir (54).

A. xanthochlora’nın toprak üstü kısımları üzerinde yapılan bir çalışmada; *A. xanthochlora* bitkisinin GK/FID (Gaz Kromatografisi-alev iyonizasyon dedektörü) ve GK/MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) ile yapılan analizinde; (Z)-3-hekzenol (%10.23), linalool (%11.03), 2-feniletanol (%9.48) ve benzilalkol (%6.54) bileşenlerinin önemli miktarlarda bulunduğu raporlanmıştır (55).

A. alpina, *Alchemilla faeroensis* ve *A. vulgaris* toprak üstü kısımları ile *Alchemilla pastoralis* Buser’in ise tüm kısımlarında oleanolik asit varlığı saptanmıştır (56). *A. faeroensis* (Lange) Buser’in kurutulmuş toprak üstü kısımlarının (380 g), Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen petrol eteri ekstresinden 5 triterpen yapısında bileşik; ursolik asit, 2 α ,19 α dihidroksiursolik asit (tormentik asit), 2 α -hidroksiursolik asit, 2 α ,3 α ,19 α -trihidroksiurs-12-en-28-oik asit (öskophik asit) ve oleanolik asit izole edilmiştir (Tablo 5a-b, Şekil 14). Aynı çalışmada, *A. alpina* ve *A. vulgaris*’in toprak üstü kısımlarının etanol ekstraktlarında da aynı bileşenlerin varlığı gösterilmiştir (57).

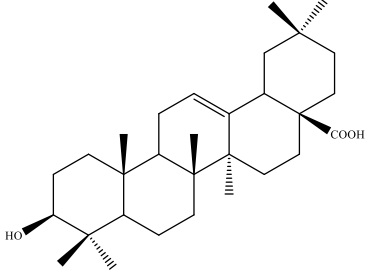
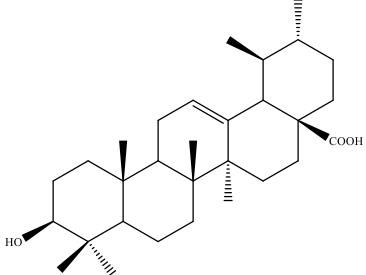
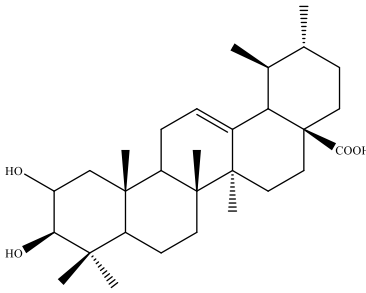


Şekil 14. Tablo 4d’de gösterilen *Alchemilla* türlerinden izole edilen ursolik asit yapısındaki pentasiklik triterpenlerin ana iskeleti

Tablo 5a. *Alchemilla* türlerinden izole edilen ursolik asit yapısındaki pentasiklik triterpenler

Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki türü	Kısım	Kaynak
2 α ,19 α - Dihidroksiursolik asit (tormentik asit)	H	OH	<i>A. faeroënsis</i> , <i>A. alpina</i> , <i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü	(57)
2 α -Hidroksiursolik asit, 2 α ,3 α ,19 α - trihidroksiurs-12-en-28-oik asit (öskophik asit)	OH	H	<i>A. faeroënsis</i> , <i>A. alpina</i> , <i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü	(57)

Tablo 5b. *Alchemilla* türlerinden izole edilmiş olan triterpenler

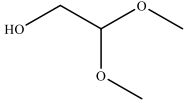
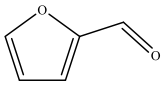
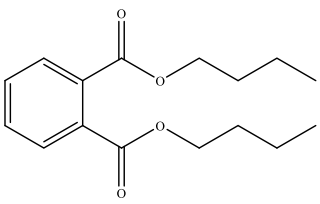
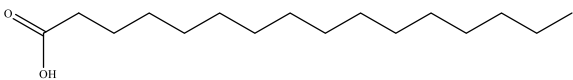
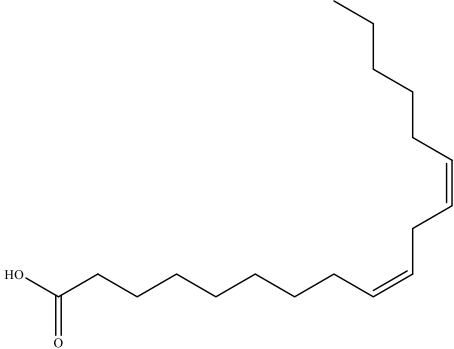
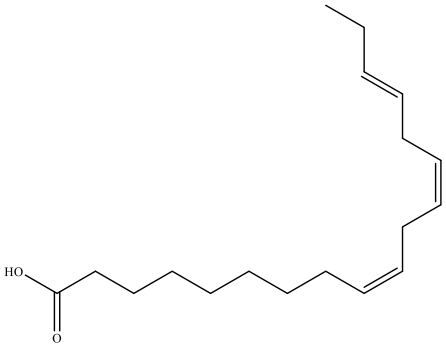
Bileşik	Formül	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Oleanolik asit		<i>A.pastoralis</i>	Tamamı	(56)
Ursolik asit		<i>A. faeroensis</i>	Toprak üstü	(57)
2-hidroksi ursolik asit		<i>A. faeroensis</i>	Toprak üstü	(57)

2.2.4. Diğerleri

Ukrayna'da yetişen *A. flabellata*, *A. phegophila* ve *A. subrenata* bitkilerinin çiçek ve yapraklarının esansiyel yağ bileşenleri sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (GK-KS) yöntemiyle incelenmiştir. *A. flabellata* yapraklarında major bileşenlerin linoleik asit (2801.8 mg/kg) ve palmitik asit (2705.7 mg/kg), çiçeklerinde linoleik asit (3505.5 mg/kg) ve palmitik asit (2891.5 mg/kg) olduğu bildirilmiştir. *A. phegophila* yapraklarında yüksek oranda palmitik asit (2271.3 mg/kg) bulunduğu, bunu linoleik asitin takip ettiği (1677.9 mg/kg); çiçeklerinde ise en yüksek oranda bulunan maddelerin palmitik asit (2948.2 mg/kg) ile linoleik asit (2241.7 mg/kg) olduğu bulunmuştur (54).

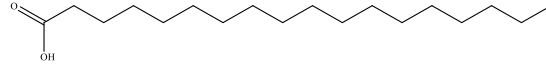
Kuzeydoğu Anadolu'dan toplanan *Alchemilla orthotricha* Rothm., *Alchemilla erzincanensis* Pawl., *Alchemilla hirtipedicellata* Juz., *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm., *Alchemilla persica* Rothm., *A. oriturcica* Pawl., *Alchemilla sintenisii* Rothm., *Alchemilla barbatiflora* Juz., *Alchemilla cimilensis* Kalh., *Alchemilla hemsinica* Kalh., *Alchemilla porrectidens* Juz., *Alchemilla sericata* Reichb., *Alchemilla erytropoda* Juz., *Alchemilla Hthophila* Juz., *Alchemilla rizensis*, *Alchemilla dura* Buser, *Alchemilla ancerensis* Kalh., *Alchemilla compactais* Juz., *Alchemilla daghestanica* Juz., *A. pseudocartalinica* türlerinin yaprakları kloroform-metanol ile ekstre edilmiş, elde edilen ekstratların GK ile analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucu en yüksek yağ asidi içeriğinin sırasıyla *A. hirtipedicellata* (%78.34), *A. rizensis* (%76.47), *A. pseudocartalinica* (%74.58), *A. dura* (%73.94) ve *A. erytropoda* (%68.74) türlerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada bulunan bileşikler Tablo 6'da verilmiştir (6).

Tablo 6. *Alchemilla* türlerindeki diğer bileşikler

Bileşik	Formül	Bitki türü	Kısım	Kaynak
Glikolaldehit dimetil asetal		<i>A. caucasica</i>	Toprak üstü	(58)
Furfural		<i>A. caucasica</i>	Toprak üstü	(58)
Fitalik asit dibütül ester		<i>A. caucasica</i>	Toprak üstü	(58)
n-Hekzadekanoik asit		<i>A. caucasica</i>	Toprak üstü	(58)
Linoleik asit		<i>A.caucasica</i>	Toprak üstü	(58)
Linolenik asit		<i>A.caucasica</i>	Toprak üstü	(58)

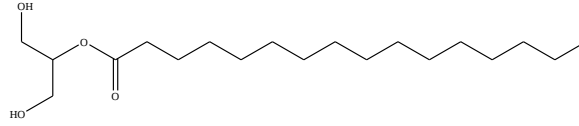
Tablo 6. (Devam)

Oktadekanoik
asit



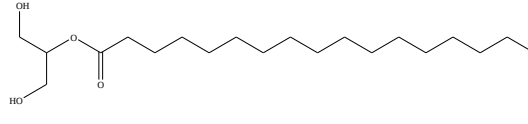
*A.
caucasica* Toprak
üstü (58)

Hekzadekanoik
asit 2-hidroksil-
1-
(hidroksimetil)
etil ester



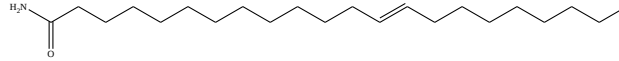
*A.
caucasica* Toprak
üstü (58)

Oktodekanoik
asit 2,3-
dihidroksipropil
ester



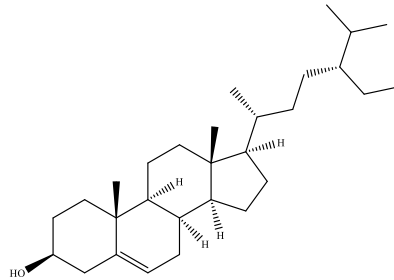
*A.
caucasica* Toprak
üstü (58)

13-
Dokosenamit



*A.
caucasica* Toprak
üstü (58)

β - Sitosterol



*A.
caucasica* Toprak
üstü (58)

2.3. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları

2.3.1. Antimikrobiyal Etki

Alchemilla diademata Rothm. bitkisinin 1/7 ağırlık/hacim oranında hazırlanan su ekstresinin antimikrobiyal etkisi 10 µl ve 20 µl'lik metanol diskleri kullanılarak disk difüzyon metoduyla test edilmiştir. 10 µl'lik diskte %33.3 inhibitör etki gözlemlenirken 20 µl'lik diskte bu oran %88.8 olarak bulunmuştur (59).

A. alpina 'nın toprak üstü kısımlarının (0.5 gram) %96 metanol, etanol ve kloroform ekstraları hazırlanarak antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda *A. alpina* 'nın mikroorganizmaların (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *Klebsiella pneumoniae* gelişimini farklı oranda inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Aralarında en yüksek aktivitenin *S. aureus*'a karşı 23 zon sayısı ile *A. alpina* 'nın metanol ekstresinde gözlemlenirken, aynı bitkinin etanol ekstresinde inhibe edilen zon sayısı 20 bulunmuş, kloroform ekstresinin ise aktivitesinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Kloroform ekstresinin en aktif olduğu bakteri *Candida glabrata* iken zon sayısı 11'dir. Bu durum etil alkol ekstresinde 22 zon sayısı ile *C. albicans* 'a karşıdır (60).

Alchemilla pedata Hochst.x A.Rich. bitkisinin %80 metanol-su ekstresi artan polarite sırasına göre petrol eteri, kloroform, aseton ve metanolle fraksiyonlanmıştır. Total ekstre ile elde edilen fraksiyonların agar difüzyon yöntemi ile antibakteriyel ve antifungal aktivitesi ölçülmüştür. Test edilen 5 ve 25 mg/ml'lik konsantrasyonlarda kloroform ve metanol ekstraları aktif bulunmamıştır. *E. coli*'ye karşı petrol eteri fraksiyonunun aktivitesi 5 mg/ml'lik konsantrasyonda bulunmazken 25 mg/ml'lik konsantrasyonda 32.0 mg/ml bulunmuştur. 25 mg/ml'lik konsantrasyonda petrol eteri fraksiyonunun aktivitesi, total ekstre (14 mg/ml, 15 mg/ml) ve aseton fraksiyonu (14 mg/ml, 15 mg/ml) ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Maksimum aktivite sergileyen petrol eteri fraksiyonu (*Trichophyton mentagrophytes* 'a 38 mg/ml) hariç *A. pedata*'nın fraksiyonları *P. aeruginosa* (25 mg/ml) ve *S. aureus*'a karşı (35 mg/ml) benzer konsantrasyonlarda inhibitör aktivite sergilemiştir. *C. albicans* ve *T. mentagrophytes*'e karşı da benzer sonuçlar elde edilmiştir (61).

Test edilen 5 ve 25 mg/ml'lik konsantrasyonlarda kloroform ve metanol ekstraları aktif bulunmazken, *E. coli*'ye karşı petrol eteri fraksiyonunun aktivitesi, aynı

konsantrasyonda toplam ekstre ve aseton fraksiyonu ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Maksimum aktivite sergileyen petrol eteri ekstresi hariç *A. pedata*'nın, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı inhibisyon aktivitesi, diğer fraksiyonları arasında benzer bir şekilde dağılım göstermektedir. *C. albicans* ve *T. mentagrophytes*'e karşı da benzer sonuçlar elde edilmiştir (61).

A. mollis ile yapılan bir çalışmada ise bitkinin influenza A virüsü alt tipleri olan H1N1, H3N2 ve H5N2'ye karşı inhibitör etki (IC₅₀: %0.12) gösterdiği kaydedilmiştir. Ayrıca 2.2 nM zanamivir ile %0.01 *A. mollis* ekstresi kombine olarak kullanıldığında inhibitör etkinin sinerjistik olarak arttığı gözlemlenmiştir (etkileşim indeksi = 0.36) (62).

2.3.2. Antioksidan Etki

2020 yılında Türkiye’de yapılan bir çalışmada *A. persica*’dan hekzan, diklorometan, etil asetat, metanol ve su ekstraktları elde edilerek, bu ekstraktların toplam antioksidan aktiviteleri, DPPH radikal süpürme aktiviteleri, toplam indirgeme aktivitesi, hidrojen peroksit giderme, hidroksil radikal uzaklaştırma aktiviteleri ve antiproliferatif etkisi farklı konsantrasyonlarda araştırılmıştır. En yüksek toplam fenolik madde miktarı etil asetat ekstresinde bulunurken (517.79 ± 12.35 µg GAE / ml ekstre), 0.05 mg/ml konsantrasyonda DPPH radikal süpürme aktivitesinin en anlamlı değeri metanol ekstresinde ($\% 87.46 \pm 1.48$) bulunmaktadır. Konsantrasyondaki artış ile birlikte bu değerlerin de arttığı bildirilmiştir. Toplam indirgeme aktivitesini ölçmek için standart olarak bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve α-tokoferol kullanılmış ve 0.05 mg/ml konsantrasyon için en yüksek aktivite 2.08 ± 0.76 mg/ml etil asetat ekstresinde ölçülmüştür. Aynı konsantrasyonda hidrojen peroksit giderme, hidroksil radikal uzaklaştırma etkisi sırasıyla hekzan (52.92 ± 2.40 mg/ml) ve etil asetat (2.58 ± 0.50 mg/ml) ekstraktlarındadır. *A. persica*’nın su ve sulu metanol ekstraktlarının, 250, 500, and 1000 µg/ml dozlarında PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonu ve hücre büyümesini durdurduğu bildirilmiştir. En yüksek antiproliferatif etki 250 µg/ml dozunda metanol ekstresinde tespit edilmiştir (63).

A. mollis’in serbest radikal süpürücü aktivitesinin çalışıldığı bir çalışmada metanolik ekstresinin ve bu ekstreden elde edilen alt ekstraktların DPPH radikal süpürme aktivitesi ölçülmüştür. Metanol ekstresinden elde edilen etil asetat ekstresinin en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur (64). *A. persica*’nın toprak üstü kısımlarının

ve köklerinin sulu metanollü ekstresinin DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesiyle antioksidan aktivitesi değerlendirilmiş ve DPPH radikaline karşı IC₅₀ değerlerinin toprak üstü ve kökler için sırasıyla 0.055 M ve 0.151 M olarak bulunduğu ve bitkinin toprak üstü kısımlarının önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir (65).

A. acutiloba'nın toprak üstü kısımlarının ve köklerinin çeşitli ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olduğu DPPH ve 2,2-azino-bis-(3-etil-benzthia-6-sulfonik asit) (ABTS^{•+}) yöntemleri ile belirlenmiştir. 50.0 µg/ml dozda, *A. acutiloba*'nın toprak üstü ekstresinin DPPH[•] süpürme aktivitesi etil asetat (%94.85 ± %0.30) ve butanol (%87.31 ± %0.17) fraksiyonu için ve ABTS^{•+} deneyinde AH-B(4-hidroksibenzoik asit içeriği) (%80.56 ± 0.17) için en yüksek çıkmıştır. Yapılan çalışmada pozitif kontrol grubu olarak L-askorbik asit, E vitamini analogu (Trolox) ve etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat (Na₂EDTA*2H₂O) kullanılmıştır (25).

A. arvensis'in yapraklarının antioksidan aktivitesini değerlendirmek için DPPH yönteminin kullanıldığı çalışmada, toplam flavonoit içeriğinin metanol ekstresinde (83.3 mg rutinE/g) en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiş ve en yüksek antioksidan aktivite aynı şekilde metanol ekstresinde (IC₅₀ = 97.72 µg/ml) ölçülmüştür (66).

A. mollis bitkisinin yapraklarının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan etanollü sulu ekstresi ile yapılan bir çalışmada ABTS radikalini süpürücü etkisi ölçülmüştür (3.08 ± 6.74 mmol/l E vitamini analogu). Kök ekstrelerinde ise etanol (2.45 ± 0.003 mmol/l Trolox) ve bütanol (2.35 ± 0.02 mmol/l Trolox) alt ekstrelerinde en yüksek aktivite gözlenmiştir (67). *A. vulgaris* türünden hazırlanan sulu ve metanollü ekstrenin DPPH radikal süpürme aktivitesinin ise %3.90-93.49 aralıklarında olduğu saptanmıştır (43).

2.3.3. Antienflamatuvar Etki

Araşidonik asit metabolitlerinin inflamasyonunun oluşumunda önemli bir araçtır. *A. vulgaris* (0.52 mg/ml) ile yapılan bir çalışmada araşidonik asit metabolitlerden olan 5-lipoksijenaz türevleri üzerinde inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (IC₅₀: 0.5 mg/ml). Ve bu etkinin fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (11).

2.3.4. Antitümör ve Sitotoksik Aktivite

Fransa'nın Limousin bölgesinden toplanan *A. vulgaris* bitkisinin alkollü su ekstresinin 0,5mg/ml üzeri konsantrasyonlarda B16 hücreleri (C57Bl/6 fare spontanöz deri tümör hücrelerinden türevlendirilmiş) üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu bulunmuştur (11). *A. vulgaris* kökleri ile yapılan bir çalışmada metanollü ekstresinin, Vero hücrelerinin yanı sıra PC-3, Caco-2 ve MCF-7 üzerinde doza bağlı bir şekilde güçlü antiproliferatif aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (32).

A. erythropoda, *A. ikizdereensis*, *A. oriturcica*, *A. trabzonica* yapraklarının %50 sulu etanol ekstrelerinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *A. trabzonica* bitkisinin sırasıyla %24 ve %25 apoptotik ve nekrotik etki ile en yüksek aktiviteyi 200 mg/ml'de gösterdiği tespit edilirken en düşük apoptotik ve nekrotik aktivite ise aynı dozda *A. ikizdereensis* (%9) ve *A. erythropoda* (%6) bitkilerinde gözlemlenmiştir (68).

2.3.5. Yara İyileşici Etki

Fibroblastlar ve keratinositler yara iyileşmesinde anahtar rol oynarlar. Bu hücreler yara oluşumunun ilk aşamasında çoğalarak genişler ve yara alanına göç etmek için hücre dışı matriks sentezler. Bu sırada keratinositler farklılaşarak yaralarının kapatılması ve iyileşmesi için epidermal bariyeri tekrar oluşturur. L929 fibroblastlarla yapılan “çizik” testinde, insan derisi üzerine yapay olarak hasar verildikten sonra cilt bariyeri onarımının *in vivo* ölçümleri yapılmış, %2 *A. vulgaris* sulu veya etanollü veya %6 propilen glikolik asitli ekstrelerinin topikal uygulamasının yara kapanmasını hızlandırdığı, aynı zamanda hasarlı cilt bariyerinin onarımını desteklediği bulunmuştur (44).

A. vulgaris'in yara iyileştirici etkisini gözlemlemek için Chang karaciğeri ve Madin Darby Sığır Böbreği (MDBK) epitel hücreleri ve sıçan aortik miyofibroblast hücre kültürleri ile yapılan bir çalışmada yara iyileşmesi için gerekli olan epitelyal ve miyofibroblast hücre büyümesi incelenmiştir. Herhangi bir morfolojik değişiklik veya sitotoksosite kaydedilmeyen deneyde gliserine karşı *A. vulgaris* kullanılan hücrelerde lezyonun tam iyileşme süresinin bir gün kısaldığı gözlemlenmiştir (18).

Aphtarine® standart %3'lük *A. vulgaris*'in gliserin içindeki özütüdür. Aphtarine® tanen (%0.08) içermektedir bu içeriğin %3.8'ini ellajik asit oluşturur. Flavonoit yapısındaki

kersetin (%0.02) ve luteolin (%0,0002) varlığı ise HPLC analiziyle belirlenmiştir. Ağızlarında ülser olan 4-44 yaş aralığındaki 48 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada hastalara Aphtarine® preparatı günde 3 kez uygulanmıştır. İlk 2 gün içerisinde %60.4 lük bir kısımda iyileşme görülürken, 3. gün sonunda bu oran %75'e çıkmıştır. Herhangi bir tedavi almayan hasta grubunda ise iyileşme 4-7 gün arasında gözlemlenmiştir (69).

2.3.6. Kadın Hastalıkları Üzerine Etki

Sıçanlarda endometriyal dokunun karın duvarına cerrahi yöntemle ototransplantasyonu oluşturulan endometriozis üzerinde *A. mollis* ve *A. persica*'nın toprak üstü kısım ve köklerinin sulu-metanollü ekstraktları 100 mg/kg doz olacak şekilde verilmiştir. *A. persica* toprak üstü kısmı ekstresi verilen sıçanlarda endometriomada azalma belirlenmişken ($p < 0,05$), *A. mollis* toprak üstü kısmı ekstresi verilen sıçanlarda sitokin seviyelerinde kayda değer bir azalma gözlemlenememiştir. Ayrıca *A. persica* ile *A. mollis*'in toprak üstü kısımlarının TNF- α (Tumor necrosis factor), IL (interlökin)-6 ve VEGF (Vascular endothelial growth factor) seviyelerindeki azalma sırasıyla *A. persica* için 7.92 ± 1.57 (pg/ml), 19.90 ± 8.14 (pg/ml), 18.84 ± 7.42 (pg/ml), *A. mollis* için 7.04 ± 1.62 (pg/ml), 17.83 ± 6.92 (pg/ml) ve 34.75 ± 14.91 (pg/ml) şeklinde bulunmuştur. Endometriyozis tedavisinde her iki türün de kullanılabileceği öne sürülmüştür (70).

On bir polikistik over sendromu hastası spontan kanamanın veya çekilme kanamasının 1. gününden başlayarak iki ay boyunca günde iki kez Testo® kapsül ile tedavi edilmiştir. Bu preparat, *A. vulgaris*, *Achillea millefolium*, *Capsella bursa-pastoris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Oenothera biennis*, *Putranjiva roxburghii*, *Bryonia laciniata*, *Mucuna pruriens*, *Kuşkonmaz racemosus* ve *Withania somnifera* olmak üzere içerisinde 10 bitkisel bileşenin ekstresini içeren bir Ayurveda preparatıdır. PKOS hastalarının %45.45'inde ilk kullanımda yumurtlama meydana gelirken tedavinin ikinci siklusunda yumurtlama oranı yüksek (%81.81) bulunmuştur. Siklusun 22. gününde progesteron düzeyleri >3 ng/ml iken metformin+klomifen sitrat kombini %68 ile kıyaslandığında, 59% göre yumurtlama oranı oldukça anlamlı bulunmuştur. Testo'yu kullanan tüm hastalarda adet döngüsü düzelmiş ve dismenore şikayetini giderilmiştir (71).

2.3.7. Antidiyabetik Aktivite

18 saat boyunca aç bırakılan farelerde diyabet, izotonik salin çözeltisi (ISS) içindeki 150 mg/kg alloxan monohidratın i.p. enjeksiyonunun 3 kez 48 saat ara ile uygulanması sonucu oluşturulmuştur. Son enjeksiyondan 7 gün sonra 200 mg/dl ve üzeri kan şekeri sahip fareler, rastgele altı üç gruba bölünmüştür. 1. gruptakilere 0.1 ml ISS i.p. verilirken; 2. ve 3. gruptakilere sırasıyla 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında *A. mollis*'in toprak üstü ekstresi; 4. ve 5. gruptakiler ise sırasıyla *A. mollis* kökü ekstresi verilmiştir. Kan şekeri düzeyleri *A. mollis* ekstresi verilmeden önce ve 1, 2 ve 4 saat sonra glukoz oksidaz peroksidaz uygulanarak ölçülmüştür. Diyabetik olmayan fareler için de aynı yöntem uygulanarak herbiri beş fareden meydana gelen üç grup oluşturulmuştur. Ekstrelerin etkisini görmek için farelerin kan şekeri uygulamadan önce ve uygulamadan 1, 2 ve 4 saat sonrasında ölçülmüş fakat anlamlı bir düşüş görülmemiştir ($p > 0.05$) (72).

2.3.8. Anjiyoprotektif Aktivite

Flavonoit ve polifenolik bileşiklerce zengin bitki ekstrelerin vazodilatör, antioksidan ve hipotansif etkilere neden olabileceğini gösteren çelişti çalışmalar mevcuttur. *A. vulgaris* Avrupa'da geleneksel olarak hipertansiyon tedavisinde (çay olarak), ödem ve diyabette kullanılmaktadır. Vasküler aktiviteyi gözlemlemek için *A. vulgaris* ekstreleri PGF_{2α} veya K⁺ kontraktil ajanlarla kasılmış sıçanların mezenterik arterleri kullanılmıştır. *A. vulgaris*'in metanollü ekstresi ve sulu ekstresi her gün taze hazırlanarak oral yolla 2 hafta boyunca günlük 300 mg/kg dozda verilmiştir. Metanollü ekstrenin kullanımı hipertansif sıçanlarda kan basıncını belirgin bir biçimde düşürürken, sulu ekstrenin belirgin bir etkisi olmamıştır (73). Flavon monoglikozitleri açısından zengin *A. vulgaris* ekstresinin anjiyoprotektif etkisinin araştırmak için 30 ve 60 mg/kg dozlardaki ekstreler kullanılmış ve kardiyak korumayı sırasıyla %28 ve %30.1 oranında arttırdığı belirtilmiştir (46).

A. viridiora ve miquelianin'in doza bağlı ACE inhibitör aktivitesi karşılaştırılmıştır. *A. viridiora* metanol ekstresinin ve mikuelinin standart çözeltisinin aktivitesi farklı konsantrasyon aralıklarında değerlendirilmiş, ACE inhibitör aktivitelerine ait IC₅₀ değerleri sırasıyla 2.51 µg/ml ve 2.59 µg/ml bulunmuştur. Miquelianin'in aktivitesi kaptoprilinkinden önemli ölçüde düşük, ancak güçlü sentetik ACE inhibitörü olan alacepril ile aynı aralıkta olduğu bulunmuştur (74).

2.3.9. Hepatotoksisiteye Karşı Koruyucu Etki

A. vulgaris'in hepatoprotektif etkisini gözlemlemek için 8 ana grubuna ayrılan sıçanlar dört hafta boyunca gözlenilmiştir. 1. grup negatif kontrol grubu olarak kullanılırken, kalan 7 grup 2'den 8'e kadar numaralandırılmış ve karaciğerde kronik hasar oluşturmak için haftada iki kez parafin yağı (%50 v/v 2 ml/kg) içinde CCl₄ subkutan yolla verilmiştir. *A. vulgaris*'in etanol, su ekstresi ile toz formu oral yolla günlük grup 3-8 arasındaki araştırma gruplarına verilmiştir. Karbon tetraklorür uygulamasıyla serum albümininde azalma görülürken, total bilirubin, AST, ALT ve ALP ve önemli ölçüde yükselmiştir. AST, ALT ve ALP ve bilirubin seviyesi *A. vulgaris* ekstresi verilen gruplarda (50 ppm su ekstresi verilen haricinde) anlamlı bir şekilde ($p < 0.05$) azalmıştır. En anlamlı azalma, 100 ppm etanol ekstresi ile %2 toz formu verilen grupta görülmekle birlikte, kurutulmuş *A. vulgaris* yaprak ve su/etanol ekstresi verilen gruplarda serum albümininde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu *A. vulgaris*'in antioksidan aktivitesi ile açıklanmıştır (34). *Alchemilla* türlerinden izole edilmiş olan eskuletinin hepatotoksisiteye sebep olan karbontetraklorüre karşı koruyucu etkisinin 5-lipoksijenaz inhibitör aktivitesi ile alakalı olabileceği belirtilmiştir (7).

2.3.10. Diğer Aktiviteler

A. vulgaris türünün nöroprotektif etkisini araştırmak için bitkiden hazırlanan sulu ve metanollü ekstre kullanılmıştır. Ekstrelerin asetilkolinesteraz inhibe edici aktivitesinin %77.03-98.39 ve tirozinaz inhibe edici aktivitesinin %60.00-90.65 aralıklarında olduğu saptanmıştır. Bu bulgular Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de bu tıbbi bitkinin kullanılmasını desteklemektedir (43).

Na⁺ ve Ca²⁺ gibi katyonların hücre zarından geçişine aracılık eden geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları, seçici olmayan katyon kanalıdır. Kapsaisin reseptörü/vanilloid reseptör 1 olarak da bilinen TRPV1 geçici reseptör potansiyeli TRP katyon kanalı alt ailesindendir. Ve insanlarda TRPV1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Yüksek sıcaklık (>42 °C) ve kapsaisin ile kontrol edilen bir ağrı reseptörü olan TRPV1 agonisti kapsaisin ağrıyı ektopik uygulama ile iyileştirdiği gösterilmiştir. *A. xanthochlora* bitkisinin pozitif modülatör etkisi üzerine kapsaisin ile birlikte yapılan çalışmada; ortalama veriler $\pm$ SEM ($n = 3-8$) $p < 0.005$ olarak gösterilmiştir (75).

Vücut kitle indeksi (BMI) $30.67 \pm 2.14 \text{ kg m}^{-2}$ olan 80 gönüllü insan ile yapılan bir çalışmada ana öğünlerden 30 dakika önce bir Weighlevel tableti (*A. vulgaris*, *Olea europaea* L., *Mentha longifolia* L. yaprakları ile *Cuminum cyminum* L. tohumlarından hazırlanan bitkisel karışım) almaları istenilmiştir. Çalışmaya devam edenler tarafından iyi tolere edildiği gözlenilmiş ve hiçbir yan etki bildirilmemiştir ayrıca anlamlı bir kilo kaybı görülmüştür. BMI, fazla kilolu ve obez grupta 3 ay sonra sırasıyla 28.5 ± 1.2 ve $32.1 \pm 1.8 \text{ kg m}^{-2}$ 'den 24.5 ± 1.4 ve $27.5 \pm 2.2 \text{ kg m}^{-2}$ 'ye düşmüştür (76).

A. vulgaris ekstresinin anksiyolitik etkisini araştırmak için formalin enjeksiyonu ile ağrı, endişe durumları oluşturulan tavuklara *i.p.* enjeksiyonla verilen sulu-alkollü ekstrenin meydana getirdiği değişiklikler gözlemlenmiştir. Deney sonunda herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir (77).

Cilt foto yaşlanması iki mekanizma ile oluşmaktadır. Birincisi matriks metaproteinaz (MMP) enziminin sorumlu olduğu hücre yıkımının artması bu da reseptör sayısının artması ile kolajen yapısının bozulması, ikincisi ise tip I prokolajenin uyarıcılarından biri olan tümör büyüme faktörü (TGF)- $\beta 1$ 'in reseptör sayısının azalması ile kolajen sentezinin azalmasıdır. *A. mollis* ile muamele edilen insan dermal fibroblastları UVB ışınlaması incelenmiştir. (TGF)- $\beta 1$, tip I prokollajen ve elastin ekspresyonunu yukarı regüle ettiği ve matriks metaproteinaz (MMP) enziminin sorumlu olduğu hücre yıkımının aşağı regüle ettiği bulunmuştur. Ayrıca UVB'ye maruz kalan tüysüz fareleri derisinde kırışıklık oluşumunun, nem kaybının ve cilt kalınlaşmasının azalmasında etkili olduğu görülmüştür (76).

2.4. *Alchemilla* Türlerinin Halk Arasında Kullanımı

Türkiye bitki örtüsü içerisinde doğal olarak yetişen *Alchemilla compactilis* Juz Trabzon'da "aslan pençesi"; *Alchemilla ellenbergiana* Gümüşhane'de "aslanpençesi"; *A. arvensis* (L.) "aslanayağı", ayrıca endemik olarak bulunan *Alchemilla erythropoda*, *A. ikizdereensis*, *Alchemilla trabzonica* ve *A. oriturcica* türleri "aslanpençesi, aslan ayağı, fındık otu, yeditepe ve dokuz tepe" olarak isimlendirilmektedir (42, 67, 78, 79).

A. pseudocartalinica "yıldız nişanı" olarak bilinir ve halk arasında yaprakları infüzyon şeklinde kabızlıkta, diüretik ve tonik olarak kullanılır (14). *A. mollis* "gürvelik" olarak isimlendirilir ve kökleri soyularak tazeyken gıda maddesi olarak tüketilir (15). Hakkâri'de *A. hessii* bitkisinin yapraklarından hazırlanan lapanın yara iyi edici olarak kullanıldığı bildiren çalışmalar mevcuttur (16).

Doğu Anadolu Bölgesinde *A. pseudocartalinica* bitkisi infüzyon yolu ile hazırlanarak kabızlıkta, idrar söktürücü ve tonik olarak oral yolla kullanılmaktadır (14).

Hakkari’de *A. hessii* yaprakları maserasyon ile hazırlanıp yara iyileşmesi için kompres yapılarak kullanılmaktadır (16). Balıkesir’de *Alchemilla hirsutiflora* yapraklarından hazırlanan infüzyon jinekolojik hastalıklar ve ağız yarasında kullanılmaktadır (80). Gümüşhane’nin Kelkit ilçesinde yetişmekte olan tıbbi bitkilerin etnobotanik özelliklerinin araştırılması amacıyla ilçe merkez ve köylerinde (2013 Eylül - 2014 Ağustos arası) yapılan çalışmada, devetabanı ve aslanpençesi olarak da adlandırılan *Alchemilla* türlerinin çiçek ve yapraklarının öksürük, bronşit, çıban, iltihap, akciğer rahatsızlıkları, astım, menopoz, kadın hastalıkları, cilt kırıksıklığı gibi hastalıklarda çayı demlenerek ve yemeği yapılarak kullanıldığı tespit edilmiştir (81).

Sivas ve Yozgat’ın 19 köyünde etnobotanik çalışma için 300 kişi ile görüşülmüştür. Yapılan görüşme sonucunda halk arasında yıldız nişanı olarak da adlandırılan *A. mollis* bitkisinin gıda olarak, soyulmuş taze saplarının yenildiği görülmüştür (15). Artvin’de *A. compactilis*’in toprak üstü kısımları dekoksasyon yöntemi ile hazırlanarak adet düzensizliğinde kullanılmaktadır (82).

Ayrıca *A. sintenisii* kalp ve damar sistemi bozukluk ve hastalıklarında, kas ve iskelet sistemi hastalıklarında, bağırsak hastalıklarında, solunum hastalıkları tedavisinde, *Alchemilla crinita* ve *A. pseudocartalinica* çeşitli cilt hastalıklarında, *A. barbatiflora* bağırsak hastalıklarında, solunum hastalıkları tedavisinde, *A. crinita* nörolojik hastalıkların tedavisinde, *A. pseudocartalinica* solunum sistemi hastalıkları tedavisinde kullanıldıkları bilinmektedir (83).

A. vulgaris Türkiye florasında yetişen bir tür olmamasına rağmen, yaprak ve çiçeklerinin Adıyaman’da 1,5 l’si 50 gr suya koyularak romatizmal rahatsızlıklarda, özellikle kadın hastalıklarında ve kalp damar hastalıklarında kullanıldığı (84), Şanlıurfa’da toprak üstü kısımlarının kadınlarda hormona bağlı tüylenmeye karşı, östrojen hormonu yükseltici, adet düzensizliğine karşı yardımcı ve destekleyici olarak kullanıldığı kayıtlıdır (85).

A. vulgaris yapraklarının Ürdün’de obezite ve amnezide kullanıldığı bildirilmiştir (86). Aynı bölgede *A. vulgaris* yaprak ve köklerinin dekoksasyon yolu ile kullanımında antidiyabetik kullanımı olduğu bildirilmiştir (87). Filistin’de *A. vulgaris* yapraklarında

hazırlanan dekoksiyon kilo kaybı, mide ve bağırsak ağrısı ve iltihabı gibi rahatsızlıklarda günde 3 kez 150 cc olacak şekilde oral alınır (88).

Bosna Hersek'te *A. vulgaris*'in toprak üstü kısımları infüzyon ile hazırlanmasıyla menstural ağrılara ve baş ağrısına karşı oral yolla kullanılmaktadır (89). Aynı bölgede *A. mollis* ekstreleri boğaz ağrısına karşı kullanılmaktadır (90). Bulgaristan'da *A. vulgaris*'in toprak üstü kısımları cilt antiseptiği olarak kullanılmaktadır (91). Etiyopya'da *A. pedata*'nın yaprakları deri üzerinde yara bulunan kısma sürülerek antimikrobiyal olarak kullanılmaktadır (92).

İspanya'da *Alchemilla alpina* L. yapraklarından hazırlanan çay sindirimi kolaylaştırmak için içilir (93). Katalonya' da *A. alpina*'nın toprak üstü kısımları dekoksiyon yöntemi ile hazırlanarak, mide ağrısı (bağırsak antialjik/antiinflamatuvar) ve böbrek taşları için (litotriptik) kullanılmaktadır (94).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Katı Maddeler ve Çözücüler

Vanilin (fluka), asetik asit (Sigma Aldrich A6283), *n*-butanol (Sigma Aldrich 537993), diklorometan (Sigma Aldrich 24233), etil asetat (Carlo Erba 448256), formik asit (sigma aldrich), *n*-hekzan (Merck 1.04368.2511), kloroform (Isolab 10.033.25.01), metanol (Riedel-de Haen 34860), saf su, sülfürik asit (Merck 100731).

İTK çalışmalarında revelatör olarak vanilin/H₂SO₄ (vanilin'in derişik sülfürik asit içindeki %1'lik çözeltisi) kullanılmıştır.

Kolon kromatografisi kullanılan adsorbanlar; Kieselgel 60 (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm, Merck-7734), LiChroprep® RP-18 (Merck, 40-63 µm) ve sefadeks (Lipophilic Sefadeks LH-20)'tir. İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında hazır alüminyum plaklar (Kieselgel 60 F254, Merck-5554; RP-18 F254, Merck-5559) kullanılmıştır. Adsorbanların kullanıldığı kromatografik çalışmaların detayları Bölüm 5.1.3'te açıklanmıştır. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri Tablo 7'de, kullanılan alet ve cihazlar Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 7. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri

Yöntem	Çözücü sistemi
İTK	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (95:5:1,5, 85:5:1:5, 80:20:2, 80:20:1,70:30:3) CHCl ₃ :MeOH (98:2, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30) EtOAc:MeOH (10:1, 9:1, 7:3, 6:4, 5:5, 3:7) EtOAc:MeOH:H ₂ O (7:2:1) EtOAc:HC ₃ COOH:HCOOH:H ₂ O (25:2:2:4) <i>n</i> -Hekzan: EtOAc (70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70)
KK (Silika jel)	CHCl ₃ : MeOH (98:2→ 0:100) CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (85:15:1,5, 70:30:3) <i>n</i> -Hekzan: EtOAc (7:3→0:10) EtOAc: MeOH: (7:3, 0:10)
KK (VSK)	MeOH: H ₂ O (0:100→100:0)
KK (OBSK)	MeOH:H ₂ O (0:100→100:0)
KK (Sefadeks-LH-20)	%100 MeOH

Tablo 8. Kullanılan aletler ve cihazlar

Değirmen	: Ic-25B öğütücü
Etüv	: MMM Group-Ecocell LSIS-B2V/EC 111
Hassas Terazı	: Ohaus PA214C
Kromatografi Tankı	: Camag
Liyofilizatör	: Christ Alpha 1-4 LD plus
NMR Spektrometresi (1D ve 2D)	
¹ H NMR	: Bruker AVANCE III 400 MHz
¹³ C NMR	: Bruker AVANCE III 100 MHz
OBSK Cihazı	: Büchi
OBSK Kolonları	: Büchi Sepacore 4g, Büchi Sepacore 12g
OBSK Pompa	: Büchi Pump Manager C-615 : 2 × Pump Module C-605
OBSK Fraksiyon Kollektör	: Büchi C-660
Rotary evaporatör	: Heidolph
Terazi	: Ohaus Gold series SPJ 602
Ultrasonik Banyo	: Soltec mod.2200 ETH
UV Kabin	: CAMAG
Vakum Pompası	: Millipore Model No: WP6122050

3.1.2. Bitki Materyali

Alchemilla pseudocartalinica bitkisi 28.05.2022 tarihinde Trabzon, Sultan Murat yaylasından toplanmış ve Prof. Dr. Gülin RENDA tarafından tayin edilmiştir. Türe ait herbaryum örneği Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumunda kayıtlıdır (AEF31035).

3.1.3. Kromatografik Yöntemler

3.1.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi

İzolasyon çalışmalarında kromatografik yöntemler ile gerçekleştirilen ayırımın izlenebilmesi için normal faz ve ters faz silika jel kaplı hazır alüminyum plaklar kullanılmıştır. Numune tatbikleri pastör pipeti yardımıyla plağın alt ucunun 1 cm yukarısından ve 0.7 cm aralıklarla yapılmıştır. Kromatografi tankına (29×27×10 cm veya 14×12×10 cm) konulan plaklar oda sıcaklığında 7-10 cm mesafe boyunca sürüklenmiştir.

Plaklar UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm dalga boyunda UV lambası altında gözlenmiştir ve lekeler, vanilin %1'lik derişik sülfürik asitteki çözeltisi plaklara püskürtölüp etüv de 105 °C'de 5 dakika ısıtılarak belirlenmiştir.

Adsorban : Normal faz silika jel (Hazır alüminyum plak, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,2 mm, 20×20 cm, Merck 5554; RP-18 F₂₅₄, Merck-5559)

Çözücü Sistemleri : CHCl₃: MeOH: H₂O (90:10:1, 80:20:2, 70:30:3, 61:32:7, 50:50:5)

: CHCl₃: MeOH (80:20, 70:30, 60:40, 50:50)

: EtOAc: MeOH:H₂O (7:2:1, 100:10:5)

: EtOAc: CH₃COOH: HCOOH: H₂O (25:2:2:4)

: *n*-Hekzan: EtOAc (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50)

: MeOH: H₂O (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7)

3.1.3.2. Vakum Sıvı Kromatografisi

Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK) çalışmamızda bazı ekstrelerin ön fraksiyonlanmasında kullanılmıştır. Yeterli miktardaki adsorban, kendinden filtreli cam kolona doldurularak vakum yardımıyla sıkıştırılmıştır. Kolondan bir miktar metanol

geçirilerek adsorbanın doygunluğu sağlanmıştır. Kolondan önce yeterli miktarda su daha sonra da elüsyona başlanacak solvan sistemi geçirilerek kolon şartlandırılmıştır.

3.1.3.3. Açık Kolon Kromatografisi

Yapılan çalışmalarımızda adsorban olarak normal faz silika jel, ters faz silika jel ve sefadeks kullanılmış olan açık kolon kromatografisi yöntemlerinden yararlanılmıştır. Fraksiyonlar ön fraksiyonlama işleminde 50'şer ml, saflaştırma aşamalarında ise 5-10 ml toplanmıştır ve kontrolleri İTK ile yapılarak, İTK sonuçlarına göre fraksiyonlar birleştirilerek kuruluğa kadar uçurulup, birleştirilen fraksiyonların miktarları belirlenmiştir.

3.1.3.4. Normal Faz Silikajel Kolon Kromatografisi

Silika jel kolon kromatografisinde fraksiyonların madde miktarına göre belirlenen miktarda silika jel tartılarak, yeterli miktarda çözücü sistemi ile süspande hale getirilmiş ve bu karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Kolondan uygulanacak numunenin yapısına göre belirlenen yeterli solvan sistemi miktarı geçirilerek, adsorbanın yerleşmesi sağlanmış ve adsorban üzerinde 2-3 mm çözücü kalıncaya kadar beklenerek, kolon numune tatbiğine hazır hale getirilmiştir.

Numune tatbiki: Numune seçilen uygun solvan sistemi ile yeterli miktarda çözülerek pastör pipeti yardımı ile önceden hazır hale getirilmiş kolona uygulanmıştır. Uygulanan numune adsorbana çekildikten sonra, solvan ilavesi yapıldıkça adsorban yüzeyinin bozulmaması için silika jelin üzerine bir miktar pamuk yerleştirilmiştir.

Adsorban	: Merck Silikajel 60 (0.063-0.200mm)
	: Merck Silikajel 60 (0.040-0.063mm)
Çözücü Sistemleri	: CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (90:10:1, 80:20:2, 70:30:3, 61:32:7, 50:50:5)
	: CHCl ₃ : MeOH (80:20, 70:30, 60:40, 50:50)
	: CHCl ₃ (100:0)
	: EtOAc: MeOH: H ₂ O (7:2:1, 100:10:5)
	: <i>n</i> -Hekzan: EtOAc (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50)

3.1.3.5. Sefadeks Kolon Kromatografisi (SFK-Jel Filtrasyon)

10-50 g sefadeks, yeterli miktar metanol veya CHCl_3 : MeOH (1:1) ile yaklaşık 6 saat şişmeye bırakılmıştır. Daha sonra dolgu materyali cam kolona doldurulmuş ve kolon yerleşene kadar kolondan metanol veya CHCl_3 : MeOH (1:1) çözücü sistemi geçirilmiştir.

Çözücü adsorbanın üzerinde 1-2 mm kalıncaya kadar akıtılarak kolon tatbik için hazır hale getirilmiştir.

Numune tatbiki: Numune seçilen uygun solvan sistemi ile yeterli miktarda çözülerek pastör pipet yardımı ile önceden hazır hale getirilmiş kolona uygulanmıştır.

Dolgu materyali : Sefadeks (Lipophilic Sefadeks LH-20, Sigma, 25-100 μ)

Çözücü Sistemleri : MeOH (100:0)

3.1.3.6 Ters Faz Silika Jel Kolon Kromatografisi

10-50 g ters faz silika jel, yeterli miktar saf su ile karıştırılmıştır. Dolgu materyali, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona doldurulmuş ve iyice yerleşene kadar kolondan saf su geçirilmiştir. Çözücü adsorbanın üzerinde 1-2 mm kalıncaya kadar akıtılmış, kolondaki adsorbanın yüzeyi düzeltildikten sonra suda çözülen numune tatbik edilmiştir. En başta saf su ile başlanan ters faz kolon kromatografisi devamında su dan metanole doğru polarite sistemine göre değişen solvan sisteminde devam edilmiştir.

Dolgu materyali : LiChroprep® RP-18 (Merck, 40-63 μm)

Çözücü Sistemleri : H_2O : MeOH (100:0, 90:10, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50)

3.1.3.7. Orta Basınçlı Sıvı Kromatografisi

VSK ile ön ayrımı yapılan fraksiyonlarda polariteleri birbirine çok yakın olan bileşiklerin birbirinden ayrılmasını sağlamak amacıyla Orta Basınçlı Sıvı Kromatografisi (OBSK) yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemde ters faz silika jel LiChroprep RP-18 ile doldurulmuş değişik ebatlardaki hazır kolonlar kullanılmıştır. Solvan sistemi pompa yardımıyla basınç uygulanarak kolona gönderilmiştir. Kolon solvan sistemi ile şartlandırıldıktan sonra aynı solvan sisteminde çözülmüş numune kolona enjekte edilmiştir. Fraksiyonlar fraksiyon toplayıcısı yardımı ile toplanmıştır.

3.1.3.8. Poliamit Kolon Kromatografisi

50-100 g poliamit yeterli miktarda distile su ile süspanse edilerek, manyetik bir karıştırıcıda 12-18 saat karıştırılarak şişmesi sağlanmıştır. Süspansiyon haline gelen karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır ve kolon yeterli miktarda su ile yıkanarak adsorbanın iyice yerleşmesi beklendikten sonra numune tatbik edilmiştir.

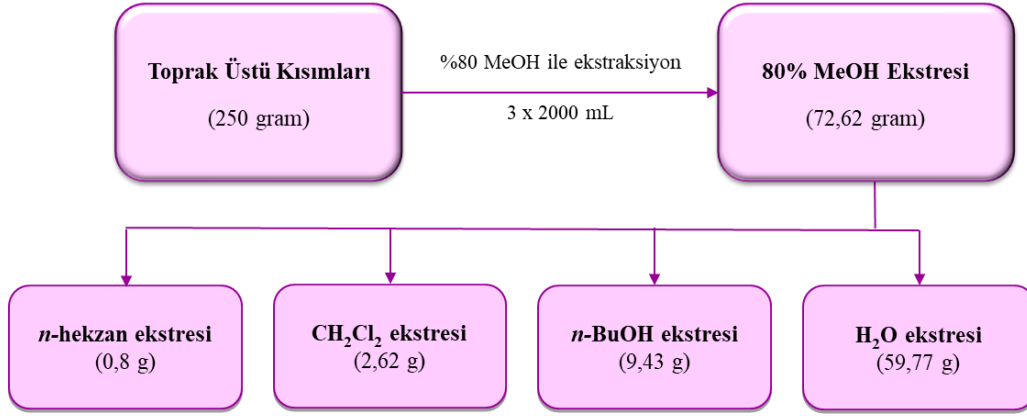
Adsorban : Poliamit (50-160 µm)

Çözücü Sistemleri : MeOH: H₂O (0:100→100:0)

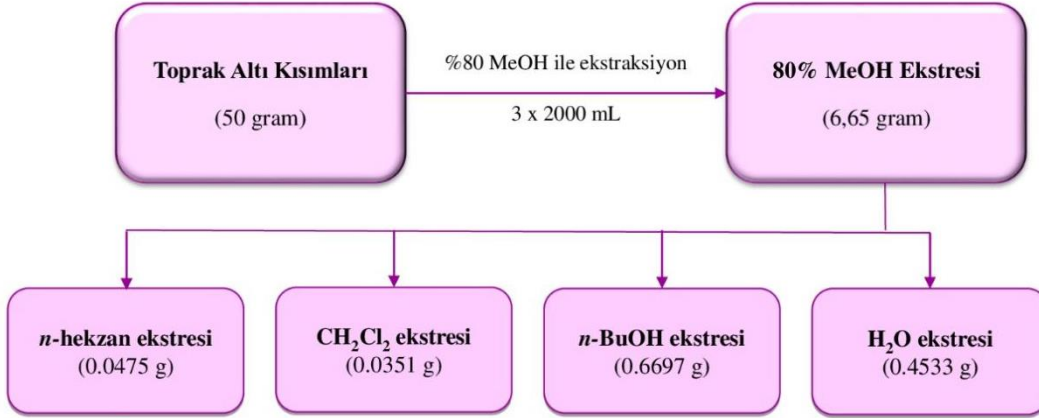
3.1.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama

Açık havada ve gölgede kurutulmuş bitkinin kökleri (50 g) ve toprak üstü kısımları (250 g) ayrıldıktan sonra değirmende toz edilmiştir. Bitki numuneleri ayrı ayrı 3'er adet 1 l'lik balona alınarak %80 metanol ile çalkalayıcıda 40 °C'de 6 saat ekstre edildikten sonra ekstreler süzgeç kâğıdından süzölmüştür. İşlem 3 kez daha tekrar edilerek süzöntüler birleştirilmiş, birleştirilen süzöntüler alçak basınç altında döner buharlaştırıcıda, 40 °C'de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Köklerden 6.65 g metanol ekstresi (verim: %13.30), toprak üstü kısımlardan 72.62 g metanol ekstresi (verim: %29.048) elde edilmiştir.

Toprak üstü (T.ü.) ve toprak altı (T.a.) metanol ekstreleri ayrı ayrı olmak üzere su:metanol karışımında (9:1) (300 ml) ile çözüldü ve çözelti ayırma hunisine alınarak sırasıyla sıvı-sıvı kromatografi esasına göre, *n*-hekzan (200 ml, ×3), diklorometan (200 ml, ×3) ve *n*-butanol (200 ml, ×3) ile fraksiyonlandı. Elde edilen *n*-hekzan, diklorometan, *n*-butanol alt ekstreleri döner buharlaştırıcıda 40 °C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Su alt ekstresi ise liyofilizatörde suyundan kurtarıldı. Bu işlemler sonucunda; bitkinin toprak altı metanol ekstresinden 0.0475 g *n*-hekzan, 0.0351 g diklorometan, 0.6697 g *n*-butanol ve 0.4533 g kalan su alt ekstreleri; toprak üstü metanol ekstresinden 2.06 g *n*-hekzan, 4.3 g diklorometan, 13.45 g *n*-butanol ve 7.61 g kalan su alt ekstreleri elde edilmiştir (Şekil.15-16).



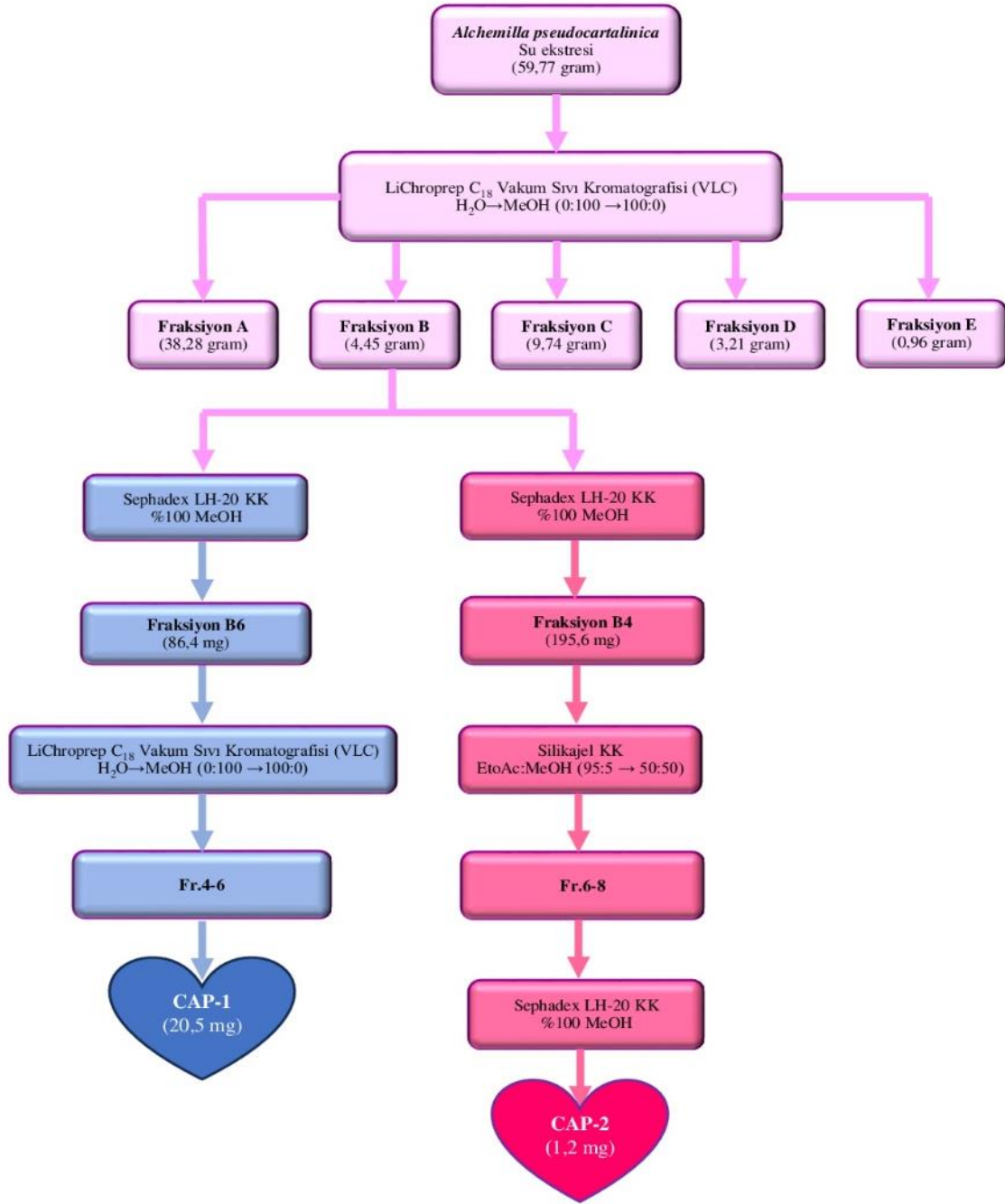
Şekil 15. *A. pseudocartanilica* bitkisinin toprak üstü kısımlarının ekstraksiyon şeması



Şekil 16. *A. pseudocartanilica* bitkisinin toprak altı kısımlarının ekstraksiyon şeması

3.1.5. İzolasyon Çalışmaları

A. pseudocartalinica bitkisinin toprak üstünden hazırlanan su alt ekstresinde en yüksek aktivite tespit edildiğinden izolasyon çalışmalarına bu ekstre üzerinden devam edilmiştir. *A. pseudocartalinica* bitkisinin toprak üstünden hazırlanan su alt fraksiyonundan (53.37 g) aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere yeterli miktarda ayrıldıktan sonra ters faz kolon kromatografisi (LiChrophep C₁₈) yardımıyla izolasyon çalışmalarına geçilmiştir. Vakumlu sıvı kromatografisi ile elde edilen 5 ana fraksiyon (A-E) içerisinde B fraksiyonu en aktif fraksiyon olarak bulunmuştur. Sephadex LH-20 kolon kromatografisinde artan polariteye göre seçilen çözücü sisteminde su:metanol (0 → %100 MeOH, %10 MeOH adımlarıyla, her biri 100 ml) çözücü sistemleri kullanılarak yapılan fraksiyonlama sonucunda Fr B1-B9 verecek şekilde 9 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon B6 (86.4 mg), LiChroprep C₁₈ VLC'ye tabi tutulmuştur. H₂O içerisinde artan konsantrasyonda MeOH'den oluşan çözücü sistemleriyle elüsyon (0 → %100 MeOH, %10 MeOH adımlarıyla, her biri 100 ml) bileşik 1'i (20.5 mg) vermiştir. Fraksiyon B4 (195.6 mg), EtOAc:MeOH (95:5 ila 50:50) çözücü sistemiyle gradient elüsyon yapan bir silika jel kolona (90 g) tatbik edilmiştir. Buradan alınan fraksiyon 6-8 Sephadex LH-20 kolonda metanol kullanılarak saflaştırılmış ve bileşik 2 (1.2 mg) elde edilmiştir (Şekil.17).



Şekil 17. *A. pesuedocartalinica* toprak üstü kısımlarına ait izolasyon şeması

3.1.6. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerikleri

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler sırasıyla Folin-Ciocalteu reaktifi (0,5 N), distile su ve %10 (w/v) sodyum karbonat ile karıştırılmıştır. Karışımlar oda sıcaklığında ve karanlıkta 120 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda absorbands 760 nm'de ölçülmüştür. Toplam fenolik içerik, numunenin kuru ağırlığı başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir (95).

Örneklerin toplam flavonoit içeriği daha önce bildirilen yöntem kullanılarak hesaplanmıştır (95). Örnekler %10 alüminyum nitrat ve 1 M amonyum asetat ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edilmiştir. Bunu takiben, absorbands 415 nm'de okunmuştur. Örneklerin toplam flavonoit içeriği, gram kuru ağırlık başına mg cinsinden kersetin eşdeğeri (QE) olarak verilmiştir.

3.1.7. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Çalışmaları

Toprak üstü kısımlara ve köklere ait ana ekstrelerin kimyasal profilinin incelenmesi için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik ayırma ters fazlı Agilent Poroshell 120 EC-C18 model (150 mm×2,1 mm, 2,7 µm) analitik kolondan kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. Elüsyon gradyanı eluent A (su + 5 mM amonyum format + %0,1 formik asit) ve eluent B'den (metanol + 5 mM amonyum format + %0,1 formik asit) oluşmuştur. Gradient elüsyon profili 0-25 dakika boyunca %20-100 B gradyanından oluşmuş, bunu 25-35 dakika boyunca %100 B izlemiş ve 35-45 dakika boyunca %20 B gradyanı ile sonlandırılmıştır. Çözücü akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 0,5 ml/dak ve 5 µl olarak ayarlanmıştır (96. 97). Kütle spektrometrik tespit için Shimadzu LCMS-8040 model tandem kütle spektrometresi kullanılmıştır. Bir elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı ile donatılmış ve hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modlarında çalıştırılmıştır. LC-ESI-MS/MS verilerini elde etmek ve işlemek için LabSolutions yazılımı (Shimadzu) kullanılmıştır. Fitokimyasalların miktarını ölçmek için çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi kullanılmıştır. Kütle spektrometresi (MS) çalışma koşulları: 15 l/dk kurutma gazı (N₂) akış hızı, 3 l/dk nebülize edici gaz (N₂) akış hızı, 250 °C DL sıcaklığı, 400 °C ısı bloğu sıcaklığı ve 350 °C arayüz sıcaklığı şeklindedir (97).

3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Toprak üstü ve toprak altı sulu metanol ekstralarının ve bu ekstralardan hazırlanan *n*-hekzan, kloroform, *n*-butanol ve su alt ekstralarının biyolojik aktiviteleri aşağıdaki yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

3.2.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Numunelerin, DPPH radikal süpürme aktivitesi spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür (98). Öncelikle metanolde çözünen numunelerin stok çözeltisi 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanılmış, sonrasında ise deneyde kullanılmak amacıyla 25-200 µg/ml çalışma çözeltileri hazırlanarak 0,2 mM DPPH'ın metanoldeki çözeltisi üzerine eklenilmiştir. 517 nm değerinde absorbans değeri karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon yapılarak ölçülmüştür. Numunelerin artan konsantrasyonuna karşı DPPH radikal süpürme aktivitesi aşağıda verilen formülden hesaplanmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak gallik asit kullanılmış ve tüm deneyler altı tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Formül: % İnhibisyon = $(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$ A_{kontrol} : DPPH çözeltisinin absorbansı; A_{numune} : Numunelerin ilavesi sonrasında DPPH çözeltisinin absorbansı.

3.2.2. Fosfomolibdenyum İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi

Fosfomolibdenyum indirgeyici antioksidan kapasite (PRAP) ölçüm yöntemi %10'luk fosfomolibdik asit kullanılarak hesaplanarak, standart bileşik olarak kersetin kullanılmıştır (99). İlk olarak etanol içerisinde %10'luk fosfomolibdenyum çözeltisi hazırlanılmış ve son hacim 1 ml olacak şekilde örneklerin çeşitli konsantrasyonları çözeltiliye ilave edilmiştir. Karışım 80 °C'de 30 dakika inkübe edilerek, süre sonunda karışımların absorbansları 600 nm'de okunmasıyla kersetin ile karşılaştırılıp fosfomolibdenyum indirgeyici antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve standart sapması (SD) hesaplanmıştır.

3.2.3. Metal Şelat Yapma Kapasitesi

Demir iyonu şelatlama etkisi Chue ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod kullanılarak belirlenmiştir (100). Numunelerin farklı konsantrasyonlarının (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) 740 µl'sine 20 µl 2 mM FeCl₂ ilave edilmiş, daha sonra 40 µl 5 mM ferrozin ilavesinden sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek numunelerin

absorbansı 562 nm’de ölçülmüş ve 1 numaralı formülden % inhibisyonu hesaplanılmıştır. EDTA standart olarak kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildikten sonra standart sapma (SD) hesaplanılmıştır.

3.2.4. Demir İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi

Demir-indirgeyici antioksidan kapasite ölçümü (FRAP) Oyaizu ve arkadaşları tarafından geliştirilen metoda göre belirlenmiştir (100). 1 ml numune çözeltisine 1 ml pH 6.6 fosfat tampon ve 1 ml potasyum ferrisiyanid çözeltisi ilave edilmiş, karışım 50 °C’de 20 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml %10’luk trikloroasetik asit ilave edilerek, hızla çalkalandıktan sonra 1 ml saf su ilave edilmiştir. Son olarak 100 µl %0.15 FeCl₃ ilave edildikten sonra 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından örneklerin 700 nm’de absorbansları ölçülerek ve standart olarak kullanılan BHA eşdeğeri olarak verilmiştir (BHA, mg/g numune).

3.2.5. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu

Numunelerin, tirozinaz inhibisyon etkinliği spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir (102). Hazırlanan numunelerin (20-200 µg/ml) her birinden 20 µl alınmış ve daha önceden her birine 100 µl fosfat tamponu (pH 6.8) eklenmiş kuyucuklara ilave edilmiştir. Üzerine 250 U/ml tirozinaz (20 µl) çözeltisi ilave edilerek 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından 3 mM levodopa (20 µl) çözeltisi ilave edilmiş ve tekrar 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında mikropilaya içeriklerinin absorbansları 475 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Çalışmada pozitif kontrol olarak kojik asit kullanılmış ve numunelerin artan konsantrasyonuna karşı tirozinaz inhibisyonu aşağıda verilen formülden hesaplanılmıştır. Tüm deneyler altı tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Formül} : \% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

A_{kontrol} : Numunelerin ilavesi olmaksızın ölçülen absorbans;

A_{numune} : Numunelerin ilavesi sonrasında ölçülen absorbans.

3.2.6. Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu

Numunelerin asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) inhibisyon etkinliği spektrofotometrik yöntem kullanılarak incelenilmiştir (95). Numuneler farklı konsantrasyonlarda (50-1000 µg/ml) 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.0) ile

seyreltilmiş ve kuyucuk içeriği, Tris-HCl tamponu (50 µl), 3 mM DTNB (125 µl), 0.2 U/ml konsantrasyondaki AChE/BuChE (25 µl) ve numunelerin farklı konsantrasyonları (25 µl) olacak şekilde hazırlanılmıştır. Karışım 25°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından her bir kuyucuğa 15 mM AChI/BuChI (25 µl) çözeltisinden ilave edilip yeniden 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından karışımların absorbansları 405 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada pozitif kontrol olarak galantamin kullanılmış ve tüm deneyler altı tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Numunelerin artan konsantrasyonuna karşı kolinesteraz inhibisyonu yukarıda verilen formülden hesaplanılmıştır.

3.2.7. α -glukozidaz İnhibitör Etkinlik

Numunelerin α -glukozidaz enzim inhibitör etkilerinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır (102). 0.1 M pH 6.9 fosfat tamponu içindeki bileşiklerin farklı konsantrasyonlarına (100-1000 µg/ml, 50 µl), 0.5 U/ml α -glukozidaz (100 µl) ilave edilmiş ve mikrolaka içinde 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 4-pNPG (50 µl) ilave edildikten sonra yeniden 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve absorbans, mikrolaka okuyucu kullanılarak 405 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada pozitif kontrol olarak akarboz kullanılmıştır. Tüm deneyler altı tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Numunelerin artan konsantrasyonuna karşı α -glukozidaz enzim inhibisyonu yukarıda verilen formülden hesaplanılmıştır.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

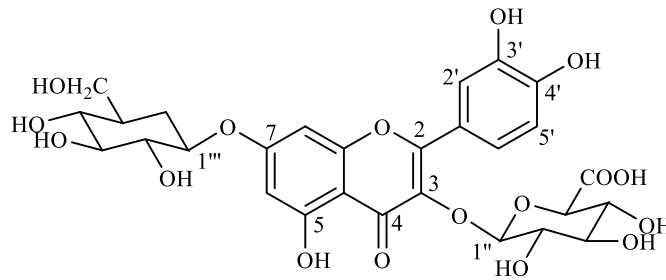
Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Sonuçların hesaplanmasında GraphPad Prism 6.0 ve Microsoft Excel Windows 13 programları kullanılmıştır. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından enzim inhibisyonu için Tukey testleri ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları karşılaştırmak için T-testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ ise ortamlar arası fark anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri

B fraksiyonu diğer fraksiyonlara göre daha yüksek aktivite sergilediği için bu fraksiyon üzerinden izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *A. pseudocartalinica*'nın toprak üstü kısımlarından iki bileşik izole edilip yapıları aydınlatılmıştır.

4.1.1. Kersetin 7-O-β-D-glukopiranozil-3-O-β-D-glukuronopiranozit



Şekil 18. Kersetin 7-O-β-D-glukopiranozil-3-O-β-D-glukuronopiranozit (CAP-1)

CAP-1 kodlu bileşik sarı renkli ve amorf yapıda elde edilmiştir. Bileşiğin İTK analizinde gün ışığında ve UV₂₅₄ nm'de sarı renk gözlenmiştir. Vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile 110°C'de 2 dakika ısıtıldığında sarı renk vermesi bileşiğin flavonoit olabileceğini göstermiştir.

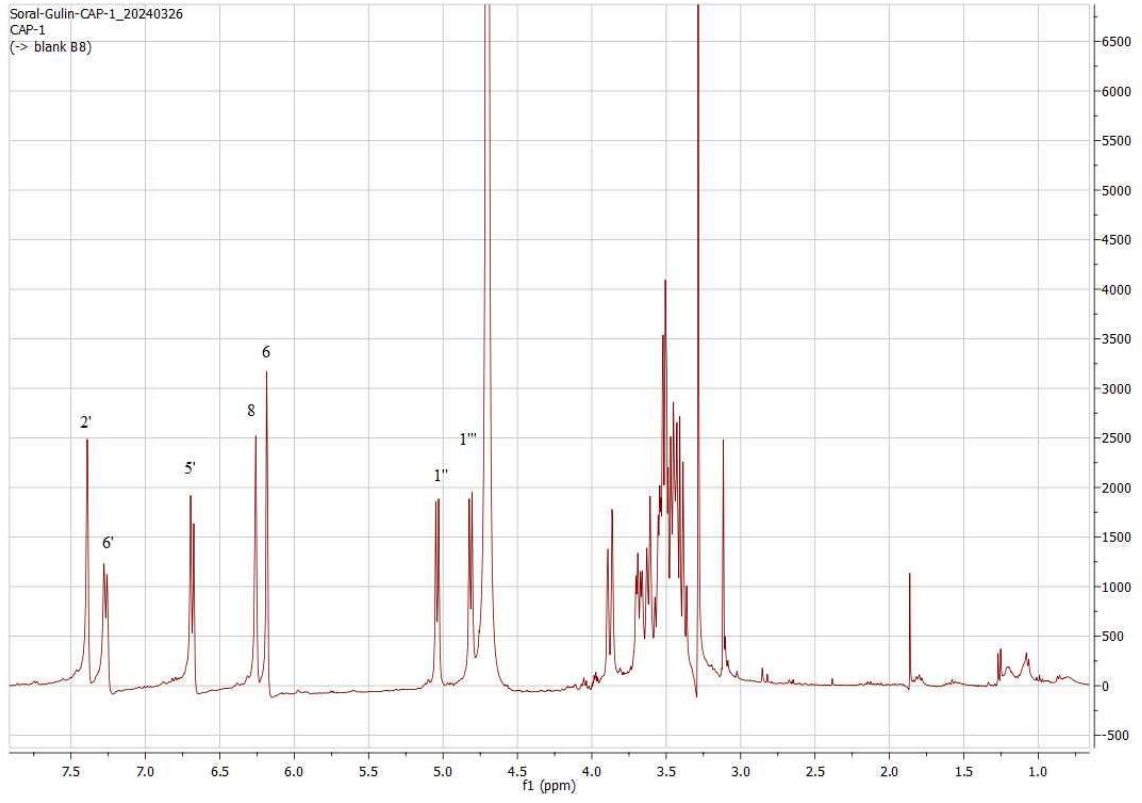
Bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda aromatik bölgede bileşiğe ait toplam 5 protona karşılık gelen 5 sinyal görülmektedir (Şekil 19). ¹H-NMR spektrumunda aromatik bölgede sırasıyla δ_H 6.255 (d, J = 2.1 Hz, 1H) ile δ_H 6.181 (d, J = 2.1 Hz, 1H) ppm'de görülen sinyallerin flavonoit A halkalarının H-8 ve H-6 protonlarına ait olduğu ve A halkasının 5 ve 7 numaralı pozisyonlardan olmak üzere disubstitüe olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca δ_H 7.387 (s, 1H), δ_H 7.265 (d, J = 8.4 Hz, 1H) ile δ_H 6.683 (d, J = 8.4 Hz, 1H) sinyalleri B halkasının 3', 4'-disubstitüe olduğunu göstermiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak bileşiğin kersetin aglikonu içerdiği tespit edilmiştir.

¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumlarında görülen δ_H 5.037 (d, J = 7.4 Hz, 1H), δ_H 4.812 (d, J = 7.6 Hz, 1H) ve δ_C 101.98, δ_C 99.65 anomerik proton sinyalleri diğer oz sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde β-glukoz'a ait olduğu anlaşılmaktadır. Anomerik protonlarının

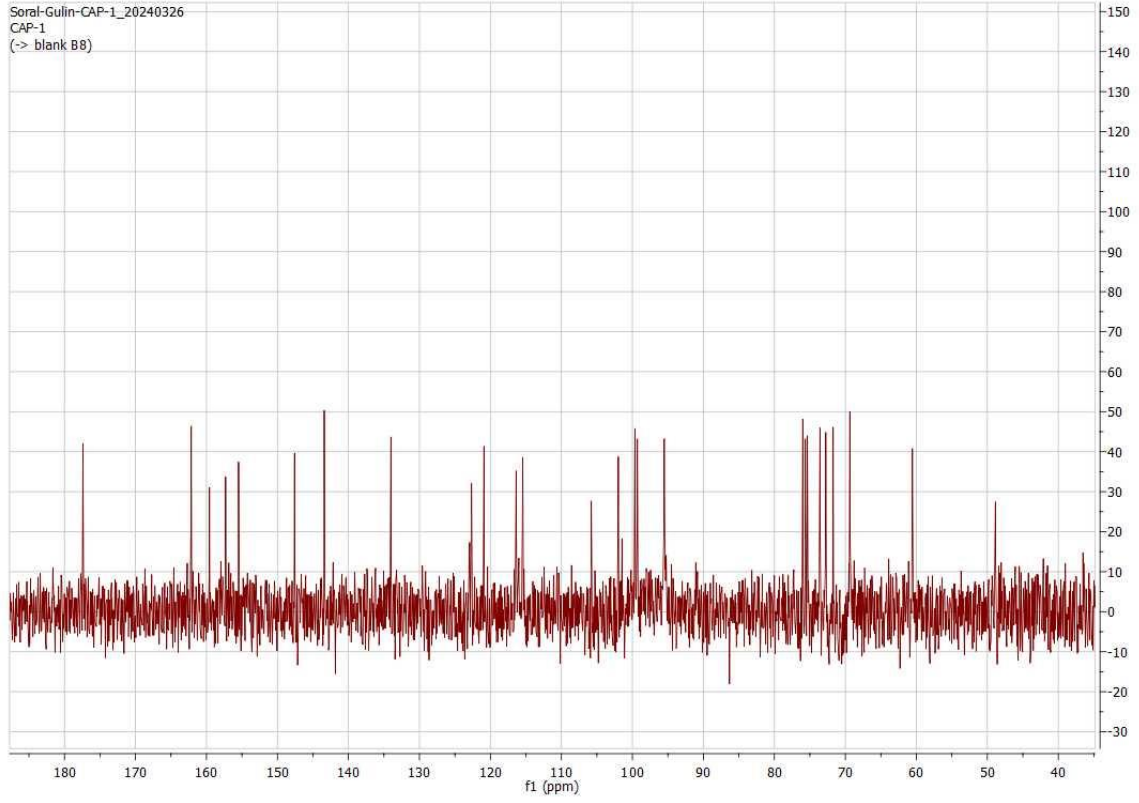
Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonları (HMBC) ve ilgili aromatik karbonlar, 2 şeker ünitesinin kersetin aglikonuna 3,7-disubstitüsyonunu ortaya çıkarmıştır. Değişken spin kilit süresine sahip 1D Toplam Korelasyon Spektroskopisi (TOCSY) yardımıyla, şeker birimlerindeki hidroksil olmayan tüm protonların sandalye konformasyonlarında piranozil halkalarının eksenel pozisyonlarında olduğu bulunmuştur. Kersetin'in hidroksil grubuna 3. pozisyondan bağlı olan şekerin 6. pozisyonda bir CH₂ grubu içermediği tespit edilmiş, dolayısıyla bir uronik asitin varlığı düşünülmüştür. 3-O-glukuronopiranozitin karboksilik asit kısmının ¹³C sinyali ¹³C NMR spektrumunda görünmemesine rağmen şekerin protonunun H-5 ile bir HMBC korelasyonunun gözlemlenmesiyle varlığı kanıtlanmıştır.

Bileşiklerin kimyasal kayma değerleri ve multipler desenleri, önceki farmakognozik çalışmalarda izole edilen doğal bileşiklere ait bulgular ve literatür verileriyle karşılaştırılarak bileşik kersetin 7-O-β-D-glukopiranozil-3-O-β-D-glukuronopiranozit olarak tanımlanmıştır (Şekil 19-23) (103).

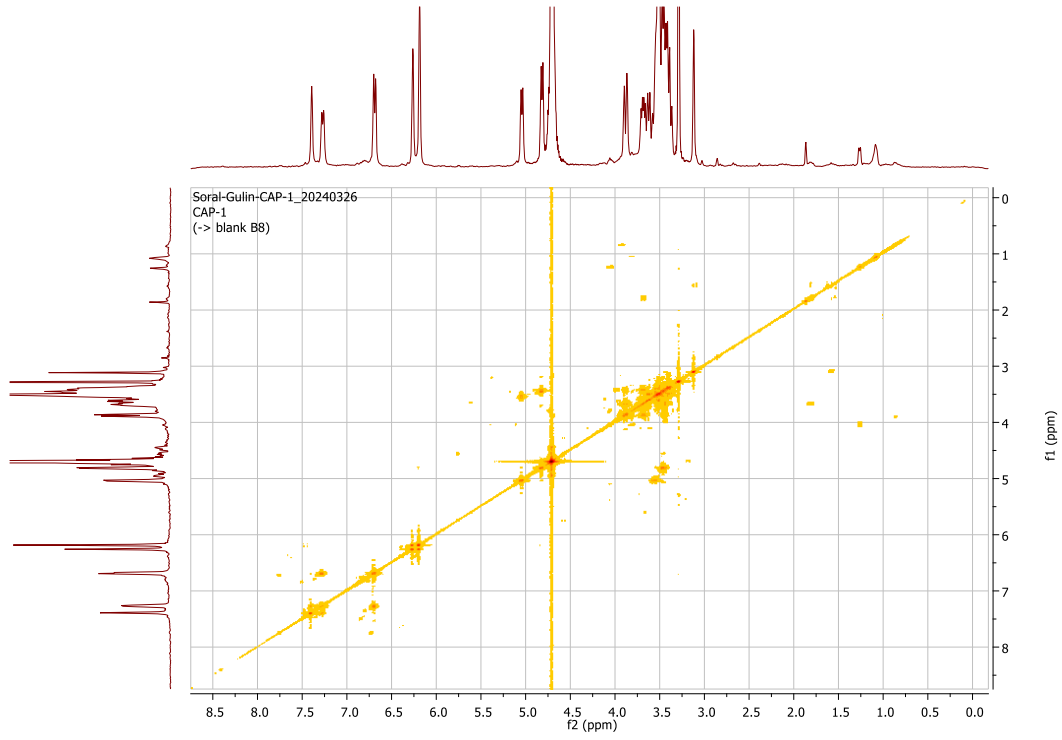
Kersetin 7-O-β-D-glukopiranozil-3-O-β-D-glukuronopiranozit (1): ¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ = 7.387 (s, 1H, H-2'), 7.265 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 6.683 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 6.255 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.181 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 5.037 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-1''), 4.812 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-1'''), 3.876 (dd, J = 12.5, 2.2 Hz, 1H), 3.680 (dd, J = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 3.618 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.555 (dd, J = 9.6, 7.4 Hz, 1H), 3.525 (dd, J = 9.4, 8.9 Hz, 1H), 3.519 (dd, J = 9.7, 8.6 Hz, 1H), 3.494 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.450 (dd, J = 9.7, 7.6 Hz, 1H), 3.431 (ddd, J = 9.6, 5.0, 2.2 Hz, 1H), 3.385 (dd, J = 9.6, 8.6 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 101 MHz): δ = 177.40, 175.26 (sadece HMBC), 162.14, 159.58, 157.30, 155.48, 147.59, 143.41, 134.02, 122.66, 120.91, 116.38, 115.44, 105.79, 101.98, 99.65, 99.30, 95.51, 77.25, 76.00, 75.64, 75.35, 73.58, 72.75, 71.72, 69.37, 60.56 ppm.



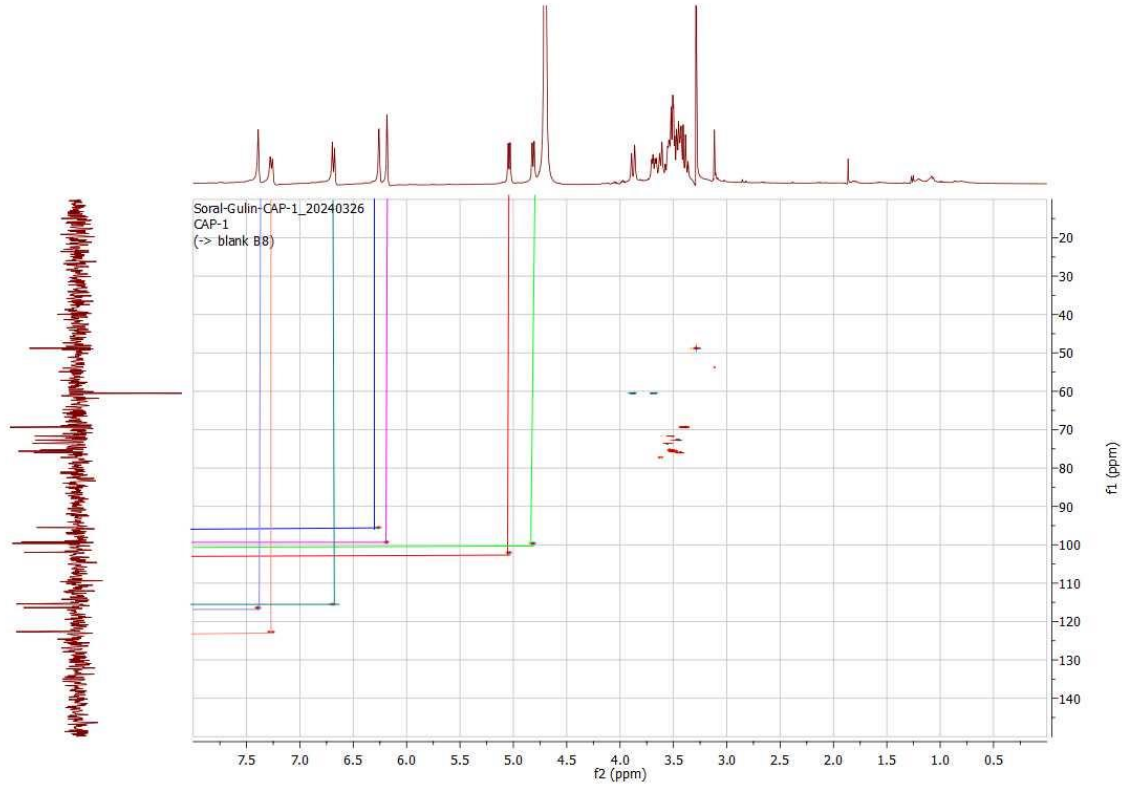
Şekil 19. Kersetin 7-*O*- β -D-glukopiranozil-3-*O*- β -D-glukuronopiranozit (**CAP-1**)'in ¹H-NMR Spektrumu



Şekil 20. Kersetin 7-*O*- β -D-glukopiranozil-3-*O*- β -D-glukuronopiranozit (**CAP-1**)'in ¹³C-NMR Spektrumu

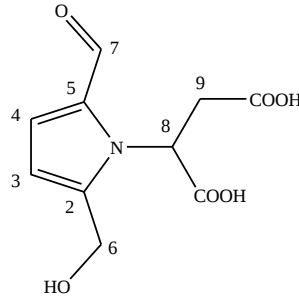


Şekil 21. Kersetin 7-*O*- β -D-glukopiranozil-3-*O*- β -D-glukuronopiranozit (**CAP-1**)’in 2-D COSY Spektrumu



Şekil 22. Kersetin 7-*O*- β -D-glukopiranozil-3-*O*- β -D-glukuronopiranozit (**CAP-1**)'in HSQC Spektrumu

4.1.2. α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit

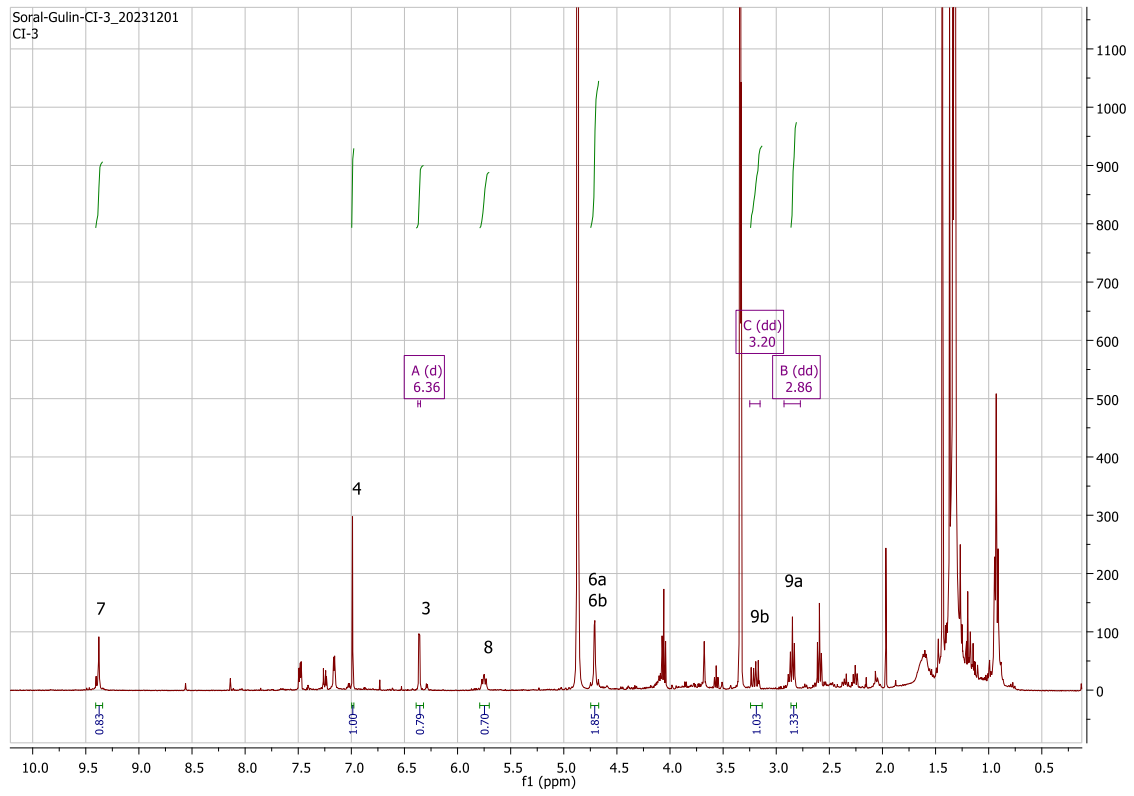


Şekil 23. α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (CAP-2)

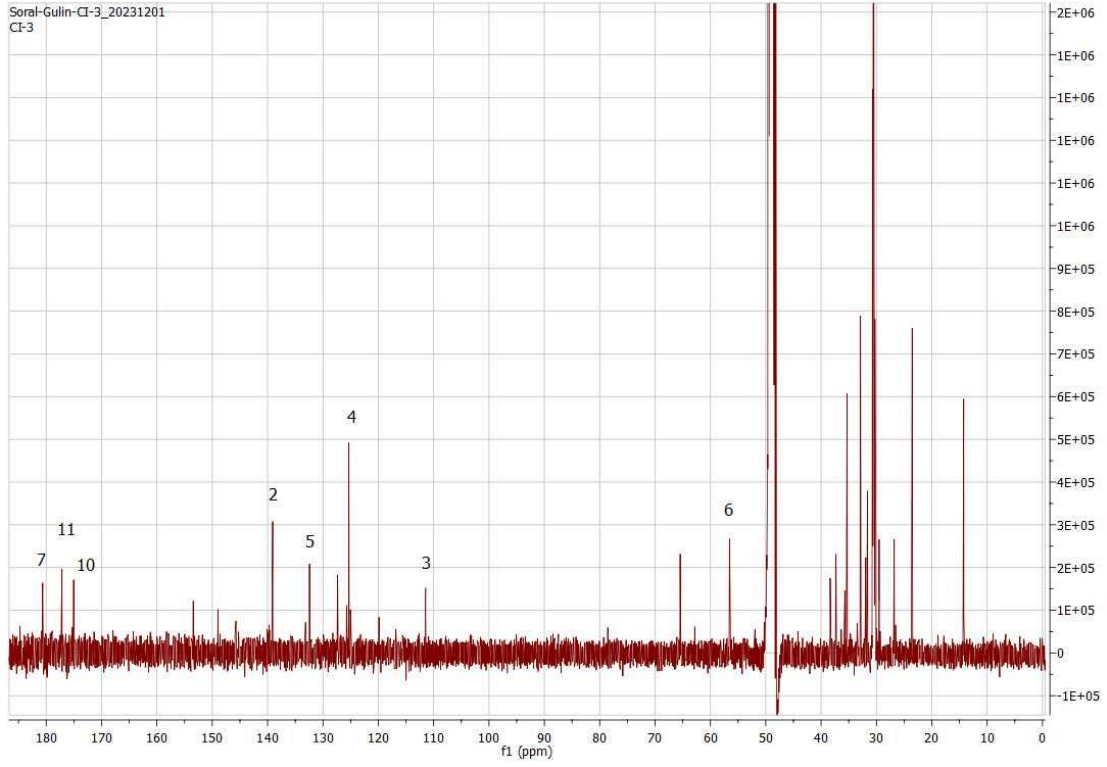
CAP-2 kodlu bileşik beyaz renkli ve amorf yapıda elde edilmiştir. Bileşiğin İTK analizinde vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile 110°C’de 2 dakika ısıtıldığında mor renk verdiği gözlenmiştir.

Bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda aromatik bölgede bileşiğe ait toplam 8 protona karşılık gelen 8 sinyal görülmektedir (Şekil 24). Kimyasal kayma değerleri ve COSY korelasyonları, sırasıyla 2 ve 5 pozisyonlarında bir formil grubu ve bir hidroksimetil grubu ile süstitüe edilmiş bir pirol halkasının varlığına işaret etmektedir (Şekil 24-27). Bir protonun $\delta_H=5,723$ ppm ve C-2 ($\delta_C=133,33$ ppm) ve C-5 ($\delta_C=145,9$ ppm) karbonları ile beklenmedik bir HMBC korelasyonunun ortaya çıkması pirol halkasının N-süstitüsyonunu düşündürmüştür. Süstitüentin HSQC ve HMBC desenlerinin analizinden sonra, bileşik (2)'nin yapısının α -[(2-formil-5-hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit olduğu düşünülmüş ve mevcut literatür verileri ile yapı doğrulanmıştır (101).

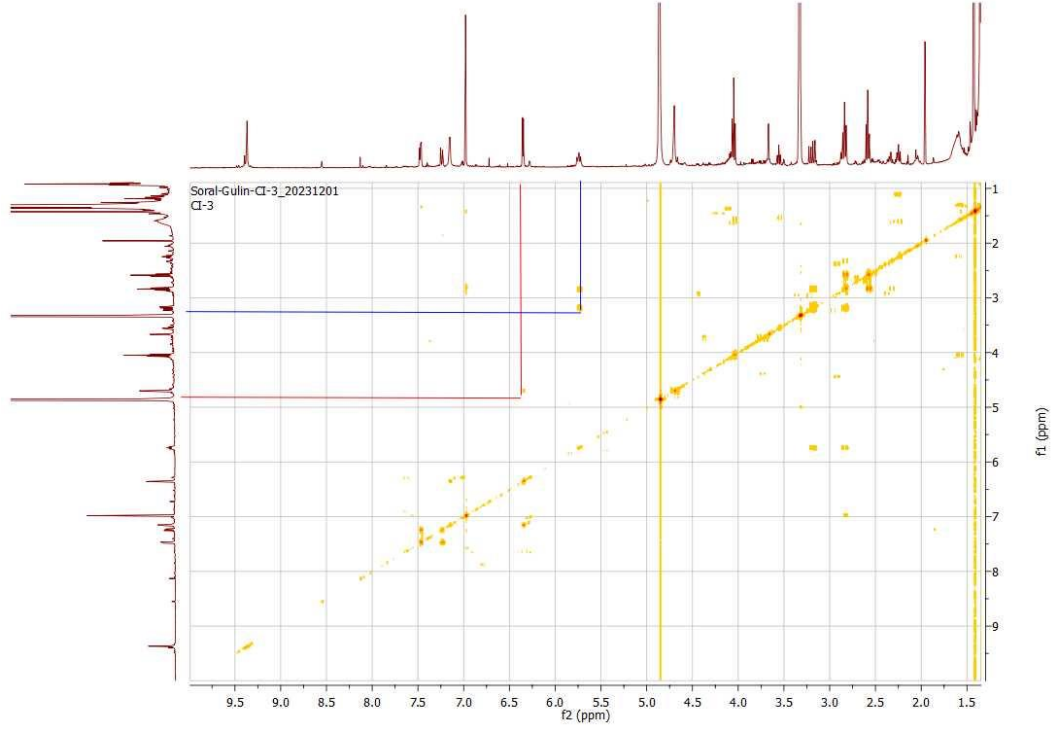
α -[(2-formil-5-hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (2): ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 9.349 (s, 1H), 7.134 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.363 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.723 (br dd, J = 9.2, 7.1 Hz, 1H), 4.683 (m, 2H), 3.195 (dd, J = 17.3, 9.2 Hz, 1H), 2.860 (dd, J = 17.3, 7.1 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (CD₃OD, 101 MHz): δ = 180.81, 177.37, 177.34, 145.90, 133.33, 127.54, 111.64, 56.73, 56.64, 38.55 ppm.



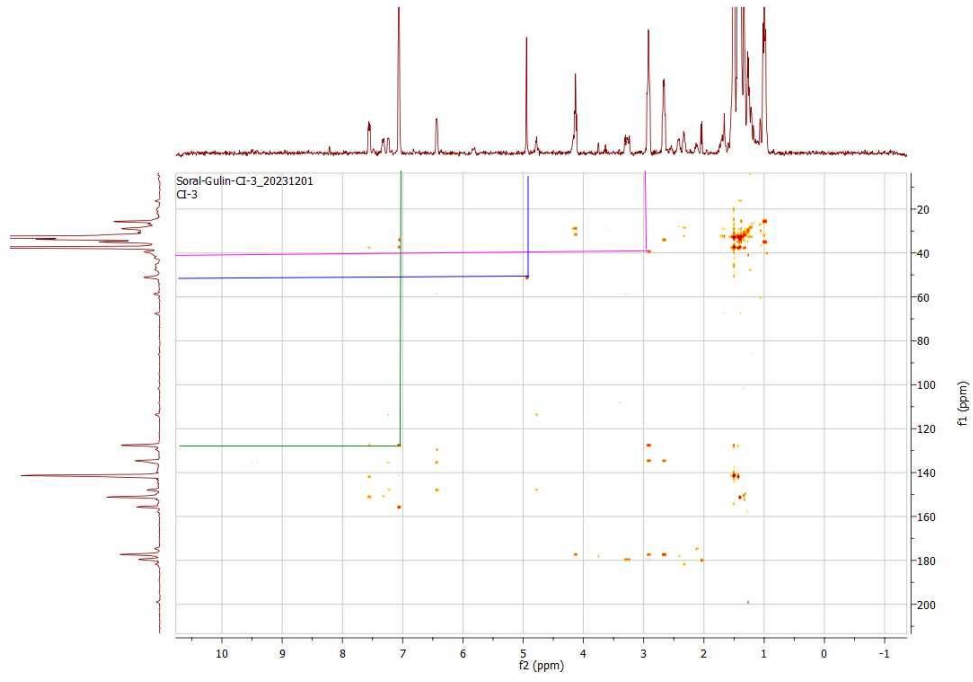
Şekil 24. α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (**CAP-2**)'in ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 25. α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (**CAP-2**)'in ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 26. α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (**CAP-2**)'in 2-D COSY Spektrumu



Şekil 27. α -[(2-formil-5 hidroksimetil)pirol-1-il]aspartik asit (**CAP-2**)'in 2-D HSQC Spektrumu

4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoit İçerik

Toplam fenolik ve flavonoit içerik analiz sonuçları Tablo 9-10'de sunulmuştur. En yüksek toplam fenolik içeriğe sahip ekstreler sırasıyla kök *n*-butanol alt ekstresi (688.92 ± 23.04 mg GAE/g kuru ağırlık), kök metanol ekstresi (432.31 ± 3.60 mg GAE/g kuru ağırlık) ve kök diklorometan alt ekstresi (409.55 ± 11.30 mg GAE/g kuru ağırlık) olarak bulunmuştur. En yüksek toplam flavonoit içeriğine sahip ekstreler ise sırasıyla toprak üstü diklorometan alt ekstresi (135.01 ± 7.28 mg QE/g kuru ağırlık), toprak üstü *n*-hekzan alt ekstresi (84.67 ± 5.57 mg QE/g kuru ağırlık) ve toprak üstü metanol ekstresi (70.05 ± 3.91 mg QE/g kuru ağırlık) olmuştur. Genel olarak, kök ekstrelerinin toplam flavonoit içeriği toprak üstü kısımlardan hazırlanan ekstrelere kıyasla daha düşük çıkmasına rağmen toplam fenolik madde içeriğinin kök ekstrelerinde daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Tablo 9. Ekstrelerin ve alt ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri

Ekstre	Toplam fenolik madde mg GAE/g kuru ağırlık	Toplam flavonoit mg QE/g kuru ağırlık
Kök metanol ekstresi	432.31±3.60	15.37±0.61
Kök <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	264.46±4.20	14.37±1.44
Kök diklorometan alt ekstresi	409.55±11.30	4.85±0.40
Kök <i>n</i> -butanol alt ekstresi	688.92±23.04	14.44±1.20
Kök su alt ekstresi	331.95±14.50	15.36±3.58
Toprak üstü metanol ekstresi	262.37±7.24	70.05±3.91
Toprak üstü <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	232.91±4.75	84.67±5.57
Toprak üstü diklorometan alt ekstresi	280.36±10.38	135.01±7.28
Toprak üstü <i>n</i> -butanol alt ekstresi	302.64±7.03	20.28±1.44
Toprak üstü su alt ekstresi	288.77±13.90	7.05±0.88

Tablo 10. Fraksiyonların toplam fenolik içerikleri

Fraksiyon	Toplam fenolik madde mg GAE/g kuru ağırlık
A fraksiyonu	62.37±6.37
B fraksiyonu	430.46±15.46
C fraksiyonu	452.24±6.40
D fraksiyonu	356.72±24.38
E fraksiyonu	311.41±12.30

4.3. Sıvı Kromatografisi -Kütle Spektrometresi Analiz Sonuçları

Kök metanol ekstresi ve toprak üstü metanol ekstresi 'nin kimyasal analizi LC-MS/MS tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 28). Daha önce geliştirilmiş ve valide edilmiş bir yöntem kullanılmıştır (97). Yönteme ait validasyon parametreleri Tablo 11’de verilmiştir.

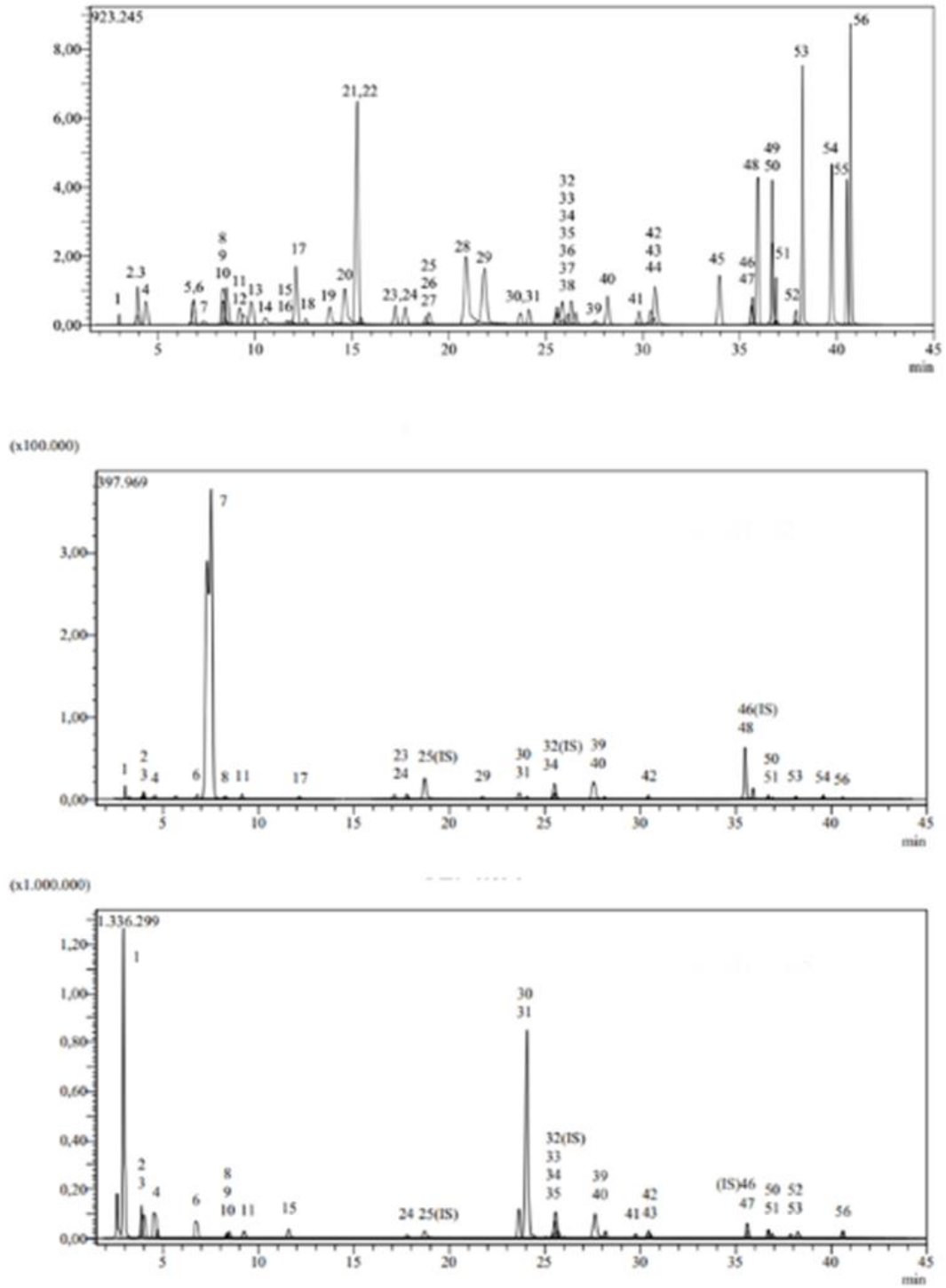
Tablo 11. LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri

No	Bileşenler	RT ^a	M.L. (m/z) ^b	F.L. (m/z) ^c	İyon Mod	Denklem	r ^{2d}	RS ² % ^e Günler arası	Gün içinde	Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^f	Geri kazanım (%) Günler arası	Gün içinde	U ^g	Gr. No ^j
1	Kinik asit	3.0	190.8	93.0	-	y=-0.0129989+2.97989x	0.996	0.69	0.51	0.1-5	25.7/33.3	1.0011	1.0083	0.0372	1
2	Fumarik asit	3.9	115.2	40.9	-	y=-0.0817862+1.03467x	0.995	1.05	1.02	1-50	135.7/167.9	0.9963	1.0016	0.0091	1
3	Aronik asit	4.0	172.8	129.0	-	y=-0.7014530+32.9994x	0.971	2.07	0.93	0.1-5	16.4/31.4	0.9968	1.0068	0.0247	1
4	Gallik asit	4.4	168.8	79.0	-	y=0.0547697+20.8152x	0.999	1.60	0.81	0.1-5	13.2/17.0	1.0010	0.9947	0.0112	1
5	Epigallokateşin	6.7	304.8	219.0	-	y=- 0.00494986+0.0483704x	0.998	1.22	0.73	1-50	237.5/265.9	0.9969	1.0040	0.0184	3
6	Protokateşik asit	6.8	152.8	108.0	-	y=0.211373+12.8622x	0.957	1.43	0.76	0.1-5	21.9/38.6	0.9972	1.0055	0.0350	1
7	Kateşin	7.4	288.8	203.1	-	y=- 0.00370053+0.431369x	0.999	2.14	1.08	0.2-10	55.0/78.0	1.0024	1.0045	0.0221	3
8	Gentisik asit	8.3	152.8	109.0	-	y=-0.0238983+12.1494x	0.997	1.81	1.22	0.1-5	18.5/28.2	0.9963	1.0077	0.0167	1
9	Klorojenik asit	8.4	353.0	85.0	-	y=0.289983+36.3926x	0.995	2.15	1.52	0.1-5	13.1/17.6	1.0000	1.0023	0.0213	1
10	Protokateşik aldehit	8.5	137.2	92.0	-	y=0.257085+25.4657x	0.996	2.08	0.57	0.1-5	15.4/22.2	1.0002	0.9988	0.0396	1
11	Tannik asit	9.2	182.8	78.0	-	y=0.0126307+26.9263x	0.999	2.40	1.16	0.05-2.5	15.3/22.7	0.9970	0.9950	0.0190	1
12	Epikateşin gallat	9.4	457.0	305.1	-	y=-0.0380744+1.61233x	0.999	1.30	0.63	0.2-10	61.0/86.0	0.9981	1.0079	0.0147	3
13	1,5- dikafeoilkinik asit	9.8	515.0	191.0	-	y=-0.0164044+16.6535x	0.999	2.42	1.48	0.1-5	5.8/9.4	0.9983	0.9997	0.0306	1
14	4-OH Benzoik asit	10.5	137.2	65.0	-	y=-0.0240747+5.06492x	0.999	1.24	0.97	0.2-10	68.4/88.1	1.0032	1.0068	0.0237	1
15	Epikateşin	11.6	289.0	203.0	-	y=- 0.0172078+0.0833424x	0.996	1.47	0.62	1-50	139.6/161.6	1.0013	1.0012	0.0221	3
16	Vanilik asit	11.8	166.8	108.0	-	y=-0.0480183+0.779564x	0.999	1.92	0.76	1-50	141.9/164.9	1.0022	0.9998	0.0145	1
17	Kafeik asit	12.1	179.0	134.0	-	y=0.120319+95.4610x	0.999	1.11	1.25	0.05-2.5	7.7/9.5	1.0015	1.0042	0.0152	1
18	Siringik asit	12.6	196.8	166.9	-	y=-0.0458599+0.663948x	0.998	1.18	1.09	1-50	82.3/104.5	1.0006	1.0072	0.0129	1
19	Vanilin	13.9	153.1	125.0	+	y=0.00185898+20.7382x	0.996	1.10	0.85	0.1-5	24.5/30.4	1.0009	0.9967	0.0122	1
20	Siringik aldehit	14.6	181.0	151.1	-	y=-0.0128684+7.90153x	0.999	2.51	0.77	0.4-20	19.7/28.0	1.0001	0.9964	0.0215	1
21	Daidzin	15.2	417.1	199.0	+	y=9.45747+152.338x	0.996	2.25	1.32	0.05-2.5	7.0/9.5	0.9955	1.0017	0.0202	2
22	Epikateşin gallat	15.5	441.0	289.0	-	y=-0.0142216+1.06768x	0.997	1.63	1.28	0.1-5	19.5/28.5	0.9984	0.9946	0.0229	3
23	Piceid	17.2	391.0	135/106.9	+	y=0.00772525+25.4181x	0.999	1.94	1.16	0.05-2.5	13.8/17.8	1.0042	0.9979	0.0199	1
24	p-Kumarik asit	17.8	163.0	93.0	-	y=0.0249034+18.5180x	0.999	1.92	1.43	0.1-5	25.9/34.9	1.0049	1.0001	0.0194	1
25	Ferulik asit-D3- IS ^h	18.8	196.2	152.1	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.0170	1
26	Ferulik asit	18.8	192.8	149.0	-	y=-0.0735254+1.34476x	0.999	1.44	0.53	1-50	11.8/15.6	0.9951	0.9976	0.0181	1
27	Sinapik asit	18.9	222.8	193.0	-	y=-0.0929932+0.836324x	0.999	1.45	0.52	0.2-10	65.2/82.3	1.0031	1.0037	0.0317	1
28	Kumarin	20.9	146.9	103.1	+	y=0.0633397+136.508x	0.999	2.11	1.54	0.05-2.5	214.2/247.3	0.9950	0.9958	0.0383	1

Tablo 11. (Devam)

No	Bileşenler	RT ^a	M.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	İyon Mod	Denklem	r ^{2d}	RSD ^g Günler arası	Gün içinde	Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^f	Geri kazanım Günler arası	(%) Gün içinde	U ^g	Gr. No ⁱ
29	Salisilik asit	21.8	137.2	65.0	-	y=0.239287+153.659x	0.999	1.48	1.18	0.05-2.5	6.0/8.3	0.9950	0.9998	0.0158	1
30	Siyanosit	23.7	447.0	284.0	-	y=0.280246+6.13360x	0.997	1.56	1.12	0.05-2.5	12.1/16.0	1.0072	1.0002	0.0366	2
31	Mikuelianin	24.1	477.0	150.9	-	y=0.00991585+5.50334x	0.999	1.31	0.95	0.1-5	10.6/14.7	0.9934	0.9965	0.0220	2
32	Rutin-D3-IS ^h	25.5	612.2	304.1	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	2
33	Rutin	25.6	608.9	301.0	-	y=0.0771907+2.89868x	0.999	1.38	1.09	0.1-5	15.7/22.7	0.9977	1.0033	0.0247	2
34	İzokersitrin	25.6	463.0	271.0	-	y=0.111120+4.10546x	0.998	2.13	0.78	0.1-5	8.7/13.5	1.0057	0.9963	0.0220	2
35	Hesperidin	25.8	611.2	449.0	+	y=0.139055+13.2785x	0.999	1.84	1.35	0.1-5	19.0/26.0	0.9967	1.0043	0.0335	2
36	o-Kumarik asit	26.1	162.8	93.0	-	y=0.00837193+11.2147x	0.999	2.11	1.46	0.1-5	31.8/40.4	1.0044	0.9986	0.0147	1
37	Genistin	26.3	431.0	239.0	-	y=1.65808+7.57459x	0.991	2.01	1.28	0.1-5	14.9/21.7	1.0062	1.0047	0.0083	2
38	Rozmarinik asit	26.6	359.0	197.0	-	y=0.0117238+8.04377x	0.999	1.24	0.86	0.1-5	16.2/21.2	1.0056	1.0002	0.0130	1
39	Elajic asit	27.6	301.0	284.0	-	y=0.00877034+0.663741x	0.999	1.57	1.23	0.4-20	56.9/71.0	1.0005	1.0048	0.0364	1
40	Kosmosiin	28.2	431.0	269.0	-	y=0.708662+8.62498x	0.998	1.65	1.30	0.1-5	6.3/9.2	0.9940	0.9973	0.0083	2
41	Kersitrin	29.8	447.0	301.0	-	y=0.00153274+3.20368x	0.999	2.24	1.16	0.1-5	4.8/6.4	0.9960	0.9978	0.0268	2
42	Astragalın	30.4	447.0	255.0	-	y=0.00825333+3.51189x	0.999	2.08	1.72	0.1-5	6.6/8.2	0.9968	0.9957	0.0114	2
43	Nikotiflorin	30.6	592.9	255.0/284.0	-	y=0.00499333+2.62351x	0.999	1.48	1.23	0.05-2.5	11.9/16.7	0.9954	1.0044	0.0108	2
44	Fisetin	30.6	285.0	163.0	-	y=0.0365705+8.09472x	0.999	1.75	1.19	0.1-5	10.1/12.7	0.9980	1.0042	0.0231	3
45	Daidzein	34.0	253.0	223.0	-	y=0.0329252+6.23004x	0.999	2.18	1.73	0.1-5	9.8/11.6	0.9926	0.9963	0.0370	3
46	Kersetin-D3-IS ^h	35.6	304.0	275.9	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	3
47	Kersetin	35.7	301.0	272.9	-	y=0.00597342+3.39417x	0.999	1.89	1.38	0.1-5	15.5/19.0	0.9967	0.9971	0.0175	3
48	Naringenin	35.9	270.9	119.0	-	y=0.00393403+14.6424x	0.999	2.34	1.69	0.1-5	2.6/3.9	1.0062	1.0020	0.0392	3
49	Hesperedin	36.7	301.0	136.0/286.0	-	y=0.0442350+6.07160x	0.999	2.47	2.13	0.1-5	7.1/9.1	0.9998	0.9963	0.0321	3
50	Luteolin	36.7	284.8	151.0/175.0	-	y=0.0541723+30.7422x	0.999	1.67	1.28	0.05-2.5	2.6/4.1	0.9952	1.0029	0.0313	3
51	Genistein	36.9	269.0	135.0	-	y=0.00507501+12.1933x	0.999	1.48	1.19	0.05-2.5	3.7/5.3	1.0069	1.0012	0.0337	3
52	Kempterol	37.9	285.0	239.0	-	y=0.00459557+3.13754x	0.999	1.49	1.26	0.05-2.5	10.2/15.4	0.9992	0.9990	0.0212	3
53	Apigenin	38.2	268.8	151.0/149.0	-	y=0.119018+34.8730x	0.998	1.17	0.96	0.05-2.5	1.3/2.0	0.9985	1.0003	0.0178	3
54	Amentoflavon	39.7	537.0	417.0	-	y=0.727280+33.3658x	0.992	1.35	1.12	0.05-2.5	2.8/5.1	0.9991	1.0044	0.0340	3
55	Krisin	40.5	252.8	145.0/119.0	-	y=0.0777300+18.8873x	0.999	1.46	1.21	0.05-2.5	1.5/2.8	0.9922	1.0050	0.0323	3
56	Akasetin	40.7	283.0	239.0	-	y=0.559818+163.062x	0.997	1.67	1.28	0.02-1	1.5/2.5	0.9949	1.0011	0.0363	3

^aR.T.: Alikonma süresi, ^bMI (m/z): Standart analitlerin moleküler iyonları (m/z ratio), ^cFI (m/z): Parçalı iyonlar ^dr²: Determinasyon katsayısı, ^eRSD: Bağlı standart sapma, ^fLOD/LOQ (µg/L): Tespit/kantifikasyon sınırı, ^gU (%): %95 güven seviyesinde yüzde bağlı belirsizlik (k = 2), ^hIS: Dahili standart, ⁱGr. No: Dahili standartların gruplandırılmasını temsil eden bu numaralar, hangi IS'nin hangi fenolik bileşeni temsil ettiğini gösterir, N.A.: Tespit edilemedi



Şekil 28. (St) LC-MS/MS yöntemi ile incelenen standart fenolik bileşikleri gösteren kromatogram, (kök metanol ekstresi ve toprak üstü metanol ekstresi) ile LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen ekstraların kromatogramı

Ekstrelerdeki fitokimyasalların kantitatif tayin sonuçları Tablo 12'de sunulmuştur. Toprak üstü metanol ekstresinde yüksek konsantrasyonda elajik asit (38,42 mg/g ekstre) varlığı tespit edilirken, kök metanol ekstresinde kateşin (185,30 mg/g ekstre) en fazla miktarda bulunmuştur.

Tablo 12. Ekstrelerdeki fitokimyasalların kantitatif tayini (mg/g)

Bileşenler	Kök metanol ekstresi	Toprak üstü metanol ekstresi
Kinik asit	5.22	16.938
Fumarik asit	0.175	0.195
Akonitik asit	0.011	0.437
Gallik asit	0.286	2.401
Protokateşik asit	0.099	0.29
Kateşin	185.296	N.D.
Gentisik asit	0.122	0.176
Klorojenik asit	N.D.	0.292
Protokateşik aldehit	N.D.	0.009
Tannik asit	0.101	0.322
Epikateşin	N.D.	2.981
Kafeik asit	0.029	N.D.
Pikeit	0.114	N.D.
p-kumarik asit	0.07	0.039
Salisilik asit	0.013	N.D.
Sinarozit	0.097	3.097
Miquelianin	0.333	32.962
Rutin	N.D.	0.25
İzokersitrin	0.126	5.028
Hesperidin	N.D.	0.117
Elajik asit	7.665	38.424
Kozmosiin	0.019	0.69
Kersitrin	N.D.	0.196
Astragalin	0.022	0.337
Nikotiflorin	N.D.	0.022
Kersetin	N.D.	0.303
Naringenin	0.052	N.D.
Luteolin	0.014	0.081
Genistein	0.015	0.007
Kemferol	N.D.	0.023
Apigenin	0.003	0.093
Amentoflavon	0.003	0.002
Akasetin	0.005	0.013

N.D.: Tespit edilemedi

4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

4.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Bulguları

Ekstrelerin ve fraksiyonların DPPH radikal süpürme aktivitesi, Tablo 13’de sunulmuştur. Kök *n*-butanol alt ekstresi ($8.25 \pm 1.32 \mu\text{g/ml}$) ve kök metanol ekstresi ($8.71 \pm 1.90 \mu\text{g/ml}$) test edilen ekstreler arasında en yüksek radikal süpürücü etkiyi göstermiştir. Fraksiyonlar arasında en yüksek etkinlik B’de ($4.92 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$) bulunmuştur.

Tablo 13. Ekstrelerin, alt ekstrelerin ve fraksiyonların DPPH radikal süpürme aktivitesi

	% DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi			IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	
Kök metanol ekstresi	72.09 $\pm$ 1.47	89.92 $\pm$ 0.20	91.69 $\pm$ 0.03	8.71 $\pm$ 1.90 ^{ns}
Kök <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	30.50 $\pm$ 1.36	50.23 $\pm$ 0.52	74.12 $\pm$ 2.76	95.15 $\pm$ 4.53
Kök diklorometan alt ekstresi	44.56 $\pm$ 0.86	71.62 $\pm$ 0.09	87.53 $\pm$ 0.48	56.12 $\pm$ 1.15
Kök <i>n</i> -butanol alt ekstresi	84.83 $\pm$ 1.22	90.48 $\pm$ 0.14	90.64 $\pm$ 0.12	8.25 $\pm$ 1.32 ^{ns}
Kök su alt ekstresi	48.39 $\pm$ 0.31	75.62 $\pm$ 0.84	90.24 $\pm$ 0.35	49.19 $\pm$ 0.78
Toprak üstü metanol ekstresi	36.85 $\pm$ 1.14	61.39 $\pm$ 1.01	86.64 $\pm$ 0.60	72.34 $\pm$ 2.10
Toprak üstü <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	23.51 $\pm$ 1.68	41.28 $\pm$ 1.38	69.56 $\pm$ 2.71	117.20 $\pm$ 7.20
Toprak üstü diklorometan alt ekstresi	28.85 $\pm$ 1.07	55.30 $\pm$ 0.72	69.26 $\pm$ 0.47	96.16 $\pm$ 2.54
Toprak üstü <i>n</i> -butanol alt ekstresi	40.28 $\pm$ 1.38	73.63 $\pm$ 4.29	91.35 $\pm$ 0.17	60.67 $\pm$ 3.92
Toprak üstü su alt ekstresi	49.75 $\pm$ 2.42	85.09 $\pm$ 1.11	91.30 $\pm$ 0.14	42.85 $\pm$ 3.73
Fraksiyon A	31.45 $\pm$ 0.58	45.12 $\pm$ 1.65	78.69 $\pm$ 0.65	95.01 $\pm$ 2.66
Fraksiyon B	90.87 $\pm$ 0.15	91.82 $\pm$ 0.16	92.52 $\pm$ 0.16	4.92 $\pm$ 0.59 ^{ns}
Fraksiyon C	90.37 $\pm$ 0.09	91.21 $\pm$ 0.24	91.48 $\pm$ 0.01	6.93 $\pm$ 0.42 ^{ns}
Fraksiyon D	88.07 $\pm$ 0.13	89.84 $\pm$ 0.14	90.26 $\pm$ 0.22	7.02 $\pm$ 0.68 ^{ns}
Fraksiyon E	83.61 $\pm$ 0.87	86.25 $\pm$ 0.28	88.79 $\pm$ 0.08	11.72 $\pm$ 1.63 ^{ns}
Gallik asit	90.24 $\pm$ 0.07	90.07 $\pm$ 0.12	94.83 $\pm$ 0.24	12.74 $\pm$ 1.46

ns: pozitif kontrole kıyasla anlamlı değil

4.4.2. Fosfomolibdenyum İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi

Ekstrelerin alt ekstrelerin ve fraksiyonların fosfomolibdenyum indirgeyici antioksidan kapasitesi (PRAP) aktivitesi, Tablo 14’de sunulmuştur. Kök *n*-butanol alt ekstresi ve toprak üstü diklorometan alt ekstresi test edilen ekstreler arasında en yüksek fosfomolibdenyum indirgeyici antioksidan kapasitesine sahiptir. Fraksiyonlar arasında en yüksek etkinlik D’de bulunmuştur.

Tablo 14. Ekstrelerin, alt ekstrelerin ve fraksiyonların PRAP değerleri

	Absorbans		
	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Kök metanol ekstresi	0.068±0.007	0.132±0.007	0.280±0.012
Kök <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	0.026±0.007	0.050±0.002	0.112±0.007
Kök diklorometan alt ekstresi	0.044±0.003	0.103±0.005	0.220±0.014
Kök <i>n</i> -butanol alt ekstresi	0.079±0.009	0.179±0.007	0.366±0.005
Kök su alt ekstresi	0.038±0.003	0.085±0.006	0.189±0.008
Toprak üstü metanol ekstresi	0.026±0.008	0.050±0.00	0.126±0.001
Toprak üstü <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	0.023±0.001	0.054±0.00	0.112±0.005
Toprak üstü diklorometan alt ekstresi	0.068±0.007	0.139±0.005	0.286±0.007
Toprak üstü <i>n</i> -butanol alt ekstresi	0.015±0.003	0.039±0.001	0.093±0.002
Toprak üstü su alt ekstresi	0.019±0.002	0.057±0.002	0.104±0.003
Fraksiyon A	0.002±0.002	0.008±0.007	0.036±0.005
Fraksiyon B	0.041±0.006	0.117±0.001	0.220±0.004
Fraksiyon C	0.042±0.003	0.102±0.00	0.209±0.002
Fraksiyon D	0.065±0.002	0.138±0.01	0.203±0.001
Fraksiyon E	0.036±0.003	0.143±0.001	0.201±0.002
Kersetin (QE)	0.156±0.014	0.326±0.014	0.600±0.02

4.4.3. Metal Şelat Yapma Kapasitesi ve Demir İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi

Gerçekleştirilen analizler sonucunda ekstrelerin metal şelat yapma kapasitesi ve demir indirgeyici antioksidan kapasitesine (FRAP) ait kullanılan konsantrasyonlarda herhangi bir etkinlik gözlenmemiştir. Kullandığımız ekstrelerin çözünme kapasitesi nedeniyle kullanılan konsantrasyonlardan daha yüksek konsantrasyonlara çıkılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle deney sonuçlarına ait herhangi bir veri tespit edilememiştir.

4.4.4. Tirozinaz ve α -Glukozidaz İnhibitör Etki Çalışmalarına Ait Bulgular

Köklerin metanol ekstresi ve toprak üstü kısımların su alt ekstresi, 200 $\mu\text{g/ml}$ 'de sırasıyla 64.96 ± 1.56 ve 62.40 ± 3.79 inhibisyon yüzdeleri ile en yüksek tirozinaz inhibitör etkilerine sahipken, kojik asit 200 $\mu\text{g/ml}$ 'de 96.94 ± 2.40 inhibisyona sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 15). Kök metanol ekstresi ve toprak üstü metanol ekstresi sırasıyla 31.55 ± 2.76 ve 56.42 ± 8.60 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değerleri ile en yüksek tirozinaz inhibitör akvite göstermiştir.

Tablo 15. Ekstrelerin, alt ekstrelerin ve fraksiyonların tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları

	Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları (%)			IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	
Kök metanol ekstresi	54.31 ± 0.09	58.52 ± 3.17	64.96 ± 1.56	31.55 ± 2.76
Kök <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	35.23 ± 5.90	55.89 ± 2.20	38.77 ± 1.10	>200
Kök diklorometan alt ekstresi	47.87 ± 5.36	50.43 ± 4.78	51.38 ± 2.73	>200
Kök <i>n</i> -butanol alt ekstresi	60.35 ± 0.58	54.88 ± 0.27	48.72 ± 5.50	>200
Kök su alt ekstresi	49.80 ± 0.67	50.90 ± 5.99	61.08 ± 7.69	>200
Toprak üstü metanol ekstresi	39.21 ± 4.20	43.57 ± 1.46	32.07 ± 4.65	56.42 ± 8.60
Toprak üstü <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	33.62 ± 1.74	40.48 ± 3.49	42.56 ± 6.08	>200
Toprak üstü diklorometan alt ekstresi	39.50 ± 6.70	42.34 ± 5.94	54.63 ± 5.92	>200
Toprak üstü <i>n</i> -butanol alt ekstresi	38.77 ± 4.74	44.49 ± 1.23	57.00 ± 5.23	>200
Toprak üstü su alt ekstresi	38.17 ± 3.44	41.61 ± 2.42	62.40 ± 3.79	119.47 ± 21.87
Kojik asit	89.75 ± 0.20	93.52 ± 1.57	96.94 ± 2.40	14.03 ± 2.21

Fraksiyonlar arasında ise, en yüksek aktiviteye sahip olan B fraksiyonu'nun IC₅₀ değeri 58,81 ± 7,50 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Tablo 16).

Tablo 16. Fraksiyonların tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları

	Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları (%)			IC ₅₀ (µg/ml)
	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	
A fraksiyonu	nd	3.98 ± 0.22	6.3 3± 0.49	>200
B fraksiyonu	nd	43.97 ± 3.44	70.58 ± 4.81	58.81 ± 7.50
C fraksiyonu	nd	33.89 ± 0.77	59.15 ± 3.80	87.99 ± 9.41
D fraksiyonu	3.60 ± 0.03	24.67 ± 0.48	43.69 ± 2.63	125.54 ± 17.33
E fraksiyonu	2.15 ± 0.02	28.93 ± 1.33	67.66 ± 4.18	84.31 ± 7.73
Kojik asit	76.50 ± 0.25	89.75 ± 2.58	93.52 ± 1.69	14.03 ± 2.21

nd: tespit edilemedi

Hem toprak üstü kısımların hem de köklerin su alt ekstraları incelendiğinde 200 µg/ml'de her iki ekstrede de sırasıyla %85.74 ± 2.03 ve %96.86 ± 1.07 ile α-glukozidaz inhibitör aktivite gözlenirken, akarbozun 200 µg/ml'de %73.13 ± 1.06 inhibisyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Kök metanol ekstresi, kök diklorometan alt ekstresi ve kök su alt ekstresi 'nin α-glukozidaza karşı IC₅₀ değerleri Tablo 17-18'de gösterildiği gibi sırasıyla 10.20 ± 2.00 µg/ml, 18.30 ± 0.47 µg/ml ve 20.85 ± 0.38 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu üç ekstrenin diğer alt ekstrele göre daha yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozdan (48.13 ± 4.55 µg/ml) daha etkili olduğu bulunmuştur.

Tablo 17. Ekstrelerin ve alt ekstrelerin α -glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları

	α -glukozidaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları (%)			IC ₅₀ (µg/ml)
	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	
Kök metanol ekstresi	73.63 ± 1.82	81.76 ± 2.84	93.58 ± 1.30	10.20 ± 2.00***
Kök <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	4.26 ± 0.55	8.65 ± 2.53	17.08 ± 5.64	>200
Kök diklorometan alt ekstresi	49.02 ± 1.18	56.72 ± 4.51	75.09 ± 3.77	58.59 ± 6.75
Kök <i>n</i> -butanol alt ekstresi	66.93 ± 0.56	80.57 ± 0.94	91.01 ± 0.83	18.30 ± 0.47***
Kök su alt ekstresi	65.92 ± 0.55	92.21 ± 1.35	96.86 ± 1.07	20.85 ± 0.38***
Toprak üstü metanol ekstresi	24.17 ± 1.17	50.53 ± 3.34	64.50 ± 4.69	114.48 ± 13.46
Toprak üstü <i>n</i> -hekzan alt ekstresi	3.79 ± 0.53	13.71 ± 4.72	17.73 ± 0.85	>200
Toprak üstü diklorometan alt ekstresi	4.96 ± 0.98	11.20 ± 1.95	21.44 ± 0.54	>200
Toprak üstü <i>n</i> -butanol alt ekstresi	2.70 ± 0.31	10.78 ± 0.99	15.64 ± 3.84	>200
Toprak üstü su alt ekstresi	53.20 ± 5.69	69.48 ± 4.33	85.74 ± 2.03	43.77 ± 11.47 ^{ns}
Akarboz	49.76 ± 1.47	64.18 ± 1.61	73.13 ± 1.06	48.13 ± 4.55

***p<0.0001 vs pozitif kontrol.

Test edilen fraksiyonlar arasında ise, C ve D fraksiyonlarının sırasıyla 1.75 ± 0.74 ve 1.70 ± 0.73 µg/ml IC₅₀ değerleri ile glukozidaz üzerinde en yüksek inhibitör etkileye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 18. Fraksiyonların α -glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları

	α -glukozidaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları (%)			IC ₅₀ (µg/ml)
	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	
A fraksiyonu	2.36 ± 1.54	4.55 ± 1.75	16.24 ± 2.69	>200
B fraksiyonu	82.02 ± 3.09	88.86 ± 0.31	90.50 ± 0.75	15.25 ± 2.42***
C fraksiyonu	95.97 ± 1.30	96.92 ± 0.33	97.40 ± 0.26	1.75 ± 0.74***
D fraksiyonu	41.40 ± 8.02	91.19 ± 0.92	92.13 ± 2.26	1.70 ± 0.73***
E fraksiyonu	65.15 ± 5.40	90.71 ± 0.99	90.91 ± 0.78	7.45 ± 0.97***
Akarboz	31.98 ± 0.85	49.76 ± 1.47	64.18 ± 1.61	48.13 ± 4.55

***p<0.0001 vs pozitif kontrol

İzole edilen bileşiklerin ve analitik numune olarak sağlanan ve karşılaştırma için kullanılan kersetin aglikonun α -glukozidaz ve tirozinaz inhibitör özellikleri Tablo 19'da gösterilmiştir. Bileşiklerin α -glukozidaz ve tirozinaz inhibitör etkilerine ait IC₅₀ değerleri 200 μ M'ın üzerinde bulunmuştur. 1 ile karşılaştırmak için kullanılan kersetinin IC₅₀ değerleri α -glukozidaz üzerinde $56.82 \pm 5.89 \mu\text{M}$ ve tirozinaz üzerinde $150.13 \pm 5.87 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Bu da 3,7-di-*O*- β -glukuronopiranozit gruplarının varlığının her iki enzimin inhibitör aktivitesini azalttığını ortaya koymuştur.

Tablo 19. İzole edilen bileşiklerin α -glukozidaz ve tirozinaz inhibitör etkileri

Bileşenler	α -Glukozidaz (IC ₅₀ (μM))	Tirozinaz (IC ₅₀ (μM))
1	>200	>200
2	>200	>200
Kersetin	$56.82 \pm 5.89^{***}$	150.13 ± 5.87
Akarboz	85.85 ± 8.64	-
Kojik asit	-	31.27 ± 3.28

***p<0.0001 vs pozitif kontrol.

4.4.5. Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu

Test edilen ekstreler ve alt ekstrelerin bütirilkolinesteraz ve asetilkolinesteraz enzimlerine karşı tespit edilen inhibisyon değerleri incelendiğinde, ekstrelerin hiçbirinin önemli asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitör aktivitesine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminin IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) değeri 22.45 ± 0.48 ölçülmüştür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerden ekstrelerin ve potansiyel ilaç hammaddelerinin elde edilmesi ve farmakolojik aktivitelerinin araştırılması çalışmaları, Türkiye florasında yetişen bitkilerin ilaç endüstrisine kazandırılması açısından önem taşımaktadır. Dünyada 1000'den fazla, Türkiye'de ise 77 *Alchemilla* türü bulunmaktadır (2, 3, 4, 5). Türkiye Florası incelendiğinde *Alchemilla* türlerinin çoğunluğunun Kuzey Anadolu Bölgesi'nde yoğun bir şekilde yayılış göstermekle birlikte, ülkenin tamamına dağılmış durumda olduğu görülmüştür (5, 6). *Alchemilla* türlerinin geniş yayılışına bağlı olarak halk arasında hastalıkların tedavisinde kullanıldığına dair literatür verileri bulunmaktadır (7). *Alchemilla* türlerinden izole edilen ve çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilen birçok molekül bulunmaktadır. *Alchemilla* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal analiz ve biyolojik aktivite çalışmaları ülkemizde doğal olarak yetişmeyen *A. vulgaris* türü üzerinde yoğunlaşmıştır (18, 19, 42). Ülkemizde özellikle Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgelerinde yayılış gösteren *A. pseudocartalinica* türünün halk arasında ishale karşı, diüretik ve tonik olarak kullanıldığı kayıtlı olmasına rağmen literatürde üzerinde yapılmış bir izolasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Buradan yola çıkılarak planlanan çalışmada *A. pseudocartalinica*'nın çeşitli biyolojik aktivitelerinin araştırılması ve aktif bulunan ekstrenin fitokimyasal içeriğinin kromatografik tekniklerle aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında *A. pseudocartalinica*'nın toprak üstü kısımlarından ve köklerinden %80 metanol ekstreleri ve ham ekstrelerden sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile *n*-hekzan, diklorometan, *n*-butanol ve su alt ekstreleri elde edilmiştir. Tüm ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri, asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, tirozinaz ve α -glukozidaz inhibitör etkinlikleri *in vitro* çalışmalarla araştırılmıştır.

Literatürde *Alchemilla* türlerinin antioksidan aktivitesini bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. *A. persica*, *A. arvensis* ve *A. mollis*'in toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresi ile etil asetat alt ekstrelerinin yüksek DPPH serbest radikal süpürücü aktivite gösterdiği bildirilmiştir (63, 64, 66). Bir başka çalışmada *A. acutiloba*'nın toprak üstü kısımlarının ve köklerinin çeşitli ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olduğu DPPH ve ABTS^{•+} yöntemleri ile tespit edilmiş ve toprak üstü kısımlardan hazırlanan ekstreler köklere göre daha aktif bulunmuştur (25). Çalışmamızda ise test edilen ekstreler arasında kök *n*-butanol alt ekstresi ($8.25 \pm 1.32 \mu\text{g/ml}$) ve kök

metanol ekstresi ($8.71 \pm 1.90 \mu\text{g/ml}$) en yüksek DPPH radikal süpürme aktivitesi göstermiştir. Köklerde aktivitenin daha yüksek bulunması dikkat çekicidir. Literatürde *Alchemilla* türlerinin kökleri üzerinde yapılmış olan çalışmalar kısıtlıdır. Çalışmamızda da hem toprak üstü hem de kök metanol ekstrelerinin içeriği LC-MS/MS yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış, major bileşenler açısından farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Toprak üstü metanol ekstresinde elajik asit ($38.42 \mu\text{g/g}$) ve kök metanol ekstresinde ise kateşin ($185.30 \mu\text{g/g}$) bileşiklerinin en yüksek oranda bulunan bileşikler olduğu tespit edilmiştir.

Bunun yanı sıra en yüksek tirozinaz inhibitör aktivite, sırasıyla 31.55 ± 2.76 ve $56.42 \pm 8.60 \mu\text{g/ml}$ IC₅₀ değerleri ile kök metanol ekstresi ve toprak üstü metanol ekstresinde tespit edilmiştir. Alt ekstrele ait veriler karşılaştırıldığında, en yüksek tirozinaz inhibitör etkiye sahip olan ekstrenin toprak üstü kısımların su alt ekstresi ($200 \mu\text{g/ml}$ 'de $\%62.40 \pm 3.79$) olduğu tespit edilmiştir. Tirozinaz inhibitör etkinlik çalışmasında pozitif kontrol olarak kullanılan kojik asit $200 \mu\text{g/ml}$ 'de $\%96.94 \pm 2.40$ inhibisyon göstermiştir. α -glukozidaz inhibitör aktivite testinde pozitif kontrol olan akarboz $200 \mu\text{g/ml}$ 'de $\%73.13 \pm 1.06$ inhibisyon gösterirken, hem toprak üstü kısımların hem de köklerin su alt ekstreleri incelendiğinde $200 \mu\text{g/ml}$ 'de her iki ekstrenin de sırasıyla $\%85.74 \pm 2.03$ ve $\%96.86 \pm 1.07$ ile α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, bazı *Alchemilla* türlerinin halk arasında antidiyabetik olarak kullanılması ile uyumlu bir sonuçtur. Çalışmamızda toprak üstü ekstrelerin de aktivitesinin pozitif kontrole göre dikkat çekici bulunması ve toprak altı kısımlardan elde edilen ekstrenin miktarının izolasyon çalışmaları için yeterli olmaması nedeniyle izolasyon çalışmalarına toprak üstü kısımlara ait ekstre üzerinden devam edilmiştir.

DPPH deneyinde, fraksiyonlar arasında en yüksek etkinlik Fr B'de ($4.92 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$) bulunmuştur. Fr A dışında, tüm fraksiyonlar α -glukozidazı pozitif kontrolden daha belirgin bir şekilde inhibe etmiştir. Tirozinaz inhibitör aktivite testinde ise Fr B ($58.81 \pm 7.50 \mu\text{g/ml}$) fraksiyonlar arasında en yüksek inhibitör etkiyi göstermiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak aktif alt ekstre açık kolon kromatografisi, vakum sıvı kromatografisi ve orta basınçlı sıvı kromatografisi gibi kromatografik yöntemler kullanılarak fraksiyonlanmıştır. En aktif bulunan fraksiyondaki major maddenin yapısı kersetin 7-O- β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukuronopiranozit olarak aydınlatılmıştır.

A. barbatiflora'nın toprak üstü kısımları üzerinde aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama tekniği ile yapılan bir çalışmada, ekstrelerin antioksidan etkileri, tirozinaz, α -

glukosidaz ve asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri incelenmiş, en aktif bulunan su alt ekstrelerinin aktif fraksiyonlarından kateşin ve bir kateşin dimer dahil olmak üzere yedi metabolit (prosiyanidin B3, kersetin-3-O- β -D-glukuronik asit (miquelianin), kersetin-3-O- β -D-galaktozit (hiperozit), kersetin-3-O- β -D-arabinozit (guaiaverin), kemferol-3-O-*m*D-ksilopiranozit, kemferol-3-O-(6''-kumaroil- β -D-glikozit) (tilirozit) izole edilmiştir (20). Çalışmamızda da aktif bulunan fraksiyondan bir kersetin türevi izole edilmiş olması literatür verilerini desteklemektedir. İzole edilen bileşiklerin ve analitik numune olarak sağlanan ve karşılaştırma için kullanılan kersetin aglikonun α -glukozidaz ve tirozinaz inhibitör özellikleri araştırılmış, kersetinin IC₅₀ değerleri α -glukozidaz üzerinde $56.82 \pm 5.89 \mu\text{M}$ ve tirozinaz üzerinde $150.13 \pm 5.87 \mu\text{M}$ olarak hesaplanırken izole bileşiklerin α -glukozidaz ve tirozinaz inhibitör etkilerine ait IC₅₀ değerlerinin 200 μM 'ın üzerinde olduğu bulunmuştur. Literatürdeki kersetin türevleri üzerinde yapılan çalışmalar da göz önüne alındığında şeker yapısına sahip olmalarının serbest hidroksilleri ve buna paralel olarak da aktiviteyi azalttığı ileri sürülebilir. Çalışmamızda kök ekstrelerinden elde edilen antioksidan aktivite sonuçları, kökler üzerinde çalışmanın ümit vaadedici olabileceğini göstermiştir.

İlaç endüstrisinin temel başvuru kaynağı olma özelliğine sahip farmakopelerde, tedavide kullanılan bitkisel hammaddelerin genel özellikleri ve bunlara bağlı oluşturulan ortak kalite standartları listelenmektedir (104). Ülkemizde doğal olarak yetişmeyen *Alchemilla* türlerinden biri olan *A. vulgaris*'in Avrupa Farmakopesi monografı bulunmaktadır (105). *Alchemilla* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarının artması, ülkemizde yetişen *Alchemilla* türlerine ait monografların hazırlanması için gerekli bilgi birikiminin eldesine, bunun yanı sıra *Alchemilla* türlerinin tıbbi bitki olarak ve ilaç hammaddesi eldesinde kullanılabilmesine imkân sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. Baytop T (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel, Ankara, Sayfa: 236-237.
2. Gürhan G, Ezer N (2004). Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler-I. Hacet Univ J Fac Pharm 24(1): 37-55.
3. Hayırlioğlu SA, İnceer H (2009). Three new *Alchemilla* L. (Rosaceae) records from Turkey. Pak J Bot 41(5): 2093-2096.
4. Hayırlioğlu SA, Beyazoğlu O (2002). Two new *Alchemilla* L. (Rosaceae) records for the flora of Turkey. Turk J Bot 26: 47-50.
5. Pawlowski B, Walters SM (1972). *Alchemilla* L. In: Davis PH, ed. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 4. Edinburgh University Press, Edinburgh; Sayfa: 425-426.
6. Ayaz HS, İnceer H (2009). Three new *Alchemilla* L. (Rosaceae) records from Turkey. Pak J Bot 41: 2093-2096.
7. İlgün S, Baldemir A, Koşar M (2014). *Alchemilla* L. türlerinin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri. Hacet Univ J Fac Pharm 34(1):17-30.
8. Hamad I, Dayı EÖ, Pekmez M, Ucar OE, Arda N (2007). Free radical scavenging activity and protective effects of *Alchemilla vulgaris* (L.). J Biotechnol 131: 40-42.
9. Tunon H, Olavdotter C, Bohlin L (1995). Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. J Ethnopharmacol 48: 61-67.
10. Coady Y, Boylan F (2014). Ethnopharmacology in Ireland: an overview. Rev Bras Pharmacogn 24(2): 197-205.
11. Trouillas P, Calliste C, Allais D, Simon D, Marfak A, Delage A, Duroux J (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the limousin countryside as herbal teas. Food Chem 80:399-407.
12. Soukand R, Kalle R (2012). The use of teetained in Estonia, 1880's-1990's. Appetite 59: 523-530.
13. Agelet A, Valle`S J (2003). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. J Ethnopharmacol 84: 211-217.
14. Altundağ E, Öztürk M (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. Procedia Soc 19: 756-777.

15. Özüdoğru B, Akaydın G, Erik S, Yeşilada E (2011). Inferences from an ethnobotanical field expedition in the selected locations of Sivas and Yozgat provinces (Turkey). J Ethnopharmacol 137(1):85-98.
16. Kaval İ, Behçet L, Çakılcıoğlu U (2014). Ethnobotanical study on medicinal plants in Geçitli and its surrounding (Hakkari-Turkey). J Ethnopharmacol 155(1): 171-184.
17. Evans WC (2002) Trease and Evans Pharmacognosy, WB Saunders Published, (Fifteenth Edition), Edinburg, sayfa: 234-236.
18. Shrivastava R, Cucuat N, John Wg (2007). Effects of *Alchemilla vulgaris* and Glycerine on Epithelial and Myofibroblast Cell Growth and Cutaneous Lesion Healing in Rats. Phytother Res 21: 369-373.
19. Nikolova M, Dincheva I, Vitkova A, Badjakov I (2012). Phenolic acids and free radical scavenging activity of *Alchemilla jumrukczalica* Pawl. Int J Pharm Sci 3(3): 802-804.
20. Renda G, Sarı S, Barut B, Soral M, Libtaj T, Korkmaz B, Özel A, Erik İ, Şöhretoğlu D (2018). α -Glucosidase inhibitory effects of polyphenols from *Geranium asphodeloides*: Inhibition kinetics and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies. Bioorg Chem 81: 545-552.
21. Davis, PH. (1972), Rosaceae L. In: Davis PH, ed. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 4. Edinburgh; Edinburgh University Press, s.1.
22. Güner A (2012). Türkiye Bitkileri Listesi, Damarlı Bitkiler, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul.
23. Condrat D, Mosoarca C, Zamfir AD, Crişan 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: 530-535.
24. Duckstein SM, Lotter EM, Meyer U, Lindequist U, Stintzing FC (2012). Phenolic constituents from *Alchemilla vulgaris* L. and *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. at different dates of harvest. Zeitschrift für Naturforschung C 67(11-12): 529-540.
25. Dos Santos Szewczyk K, Pietrzak W, Klimek K, Grzywa-Celińska A, Celiński R, Gogacz M (2022). LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolics in different extracts of *Alchemilla acutiloba* Opiz. Molecules 27(3): 621.

26. Afshar FH, Maggi F, Ferrari S, Peron G, Acqua SD (2015). Secondary metabolites of *Alchemilla persica* growing in Iran (East Azarbaijan). Natural Product Communications 10(10).
27. Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Blazheva D, Hyrsi P (2014). Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. Acta Biochimica Polonica 61(2): 359-367.
28. Ahmed RK, Zhang S (2019). *Alchemilla vulgaris* extract as green inhibitor of copper corrosion in hydrochloric acid. International Journal of Electrochemical Science 14(11): 10657-10669.
29. Jurić T, Stanković JSK, Rosić G, Selaković D, Joksimović J, Mišić D, Mihailović V (2020). Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats. South African Journal of Botany 128: 141-151.
30. Vlaisavljević S, Jelača S, Zengin G, Mimica-Dukić N, Berežni S, Miljić M, Stevanović ZD (2019). *Alchemilla vulgaris* agg.(Lady's mantle) from central Balkan: antioxidant, anticancer and enzyme inhibition properties. RSC advances 9(64): 37474-37483.
31. Valcheva-Kuzmanova S, Denev P, Eftimov M, Georgieva A, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Tzaneva M (2019). Protective effects of Aronia melanocarpa juices either alone or combined with extracts from Rosa canina or *Alchemilla vulgaris* in a rat model of indomethacin-induced gastric ulcers. Food and Chemical Toxicology 132: 110739.
32. Ibrahim O H, Abo-Elyousr K A, Asiry KA, Alhakamy NA, Mousa MA (2022). Phytochemical characterization, antimicrobial activity and *in vitro* antiproliferative potential of *Alchemilla vulgaris* Auct root extract against prostate (PC-3), breast (MCF-7) and colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cancer cell lines. Plants 11(16): 2140
33. Şeker Karatoprak G, İlgün S, Koşar M (2017). Phenolic Composition, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. Chemistry & Biodiversity 14(9): e1700150.
34. El-Hadidy EM, Refat OG, Halaby MS, Elmetwaly EM, Omar AA (2018). Effect of lion's foot (*Alchemilla vulgaris*) on liver and renal functions in rats induced by CCl₄. Food and Nutrition Sciences 9(1): 46-62.

35. Filippova EI (2017). Antiviral activity of Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) extracts against orthopoxviruses. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 163(3): 374-377.
36. Trendafilova A, Todorova M, GavriloVA A, Vitkova A (2012). Flavonoid glycosides from Bulgarian endemic *Alchemilla achtarowii* Pawl. Biochem Syst Ecol 156:158-162.
37. Felser C, Schimmer O (1999). Flavonoid glycosides from *Alchemilla speciosa*. Planta medica 65(07): 668-670.
38. Kanak S, Krzemińska B, Celiński R, Bakalczuk M, Dos Santos Szewczyk K (2022). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Alchemilla* Species. Plants 11(20): 2709.
39. Radović J, Suručić R, Niketić M, Kundaković-Vasović T (2022). *Alchemilla viridiflora* Rothm.: the potent natural inhibitor of angiotensin I-converting enzyme. Molecular and Cellular Biochemistry 477(7): 1893-1903.
40. Renda G, Özel A, Barut B, Korkmaz B, Šoral M, Kandemir Ü, Liptaj T (2018). Bioassay guided isolation of active compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz. Records of Natural Products 12(1).
41. Fraisse D, Heitz A, Carnat A, Carnat AP, Lamaison JL (2000). Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. Fitoterapia 71(4): 463-464.
42. Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ (2012). Flavonoid compounds identified in *Alchemilla* L. species collected in the North-Eastern Black Sea Region of Turkey. Afr J Tradit Complement Altern Med 9(3): 418-425.
43. Neagu E, Paun G, Albu C, Radu GL (2015). Assessment of acetylcholin esterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. J Taiwan Inst Chem Eng 52:1-6.
44. Tasić-Kostov M, Arsić I, Pavlović D, Stojanović S, Najman S, Naumović S, Tadić, V (2019). Towards a modern approach to traditional use: *In vitro* and *in vivo* evaluation of *Alchemilla vulgaris* L. gel wound healing potential. Journal of ethnopharmacology 238: 111789.

45. Karaoglan ES, Bayir Y, Albayrak A, Toktay E, Ozgen U, Kazaz C, Cadirci E (2020). Isolation of major compounds and gastroprotective activity of *Alchemilla caucasica* on indomethacin induced gastric ulcers in rats. *The Eurasian Journal of Medicine* 52(3): 249.
46. 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.
47. Ilić-Stojanović S, Nikolić V, Kundaković T, Savić I, Savić-Gajić I, Jocić E, Nikolić L (2018). Thermosensitive hydrogels for modified release of ellagic acid obtained from *Alchemilla vulgaris* L. extract. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 67(9): 553-563.
48. Yazıcı SÖ (2021). Optimization of the extraction conditions of phenolic compounds from *Alchemilla vulgaris* using response surface methodology. *Gıda* 46(4): 1040-1052.
49. Fraisse D, Carnat A, Carnat AP, Lamaison JL (1999). Standardization of the aerial parts of *Alchemilla*. In: *Annales Pharmaceutiques Francaises* 57(5): 401-405
50. Krivokuća M, Niketić M, Milenković M, Golić N, Masia C, Scaltrito MM, Kundaković T (2015). Anti-*Helicobacter pylori* activity of four *Alchemilla* species (Rosaceae). *Natural Product Communications* 10(8).
51. Oz B, Ilhan M, Ozbilgin S, Akkol E, Acikara O, Saltan G, Suntar I (2016). Effects of *Alchemilla mollis* and *Alchemilla persica* on the wound healing process. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 11(3).
52. Özbilgin S, Özbek H, Kirmizi Nİ, Öz BE, Kurtul E, Özrenk BC, Acikara ÖB (2019). Evaluation of the antidiabetic activity of *Alchemilla persica* Rothm. In mice with diabetes induced by alloxan. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 261.
53. Geiger C, Scholz E, Rimpler H (1994). Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. *Planta medica* 60(04): 384-385.
54. Dubel, N, Grytsyk A, Grytsyk L, Koshovyi O, Kovaleva A (2022). Research in components of essential oils from flowers and leaves of the genus *Alchemilla* L. species. *ScienceRise: Pharmaceutical Science* 3(37): 34-39.

55. Falchero L, Coppa M, Fossi A, Lombardi G, Ramella D, Tava A (2010). Essential Oil Composition of Lady's Mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) Growing Wild in Alpine Pastures. Nat Prod Res 1367-1371.
56. Fai YM, Tao CC (2009). A review of presence of oleanolic acid in natural products. Natura Proda Medica 2: 77-290.
57. Olafsdottir ES, Omarsdottir S, Jaroszewski JW (2001). Constituents of three Icelandic *Alchemilla* sp.
58. Karaoglan ES, Yilmaz B (2018). Identification of bioactive compounds of *Alchemilla caucasica* using gas chromatography-mass spectrometry. Int. J. Pharmacogn 5(5): 287-293.
59. Barbour EK, Al Sharif M, Sagherian VK, Habre AN, Talhouk RS, Talhouk SN (2004). Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. Journal of ethnopharmacology 93(1): 1-7.
60. Kaya E, Şeker Karatoprak G, Koşar M, Özbilge H, Başer KHC (2009). Antimicrobial Properties Of *Alchemilla mollis*, Ankara, Türkiye, 23 June-26 September 2009. In 9th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS-9).
61. Taddese S, Asres K, Gebre-Mariam T (2003). *In vitro* antimicrobial activities of some selected topically applied medicinal plants of Ethiopia. Ethiop Pharm J 21: 39-46.
62. 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.
63. Kaya B (2020). *Alchemilla persica*'nın farklı polaritelerdeki ekstraktlarının antisitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. TDFD 9(2):157-169.
64. 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).
65. Ergene B, Acikara B, Bakar F, Saltan G, Nebioglu S (2010). Antioxidant activity and phytochemical analysis of *Alchemilla persica* Rothm. Ankara Univ Eczacilik Fak Derg 39(2):145-154.

66. Hazar A, Raed A, Nidal J, Motasem M (2021). Evaluation of phytochemical and pharmacological activities of *Taraxacum syriacum* and *Alchemilla arvensis*. Jordan J. Pharm. Sci 14: 457–471.
67. İlğün S, Karatoprak GŞ (2021). *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm bitkisi köklerinden elde edilen ekstrelerin antioksidan ve sitotoksik etkileri. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2021;14(2):176-185Hacet Univ J Fac Pharm 34(1):17-30.
68. Turk M, Kaya B, Menemen Y, Oğuztuzun 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.
69. Shrivastava R, John GW, de Lavour ZAC (2006). Treatment of common mouth ulcers with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine (Aphtarine o). Clin Drug Investig 26(10): 567-73.
70. Kupeli Akkol E, Demirel MA, Bahadır Acikara O, Suntar I, Ergene B, İlhan M, Ozbilgin S, Saltan G, Keleş H, Tekin M (2015). Phytochemical analyses and effects of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *Alchemilla persica* Rothm. in rat endometriosis model. Arch Gynecol Obstet 292(3): 619-628.
71. Parveen S, Ansari S (2015). Testo Induced ovulation successfully in women of polycystic ovarian syndrome. Indo-American Journal of Pharmaceutical Research.
72. Ozbek H, Acikara OB, Keskin I, Kirmizi NI, Ozbilgin S, Oz BE, Saltan G (2017). Evaluation of hepatoprotective and antidiabetic activity of *Alchemilla mollis*. Biomedicine & Pharmacotherapy 86: 172-176.
73. Takır S, Altun IH, Sezgi B, Süzgeç-Selçuk S, Mat A, Uydeş-Doğan BS (2015). Vasorelaxant and blood pressure lowering effects of *Alchemilla vulgaris*: A comparative study of methanol and aqueous extracts. Pharmacognosy magazine 11(41): 163.
74. Radović J, Suručić R, Niketić M, Kundakovic-Vasovic T (2021). Angiotensin I-converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity and Chemical Composition of *Alchemilla viridiflora* Rothm.
75. Herbrechter R, Beltrán LR, Ziemba PM, Titt S, Lashuk K, Gottemeyer A, Gisselmann G (2020). Effect of 158 herbal remedies on human TRPV1 and the two-pore domain potassium channels KCNK2, 3 and 9. Journal of Traditional and Complementary Medicine 10(5): 446-453.

76. 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 Medicine.
77. Sufka KJ, Roach JT, Chambliss Jr 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.
78. Tuba ACET, ÖZCAN K (2018). Aslanpençesi (*Alchemilla ellenbergiana*) ekstrelerinin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 8(1): 113-121
79. Akdeniz H (2022). Trabzon-Düzköy İlçesi Yayla Çayırlarının Floristik Yönden İncelenmesi. Journal of Agriculture 5(2): 34-49.
80. Kalankan G, Özkan 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.
81. Korkmaz M, Karakurt E (2015). An ethnobotanical investigation to determine plants used as folk medicine in Kelkit (Gümüşhane/Turkey) district. Biological Diversity and Conservation 8(3): 290-303
82. Palaşoğlu B, Eminağaoğlu Ö (2022). Beşpare köyleri (Artvin-Türkiye) halk ilaçları. Turkish Journal of Biodiversity 5(1): 1-16.
83. Dogan A, Bulut G, Senkardes I, Tuzlacı E (2016). An ethnopharmacological analysis of Rosaceae taxa in Turkey. In WEI International Academic Conference Proceedings. Boston. USA 44: 51
84. Akan H (2015). Kahta (Adıyaman) merkezi ve Narince köyünün etnobotanik açıdan araştırılması. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 4(2).
85. Haşim ÖTNÜ, Hasan AKAN (2020). Şanlıurfa'daki eczanelerde ve aktarlarda fitoterapi amaçlı satılan bitkiler. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi 23(4): 947-965.
86. Afifi FU, Abu-Irmaileh B (2000). Herbal medicine in Jordan with special emphasis on less commonly used medicinal herbs. Journal of Ethnopharmacology 72(1-2): 101-110.

87. Aburjai T, Hudaib M, Tayyem R, Yousef M, Qishawi M (2007). Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Ajloun Heights region. *Journal of Ethnopharmacology* 110(2): 294-304.
88. Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region, *Journal of Ethnopharmacology* 83: 251-265
89. Ginko E, Demirović EA, Šarić-Kundalić B (2023). Ethnobotanical study of traditionally used plants in the municipality of Zavidovići, BiH. *Journal of Ethnopharmacology* 302: 115888.
90. Todorov D, Hinkov A, Shishkova K, Shishkov S (2014). Antiviral potential of Bulgarian medicinal plants. *Phytochemistry Reviews* 13: 525-538.
91. 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: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 20(11): 961-965.
92. 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.
93. de Santayana MP, Blanco E, Morales R (2005). Plants known as té in Spain: an ethnopharmaco-botanical review. *Journal of ethnopharmacology*, 98(1-2), 1-19.
94. Rigat M, Bonet MÀ, Garcia S, Garnatje T, Vallès J (2007). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of ethnopharmacology* 113(2): 267-277.
95. Barut EN, Barut B, Engin S, Yıldırım S, Yaşar A, Türkş S, Özel A, Sezen FS (2017). Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of *Achillea millefolium*. *Turkish Journal of Biochemistry* 42: 493-502.
96. Bouhafsoun A, Yilmaz MA, Boukeloua A, Temel H, Harche MK (2018). Simultaneous quantification of phenolic acids and flavonoids in *Chamaerops humilis* L. using LC-ESI-MS/MS. *Food Science and Technology* 38(Suppl. 1): 242-247.

97. Abdullah YM (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Industrial Crops and Products* 149: 112347.
98. Blois MS (2008). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 29: 1199-1200.
99. Falcioni G, Fedeli D, Diano L, Calzuola I, Mancinelli L, Marsili V, Gianfranceschi G (2002). Antioxidant activity of wheat sprouts extract *in vitro*: inhibition of DNA oxidative damage. *J Food Sci* 67: 2918-2922.
100. Chua MT, Tung YT, Chang ST (2008). Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophleum*. *Biores Technol* 99: 1918-1925.
101. Oyaizu M (1986). Studies on products of browning reactions-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan J Nutr* 44: 307-315.
102. Şöhretoğlu D, Bakır SD, Barut B, Şoral M, Sari S (2022). Multiple biological effects of secondary metabolites of *Ziziphus jujuba*: isolation and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies. *Eur Food Res Technol* 248:1059-1067.
103. Wakamatsu J, Stark TD, Hofmann T (2019). Antioxidative maillard reaction products generated in processed aged garlic extract. *J. Agric. Food. Chem* 67: 2190–2200.
104. Saltan İşcan G (2016). Türk Farmakopesi’nde Bitkisel Drog ve Ürünler. *TFD* 1(1):67-73.
105. European Pharmacopoeia 8.0. Monograph (2013). Council of Europe. Vol Strasbourg, France.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Çağla UZUNKAYA

Uyruğu :

Doğum Tarihi :

Telefon (İş)

E-Posta

Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2018
Lise	Ordu Anadolu Öğretmen Lisesi	2012

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
1. Eczacı	Ordu İl Sağlık Müdürlüğü	2020-
2. Mesul Müdür	Sağlık Eczanesi/Akkuş	2020-2020
3. Yardımcı eczacı	İbnisina Eczanesi	2019-2020

YABANCI DİL

1. İngilizce