

***TAXUS BACCATA* L'NİN FARKLI EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİ İLE EKSTRAKSİYONU VE
EKSTRAKSİYON VERİMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

BERKANT KAYAN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**MERSİN
HAZİRAN – 2009**

**TAXUS BACCATA L'NİN FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ
İLE EKSTRAKSİYONU VE EKSTRAKSİYON VERİMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

BERKANT KAYAN

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya
Ana Bilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. A.Murat Gizir**

**MERSİN
Haziran - 2009**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan ve aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul ediyoruz.

Tez Danışmanı
Doç. Dr. A.Murat GİZİR

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Fatih KÖLELİ

Jüri Üyesi
Prof. Dr. E. Sultan GİRAY

Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Belgin Gözmen

Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mahir TURHAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZ

Taksol, doğal ve çok önemli bir antikanser ilaç olup bugün yumurtalık, meme, akciğer ve cilt kanserlerinin tedavisinde direkt yada birtakım kemoterapötik bileşiklerle birlikte kullanılmaktadır. İlk defa 1967 yılında, Pasifik kıyıları boyunca yetişen *Taxus Brevifolia* ağacının kabuğundan çok az miktarda elde edilmiş ve 1980 yılının başında klinik denemeler başlamıştır. Ağaçtaki taksol miktarının düşük olması, kompleks bir yapıya sahip olması nedeniyle prelinik ve klinik çalışmalar taksol teminindeki güçlükten dolayı sınırlandırılmış ve taksolün temini için alternatif kaynaklar aranmasına yol açmıştır. Bu amaçla araştırmacılar tarafından taksolün yarı sentetik, sentetik ve biyolojik (genetik, doku ve hücre kültürü-mikroorganizmalardan elde etme) yollarla elde edilmesi yönünde çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Taksolün yarı sentetik eldesinde diğer doğal ürünlerden olan 10-Deasetilbakatin III ve Bakatin III başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır. Taksolün doğal kaynaklarda çok az bulunmasından beri (ağırlıkça yaklaşık 0.01 %), doğal ürünlerden bileşiklerin eldesinde ekstraksiyon ve izolasyon yöntemleri ve bu yöntemlerin geliştirilmesi ayrı bir önem kazanmıştır. *Taxus baccata* L.'nin Türkiye'de yetişen türü sub-süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilmiş ve kullanılan metotlar kıyaslanmıştır. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, 100-400 atm basınç ve 35-45 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. Karbondioksitin polaritesini arttırmak amacıyla ilk etapta metanol, etanol, etilen glikol, aseton, asetonitril, etil asetat, izopropanol, tetrahidrofuran ve dimetilsülfoksit gibi farklı polaritede çözücüler damlatma metodu ile 100 ve 200 µL enjekte edilmiş, ikinci etapta ise yardımcı çözücü olarak metanol ve etanol % 2, 4, 6, 8, 10 ve 20 oranlarında kullanılmış ve ikinci bir pompa vasıtasıyla karbondioksit ile karıştırılarak ekstraksiyon hücresine gönderilmiştir ve bitkinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu sonucunda taksanların elde edilmesinde en iyi verim 45 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta, 200 µL metanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı deneyler sonucunda elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Paklitaksel, 10-deasetilbakatin III, bakatin III, sefalomanin, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon, Soxhlet ekstraksiyonu.

ABSTRACT

Paclitaxel (Taxol), is an important anticancer agent that using directly or with some chemotropically compounds to heal ovarium, breast, lung and skin cancer patient. This compound obtained firstly in 1967 from *Taxus Brevifolia* tree grown in Pacific coast. It has generated a considerable amount of scientific interest from many disciplines since it entered clinical trials in the early 1980s.

Due to complex structure and less amount obtained from tree, brings some limitation using it in clinical studies, so researchers started to find out some other ways to obtain Taxol synthetically or semi-synthetically. During synthesise of taxol in laboratory condition semi synthetically 10-Deacetylbaccatin III and Baccatin III are used as starting material.

Taxanes were extracted from the ground needles of *Taxus baccata* L. growing in Turkey using sub- and supercritical carbon dioxide with and without co-solvents (as an entrainer and modifier) and compared to soxhlet and ultrasonic extraction. For optimizing extraction pressure and temperature, SFE applications was carried out in the pressure range between 100 to 400 atm. and temperature ranges between 35 to 45 °C. Recovery of the target compounds increased with increasing temperature and pressures. In order to increase the polarity of carbon dioxide, various co-solvents were added to carbon dioxide by two different methods. Firstly methanol, ethanol, ethylene glycol, acetone, acetonitrile, ethyl acetate, isopropanol, tetrahydrofuran, and dimethyl sulfoxide were added to the cell by injection of 100 and 200 µL (entrainer) onto the sample, and secondly 2-20% methanol and ethanol (%w/w) were added (as a modifier) to carbon dioxide using a high pressure syringe pump. The highest quantity of taxanes obtained from needles of *Taxus baccata* L. growing in Turkey when 200 µL of methanol was used as an entrainer at 45 °C

Key words: Paclitaxel, 10-deacetylbaccatin III, baccatin III, cephalomannine, supercritical carbon dioxide extraction, ultrasonic extraction, Soxhlet extraction.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarım boyunca yarattığı özgür atmosfer ile özgün düşünme yetisini bana kazandırmaya çalışan, araştırmalarımı yönlendirip, fikir ve tecrübelerini bizlerle paylaşan danışman hocam Doç.Dr. A. Murat GİZİR'e, mevcut olanaklardan yararlanmamı sağlayan Kimya Bölüm Başkanlığına, Tez izleme komitesi üyelerine, Kimya Bölümü öğretim üye ve elemanlarına, çalışma arkadaşım Muhammet DEMİREL'e, araştırma konularını bizimle paylaşıp tez çalışmasının belirlenmesine öncülük eden Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Necdet COŞKUN'a, doktora çalışmalarım boyunca tecrübelerinden yararlandığım East Carolina Üniversitesi'nden Prof. Dr. Yu YANG'a teşekkür ederim.

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Yüksek öğrenim hayatımız boyunca birlikte yol aldığımız, sevinçleri ve hüznüleri beraber yaşadığımız sevgili eşim Didem BALUN KAYAN'a, ve her zaman yanımda olan saygıdeğer ailelerimize sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.1. Kanser Nedir?.....	4
2.1.2. Kanser tedavisinde kullanılan doğal bileşikler.....	4
2.2. DOĞAL TAKSANLAR.....	6
2.2.1. Paklitaksel'in Keşfi.....	8
2.2.2. Taxotere (Docetaxel) Sentezi.....	11
2.2.3. <i>Taxus baccata</i> L.....	13
2.2.4. 10-Deasetilbakatin'den Paklitaksel Sentezi.....	18
2.3. SÜPERKRİTİK AKIŞKANLAR.....	21
2.3.1. Süperkritik Akışkanın Tanımı.....	21
2.3.2. Süperkritik Akışkanların Özellikleri.....	25
2.3.2.1. Yoğunluk.....	25
2.3.2.2. Difüzyon katsayısı.....	25
2.3.2.3. Viskozite.....	26
2.3.2.4. Isıl İletkenlik.....	26
2.3.3. Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları.....	31
2.3.4. Süperkritik Akışkanın Seçimi.....	33
2.3.5. Süperkritik Akışkanların Çözme Gücü.....	36
2.4. EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ.....	39
2.4.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	39

2.4.2. Ultrasonik Ekstraksiyon.....	41
2.4.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu.....	42
2.4.4. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu.....	43
2.4.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu.....	44
2.4.5.1. SFE'nin Avantajları.....	44
2.4.5.2. SFE'nin dezavantajları.....	46
2.4.5.3. SFE'nin Mekanizması.....	46
2.4.5.4.SFE'nin Verimliliğini Etkileyen Değişkenler.....	48
2.4.5.5.SFE'de Yardımcı Çözücü Kullanılması.....	49
2.5. TAKSANLARIN ELDE EDİLMESİ İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	52
2.6. TAKSANLARIN ANALİZİNDE KULLANILAN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER.....	63
2.6.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC).....	63
2.6.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS).....	66
3. MATERYAL METOT.....	71
3.1. MATERYAL.....	71
3.2. METOT.....	76
3.2.1. <i>Taxus baccata</i> L.'nin toplanması.....	76
3.2.2. Ekstraksiyon Şartlarının belirlenmesi.....	76
3.2.3. Farklı Ekstraksiyon Metotlarının Kullanılması.....	77
3.2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	77
3.2.3.2. Ultrasonik Ekstraksiyon.....	78
3.2.3.3. Süperkritik CO ₂ Ekstraksiyonu.....	78
3.2.4. Ekstraksiyon Ürünlerinin Karakterizasyonu.....	81
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	85
4.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	85
4.2. Ultrasonik Ekstraksiyon.....	86
4.3. Süperkritik CO ₂ Ekstraksiyonu.....	91
4.3.1. Ekstraksiyon zamanı.....	91
4.3.2. Matriksin tanecik boyutu.....	93
4.3.3. CO ₂ 'nin akış hızı.....	95

4.3.4. Sıcaklık ve basınç etkisi.....	96
4.3.5. Yardımcı çözücü etkisi (Damlatma modeli).....	100
4.3.6. Yardımcı çözücü etkisi (Modifier modeli).....	117
4.4. <i>Taxus baccata</i> L.'nin Ekstraksiyonunda Kullanılan Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması.....	127
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	129
KAYNAKLAR.....	131
ÖZGEÇMİŞ.....	143
EKLER.....	144

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	SAYFA
Çizelge 1.1. Bitkisel ilaçların kronolojisi.....	2
Çizelge 2.1. <i>Taxus baccata</i> L.'de bulunan taksanlar.....	15
Çizelge 2.2. Bazı çözücülerin kritik özellikleri.....	24
Çizelge 2.3. Sıvıların, gazların ve süperkritik akışkanların bazı fiziksel özellikleri..	25
Çizelge 2.4. Bazı süperkritik akışkanların avantaj ve dezavantajları.....	34
Çizelge 2.5. Doğal maddelerin sc-CO ₂ içindeki çözünürlükleri.....	37
Çizelge 2.6. Farklı ekstraksiyon metotları ile elde edilen taksanlar.....	58
Çizelge 2.7. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen taksanlar.....	59
Çizelge 2.8. Taksolün <i>Taxus brevifolia</i> 'dan 45 °C 'da sc-CO ₂ ve sc-CO ₂ +Etanol ortamında ekstraksiyonu.....	62
Çizelge 2.9. Analitik amaçlı kullanılan HPLC sistemleri.....	65
Çizelge 2.10. Yarıpreparatif amaçlı kullanılan HPLC sistemleri.....	66
Çizelge 2.11. Preparatif amaçlı kullanılan HPLC sistemleri.....	66
Çizelge 2.12. Kütle Spektrometresinde iyon kaynakları.....	68
Çizelge 3.1. Süperkritik karbondioksit ve Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri.....	80
Çizelge 3.2. Taksanların LC-MS Analiz koşulları.....	83
Çizelge 4.1. Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen taksanlar ve miktarları.....	85
Çizelge 4.2. Sıcaklık ve basınçla değişen karbondioksit yoğunluğu (g/cm ³).....	97
Çizelge 4.3. CO ₂ 'in metanol ve etanol ile değişen kritik sıcaklık ve basınç değerleri.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 2.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan Doğal Bileşikler.....	5
Şekil 2.2. Taksin A- Taksin C molekül yapısı.....	6
Şekil 2.3. Taksin B molekül yapısı.....	6
Şekil 2.4. Taksisin molekül yapısı.....	7
Şekil 2.5. Bakatin I, II molekül yapısı.....	7
Şekil 2.6. Bakatin III, IV molekül yapısı.....	7
Şekil 2.7. Sefalomanin molekül yapısı.....	8
Şekil 2.8. Paklitakselin molekül yapısı.....	9
Şekil 2.9. Taksoter (Docetaxel) molekül yapısı.....	12
Şekil 2.10. 10-Deasetilbakatin III'den Taksoter Sentezi.....	13
Şekil 2.11. <i>Taxus baccata</i> L.'nin iğne yaprakları.....	14
Şekil 2.12. 10-Deasetilbakatin III'ün molekül yapısı.....	18
Şekil 2.13. 10-Deasetilbakatin III'den Paklitaksel Sentezi.....	20
Şekil 2.14. Süperkritik Akışkanların Oluşum Süreci.....	22
Şekil 2.15. Saf bir madde için sıcaklık-basınç diyagramı.....	23
Şekil 2.16. Süperkritik Akışkanların Özellikleri.....	26
Şekil 2.17. sc-CO ₂ 'nin sıcaklık ve basınçla değişen yoğunluk eğrisi.....	27
Şekil 2.18. sc-CO ₂ 'nin yayınlılığı.....	28
Şekil 2.19. sc-CO ₂ 'nin viskozite değişimi.....	29
Şekil 2.20. Kritik nokta yakınında CO ₂ 'nin ısı iletkenliği.....	30
Şekil 2.21. Naftalinin CO ₂ 'deki çözünürlüğü.....	35
Şekil 2.22. sc-CO ₂ içinde bileşiklerin çözünürlüğü.....	37
Şekil 2.23. CO ₂ için Hildebrand çözünürlük parametresinin basınçla değişimi.....	38
Şekil 2.24. Soxhlet cihazı.....	40
Şekil 2.25. Süperkritik Akışkanların katılardan transfer mekanizması.....	47
Şekil 2.26. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS).....	69
Şekil 2.27. Paklitaksel'in LC-MS kromatogramı.....	70
Şekil 2.28. Taksin B LC-MS kromatogramı.....	70
Şekil 3.1. Soxhlet ekstraksiyon deney düzeneği.....	78
Şekil 3.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi.....	79

Şekil 3.3. Taksanların RP-HPLC kromatogramları.....	82
Şekil 3.4. LC-MS analizi için belirlenen dalga boyları.....	84
Şekil 4.1. USE’de metanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	86
Şekil 4.2. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	87
Şekil 4.3. USE’de metanol kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	87
Şekil 4.4. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	88
Şekil 4.5. USE’de metanol kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	89
Şekil 4.6. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	89
Şekil 4.7. USE’de metanol kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	90
Şekil 4.8. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	91
Şekil 4.9. sc-CO ₂ ‘da dinamik ekstraksiyon süresinin 35 °C sıcaklıkta ürün verimliliğine etkisi.....	92
Şekil 4.10. sc-CO ₂ ‘da dinamik ekstraksiyon süresinin 45 °C sıcaklıkta verimliliğine Etkisi.....	93
Şekil 4.11. sc-CO ₂ ‘da tanecik boyutunun ekstraksiyon verimi üzerine etkisi.....	94
Şekil 4.12. sc-CO ₂ ’da CO ₂ akış hızının ürün verimliliği üzerine etkisi.....	95
Şekil 4.13. sc-CO ₂ ’da ürün verimine sıcaklık etkisi.....	98
Şekil 4.14. sc-CO ₂ ’da ürün verimine basınç etkisi.....	99
Şekil 4.15. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	101
Şekil 4.16. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	102
Şekil 4.17. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	102
Şekil 4.18. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	103
Şekil 4.19. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	104
Şekil 4.20. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	104
Şekil 4.21. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	105

Şekil 4.22. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	106
Şekil 4.23. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	106
Şekil 4.24. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	107
Şekil 4.25. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	108
Şekil 4.26. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı.....	108
Şekil 4.27. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	109
Şekil 4.28. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	110
Şekil 4.29. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	110
Şekil 4.30. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	111
Şekil 4.31. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	112
Şekil 4.32. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı.....	112
Şekil 4.33. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	113
Şekil 4.34. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	114
Şekil 4.35. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	114
Şekil 4.36. sc-CO ₂ ortamında 35 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	115
Şekil 4.37. sc-CO ₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	116

Şekil 4.38. sc-CO ₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	116
Şekil 4.39. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	119
Şekil 4.40. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı.....	120
Şekil 4.41. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen paklitaksel miktarı.....	121
Şekil 4.42. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen paklitaksel miktarı.....	122
Şekil 4.43. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen sefalomanin miktarı.....	123
Şekil 4.44. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen sefalomanin miktarı.....	124
Şekil 4.45. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	125
Şekil 4.46. sc-CO ₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı.....	126
Şekil 4.47. <i>Taxus baccata</i> L.’nin ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması ve elde edilen maksimum taksan miktarları.....	128

KISALTMALAR DİZİNİ

SFE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
sc-CO₂	: Süperkritik Karbondioksit
USE	: Ultrasonik Ekstraksiyon
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bölümü
BMS	: Bristol-Myers Squibb
10-DAB III	: 10-Deasetilbakatin III
CAS-No	: Katalog Numarası

1. GİRİŞ

Dünyada bitkiler ve diğer doğal kaynaklarla tedavi antik çağlara kadar uzanmaktadır. İnsanoğlu binlerce yıldır doğadan gelen ilaçlar hakkında bilgi sahibi olmakla birlikte bu ilaçlar antik çağlarda bitki ve hayvan ürünlerinin ekstrakte edilip inorganik tuzlarla karıştırılması sonucu kullanılmaktaydı. Bitkilerin tıbbi amaç için oldukça yaygın olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir. MÖ. 1000 yılından beri bitkilerin tıbbi alanda kullanıldıkları kaynaklarca belirtilmiştir. Bitkiler, geleneksel, destekleyici ve alternatif tıp kapsamında doğrudan ilaç, yahut ticari ilaç yapımında hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre dünya nüfusunun % 80'i ilk sağlık ihtiyaçları için bitkisel kökenli ilaçlara bağımlıdır. Bir başka tahmine göre ise, kullanılan ilaçların gelişmiş ülkelerde % 25'i, gelişmekte olan ülkelerde ise % 75'i bitki ve bitki türevlerinden elde edilmektedir [1]. Günümüzde kullandığımız çok önemli ilaçların keşfi 1800'lü yıllardan itibaren halk arasında kullanılan bitkilerden biyoaktif organik bileşiklerin izolasyonu ile mümkün olmuştur. Bitkilerden izole edilen ilk aktif bileşikler striknin, morfin, atropin ve kolşisin gibi alkaloidlerdir, söğüt ağacının kabuklarından elde edilen aspirin ise 1897 de sentezlenerek ilaç dünyasına sunulmuştur. Son yıllarda doğal kaynaklardan ilaç hammaddesi eldesinde sistematik ve/veya doğrudan hastalıkla bağlantılı bitki seçimiyle başlayan çalışmaları, bitkisel kaynaklı yada sentez yoluyla elde edilmiş bitkilerin farmakolojik aktivite açısından değerlendirilmesi amacıyla yapılan araştırmalar, yapı-aktivite yorumları ile bileşiklerin etki mekanizmalarının aydınlatılması çalışmaları ile izole edilen bileşiklerin enstrümana dayalı hızlı ve tekrarlanabilir bir şekilde (LC-NMR-MS) yapı tayini yapmak, gerekirse hücre kültürü ve mikrobiyal transformasyon veya gen mühendisliğine dayanan çeşitli tekniklerle bitkilerin sekonder metabolitlerini büyük ölçekte elde etmek şeklinde yürütülmektedir [2-3]. Bitkisel ilaçların kronolojisi Çizelge 1.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 1.2. Bitkisel ilaçların kronolojisi [3]

Yıl	İlaç	Kaynağı	Kullanım Alanı	Şirket
1826	Morfin	Doğal Bileşiklerden	Analjezik	E.Merck
1899	Aspirin	Analoğundan sentezlenerek	Analjezik	Bayer
1941	Penisilin	Doğal Bileşiklerden	Antibakteriel	Merck
1964	Sefalosporin	Türevlerinden yarı sentetik	Antibakteriel	Lilly
1983	Cyclosporin A	Doğal Bileşiklerden	Bağışıklık sistemi destekleme	Sandoz
1987	Artemisinin	Doğal bileşiklerden	Sıtma ilacı	Baiyunshan
1987	Lovastatin	Doğal Bileşiklerden	Lipid düşürme	Merck
1988	Simvastatin	Türevlerinden yarı sentetik	Lipid düşürme	Merck
1989	Provastatin	Türevlerinden yarı sentetik	Lipid düşürme	Sankyo/BMS
1990	Acarbose	Doğal Bileşiklerden	Anti-diyabetik	Bayer
1993	Paclitaxel	Doğal Bileşiklerden- Türevlerinden yarı-sentetik	Anti-kanser	BMS
1993	FK506 (Tacrolimus)	Doğal bileşiklerden	Bağışıklık sistemi destekleme	Fujisawa
1994	Fluvastatin	Analoğundan sentezlenerek	Lipid düşürme	Sandoz
1995	Docetaxel (Taxotere)	Türevlerinden yarı sentetik	Anti-kanser	Rhône-PR
1996	Topotecan Irinotecan	Türevlerinden yarı sentetik	Anti-kanser	SKB, Pharmacia & Upjohn
1996	Miglitol	Analoğundan sentezlenerek	Anti-diyabetik	Bayer

Kanser tedavisinde kullanılan paklitaksel (Taksol) bir terpen olup Pasifik porsuğu (*Taxus brevifolia*) bitkisinden üretilmektedir. Taksol maddesi *Taxus brevifolia*'nın ağaç kabuklarının özütlerinde yer almakla birlikte taksolün elde edilmesi, ağacın nadir bulunması, ağacın gelişmesinin çok uzun zaman alması ve çok fazla kabuğa ihtiyaç duyulmasından dolayı önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Bu sırada başka bazı porsuk ağaçlarında da etken madde olan taksolün izole edilme çalışmalarının başlamasıyla birlikte, Taksol son zamanlarda hücre kültürleri yoluyla laboratuvarlarda da sentezlenmektedir. Taksol, ökaryotik hücre bölünmesi esnasında,

mitozu durdurmasından dolayı özellikle ilerlemiş düzeydeki yumurtalık ve meme kanserlerinde çok etkilidir [4]. Dünya’da farklı türlerdeki porsuk ağacından elde edilen Taksol, göz önüne alınamayacak kadar azdır. Yüz yaşındaki bir ağaçtan, bir ilacın yaklaşık bir dozu (kabaca 300 mg) elde edilebilir. Bundan dolayı sentetik organik kimyacılar, Taksol’un göz alıcı moleküler yapısına olduğu kadar, sentezi üzerine de yoğun bir çaba harcamaya girişmişlerdir. Taksol’un şimdiye kadar toplamda altı sentezi açıklanmıştır. Şu anda Avrupa porsuk ağacının iğnemi yapraklarından, ilişkili bir metabolitin izolasyonu ve o ara üründen de Taksol’un sentezi yapılmakta ve bu klinik olarak araştırılmaktadır [5]. Bu durum, sentezin önemini ve organik kimyanın kullanımını açıkça göstermektedir. Taksolun tam sentezinin yapılabilmesi için yapısal olarak taksole benzerlik gösteren 10-deasetilbakatin III ve bakatin III bileşikleri başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır. 10-deasetilbakatin III bileşiğinin Avrupa’da yayılış gösteren *Taxus Baccata L.* ağacının yapraklarında önemli miktarda bulunması, bu bileşiğin bitkiden etkin bir biçimde ekstrakte edilmesi çalışmalarında beraberinde getirmiştir. Bu araştırmada, *Taxus Baccata L.*’nin Türkiye’de yayılış gösteren türünden Soxhlet, ultrasonik ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile taksanların eldesi gerçekleştirilmiş ve ekstraksiyon verimleri karşılaştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

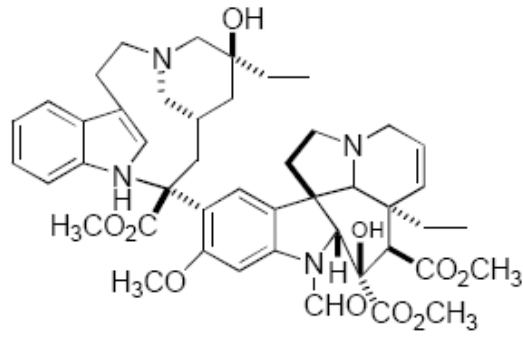
2.1. GENEL BİLGİLER

2.1.1. Kanser Nedir?

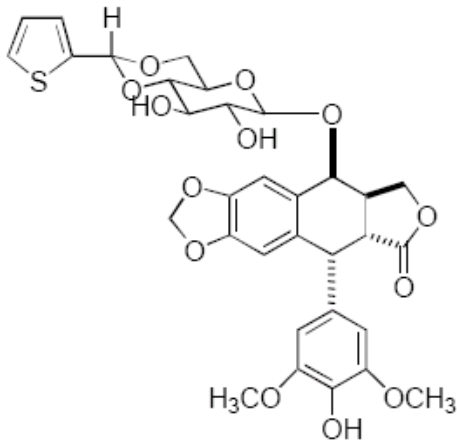
Kanser, bir takım etkilerle değişim geçirmiş hücrelerin, lokal ve lokal olmayan noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp gelişmelerinin sonucu oluşan kötücül hastalıklar grubudur [6].

2.1.2. Kanser tedavisinde kullanılan doğal bileşikler

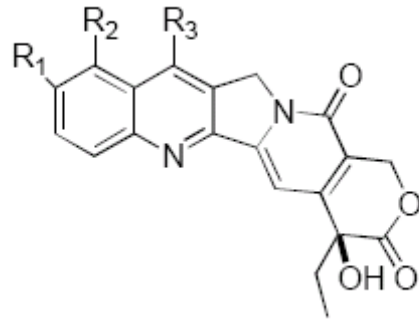
Kanserin toplumda tehdit edici ve dikkat çekici bir şekilde artması sonucu, kanseri anlamak ve tedavi etmek amacıyla Amerika Birleşik Devletleri tarafından 1970 yılında Ulusal Kanser Araştırma merkezleri kurulmasına karar verildi. Bu merkezlerin araştırmaları esnasında en etkili antikanser ajanların mevcutta hazır bulunan oldukça faydalı doğal bileşikler olduğu ve bunların gitgide artan bir önem kazandığı belirtilmektedir. Şu anda yaklaşık yüze yakın antikanser ilaç mevcut olup bunların % 62'si doğal bileşiklerdir ya da doğal bileşiklerden türetilmişlerdir [7,8]. Bununla birlikte halen klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılan ve Amerikan Gıda ve İlaç Kurumun'dan (FDA) onay bekleyen 750 antikanser ilaç adayından yaklaşık % 60'dan fazlasını doğal bileşikler oluşturmaktadır. Şuanda piyasada mevcut olan antikanser ilaçlarının pek çoğu direkt olarak doğal bileşiklerden elde edilmiştir. Örneğın Vinblastine ve Vincristine gibi iki bilinen alkaloid 1960 yılında periwinkle plant (*Vinca rozea*)'da keşfedilmişlerdir ve özellikle lösemi ve lymphomas için oldukça etkili ilaçlardır [7]. Doğal bileşiklerden elde edilen bazı ilaçlar Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



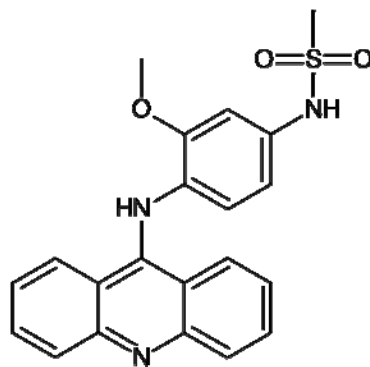
a. Vincristine



b. Teniposide



c. Camptothecin

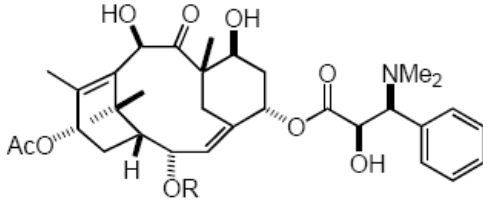


d. Amsacrine

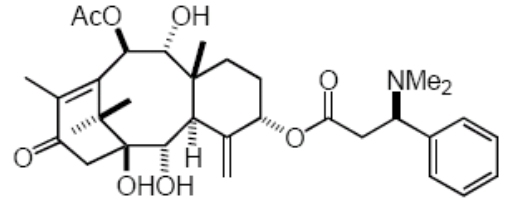
Şekil 2.1. Kanser tedavisinde kullanılan doğal bileşikler [7].

2.2. DOĞAL TAKSANLAR

Taksanlar genellikle porsuk ağacı olarak bilinen ve taksus familyasından olan karmaşık yapılı, diterpen sınıfına giren alkaloidlerdir. Bu diterpenlerin biyolojik aktiviteye sahip oldukları uzun zamandır bilinmektedir. 1856 yılında Alman eczacı Lucas'ın taksanların karışımını elde etmeye başlayan çalışmaları bu bileşiklerin metabolit olarak kullanılması ile ilgili kimyasal çalışmaların başlangıcını oluşturmuştur. Lucas tarafından yapılan taksanların karakterizasyon çalışmaları yapının çok karmaşık olması ve modern spektroskopik tekniklerin olmamasından dolayı çok uzun bir süreçte gerçekleştirilmiş ve yapı analizinden sonra bunlara taksin (Taxine) adını vermiştir. İlk zamanlarda belirlenen taksinlerin fiziksel özelliklerinde bir takım tutarsızlıklar olmasına rağmen daha sonra Graf en az 7 bileşenli karışımları betimlemiş, saf yapıları izole edebilmiş ve onları Taksin A, B, C olarak adlandırmıştır. Taksin A, B ve C'nin yapıları Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'de gösterilmiştir [7].

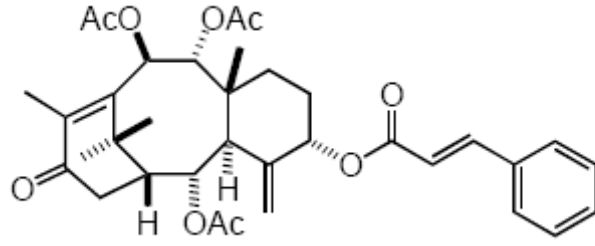


Şekil 2.2. Taksin A R: Ac
Taksin C R: H



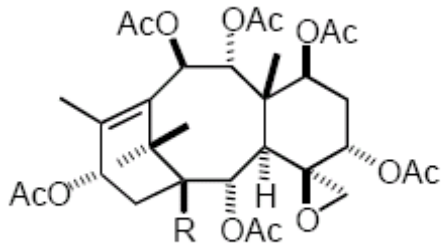
Şekil 2.3. Taksin B

Şekil 2.4'de gösterilen taksinin molekülü 1963 yılında, birbirinden bağımsız olarak Lytgoe, Nakanishi ve Uyeo'nun grupları tarafından taksan molekülün çekirdek yapısı trisiklik polialkollerin asitlerle esterleştirilmesi sonucu elde edilmiş ve 3 yıl sonra yapının stereokimyası tanımlanmıştır [7-9-10-11].

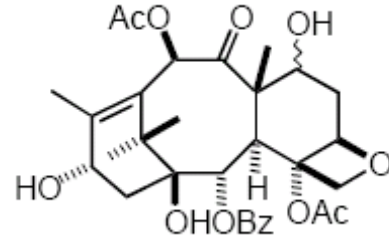


Şekil 2.4. Taxisin (5-sinamoltriasetin)

1960 yıllarının sonunda yapılan sistematik çalışmalarda çeşitli taksan familyaları ve alkaloid yapı içermeyen pek çok taksan türü bulunmuştur. Örneğin Halsall ve ark. bugün hala kullanılan ve Şekil 2.5 ve Şekil 2.6’da belirtilen Bakatin III’ü ve izomerlerini izole edip taksanın iskelet yapısı için sınıflandırmışlardır [7-12].

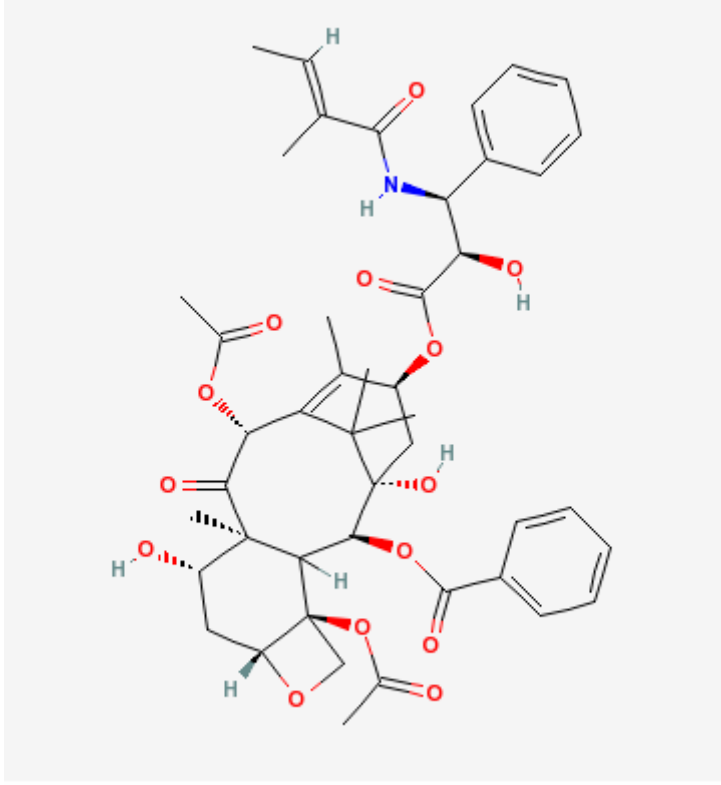


Şekil 2.5. Bakatin I R: H
Bakatin II R: OH



Şekil 2.6. Bakatin III R: 7β-OH
Bakatin IV R: 7α-OH

Sefalomanin (Taxol B), paklitaksele göre daha düşük antikanser etkiye sahip olmasına rağmen, taksan ilaçlarının yarı-sentetik olarak sentezlenmesinde ve düzenlenmesinde başlangıç maddesi olarak kullanılabilir. Sefalomanin ve paklitakselin molekül yapıları birbirine çok yakın olmakla beraber paklitaksel yan zincirindeki *N*-benzoil grubu ile sefalomaninden ayrılmaktadır. Sefalomaninin molekül yapısı Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



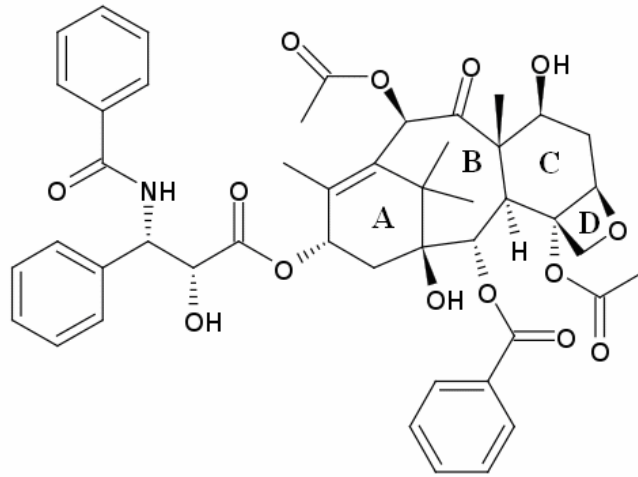
Şekil 2.7. Sefalomanin'in molekül yapısı

Bu gelişmelere nazaran daha dikkat çekici ve önemli olarak nitelendirilen, 1971 yılında Wani ve Wall tarafından oldukça yüksek potansyelde antikanser ajan olan Taksol'ü® keşfetmeleridir [13]. Bu dikkat çekici duyuru, bilim dünyasının dikkatleri sadece Paklitakselin üstüne çekmesinden ziyade, bunun yanında pek çok porsuk ağacı türünden onlarca taksan türünün izole edilmesine olanak sağlamıştır. Günümüze kadar 100'den fazla taksan izole edilmiş ve yapısı yayımlanmıştır. Taksanlar pek çok yapısal alt sınıflara ayrılabilirler. Bu keşiften sonra Taksol'ün karakterizasyonu ve izolasyonu ile ilgili pek çok çalışma gerçekleştirilmiş ve halen gerçekleştirilmektedir.

2.2.1. Paklitaksel'in Keşfi

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1960 yılında, kanser kemoterapiklerinin izlenmesi ve keşfedilmesi amacıyla Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) kuruldu. Binlerce bitki Birleşik Devletler Tarım Bölümü (USDA) tarafından toplandı, ekstrakte edildi ve kanser aktivitelerinin değerlendirilmesi için Ulusal Kanser Enstitüsüne sunuldu.

1962 yılında Washington eyaletinde botanikçi Arthur S. Barclay ve ekibi Kalifornia, Washington ve Oregon'da içinde *Taxus brevifolia*'nın yaprak, dal ve kabuklarını da içeren 650 bitki örneği topladılar [7]. *Taxus brevifolia* üzerine ilk araştırmalar Research Triangle Enstitüsü'nden Dr.Wall ve ekibinin Ulusal Kanser Enstitüsü ile birlikte yaptıkları çalışmalarla başlamıştır. Paklitaksel'in yapısının belirlenmesi spektroskopik ve X-Ray kristallografi tekniği ile 1968 yılında gerçekleştirilmiştir. Empirik formülü $C_{47}H_{51}NO_{14}$ olup, molekül ağırlığı 853.9 g/mol'dür. Paklitakselin taksan çekirdeği 4 üyeli C4 ve C5 karbonlarıyla bağlantılı 8 halka ile ester bağlantılı C13 pozisyonunda meydana gelmektedir [14]. Tam IUPAC ismi tax-11-en-9-one-5 β ,20-epoksi-1,2 α ,4,7 β ,13 α -hekzahidroksi-4,10-diasetat-2-benzoat,13- β -benzoil-amino α -hidroksibenzenpropiyonat olan Paklitaksel'in molekül yapısı Şekil 2.8'de belirtilmiştir.



Şekil 2.8. Paklitaksel'in molekül yapısı

Paklitaksel'in gelişim süreci, önemli derecede üstün aktiviteye sahip yapısının halen devam eden bioassay sistem içinde yoksun oluşu, formülasyon problemleri, sudaki oldukça düşük çözünürlük değerine ek olarak (0.01 mg/ml'den daha az) büyük ölçüde toplanması, ekstrakte edilmesi ve izolasyonu gibi sorunlardan dolayı oldukça zaman almıştır. Bununla birlikte yeni bir model olan B16 melanoma'nın 1970'li yılların başında duyurulması ve paklitakselin bu tarz katı tümörlere karşı aktif özellik gösterdiğinin belirlenmesi bu sürecin uzamasına neden olmuştur. B16 melanoma içeren hayvanlar üzerinde yapılan deneyler sonucu

paklitakselin iyi aktive olduğu belirlenmiş ve Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından geliştirilmek üzere tercih edilmiştir. Ulusal Kanser Enstitüsü Paklitaksel'in kimya, biyoloji, eczacılık, formülasyon, toksikoloji gibi pek çok alanda teşvik edilmesine karar vermiştir.

1978 yılında Fuchs ve Johnson, paklitakselin hücre siklusunda G2-M fazında hücre yayılmasını inhibe ettiğini ve mitozu durdurduğunu belirlemiştir [15]. Bunu takriben 1979 yılında Hortwitz ve ark. detaylı bir araştırma yaparak Paklitaksel'in tek bir mekanizma ile mitozu inhibe etmesi ile ilgili çalışmalarını genişletmişlerdir [16]. Paklitakselin pek çok klinik öncesi tümör modelleri için oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş ve 1981 yılında Faz I klinik denemelerine başlanmış, toksik profil ve doz planı için çalışmalar gerçekleştirilmiştir [17]. Akciğer, cilt, yumurtalık ve gırtlak kanseri hastalarında kısmen ve düşük oranlarda cevaplar alınmıştır. 1985 yılında Faz II denemeleri gerçekleştirmiş ve bu denemelerde Paklitaksel'in yumurtalık kanserine karşı % 30 oranında başarı, metastatik göğüs kanserine karşı % 56 ve akciğer ve gırtlak kanserine karşı % 62 oranında yanıt alındığı gözlemlenmiştir [18-19-20].

Paklitakselin Bristol-Myers Squibb firması tarafından 1991 yılında Taksol adı altında marka tescili yapıldıktan sonra, 1992 yılında yumurtalık ve 1994 yılında göğüs kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Sadece 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilen Taksol satışı 970 Milyon Dolardır.

Paklitakselin gelişim süreci pek çok kimya uygulamasını da beraberinde getirmiştir. En önemli ve dikkat çekici çalışmalardan birisi paklitakselin yan zincirinden sentezlenebilmesidir, bu paklitakselin bakatin III ve 10-deasetilbakatin III'den yarı sentezine olanak vermektedir. 10-deasetilbakatin III, paklitaksel sentezi için Avrupa porsuğu olarak bilinen *Taxus baccata* L.'nin yenilenebilir yapraklarında oldukça mevcuttur [21-22]. Paklitakselin tam sentezi pek çok araştırma grubunun gerçekleştirilmesini istediği çalışmaların başında gelmektedir. Bunun için modern organik kimyada en heyecan verici başarı 1994 yılında Holton ve Nicolaou'nun yapının tam sentezini gerçekleştirmesidir fakat iki sentez yönteminde oldukça uzun olup ticari açıdan olanaksız olmaktadır [23-24].

Günümüzde paklitakselin tam sentezini 6 farklı araştırma grubu gerçekleştirmiştir. Bu araştırma grupları ve sentez yolları kısaca belirtilirse;

Holton Taksol toplam sentezi (1994) öncül: Patchoulol - stratejisi: lineer sentez AB sonra C sonra D sentezi.

Nicolaou Taksol toplam sentezi (1994) öncül: Mucic asit stratejisi: yakınsak sentezi A ve C ve sonra ABC ile birleştirme ve en son D ile birleştirme.

Danishefsky Taxol toplam sentezi (1996) öncül: Wieland-Miescher keton stratejisi: yakınsak sentezi C sonra D sonra A ile birleştirilir en son ABCD ile birleştirilir.

Wender Taxol toplam sentezi (1997) öncül: Pinene stratejisi: lineer sentez AB sonra C sonra D sentezi.

Kuwajima Taxol toplam sentezi (1998) öncül: sentetik yapı taşlarını stratejisi: doğrusal bir A sentezi, sonra B sonra C ve en son D sentezi.

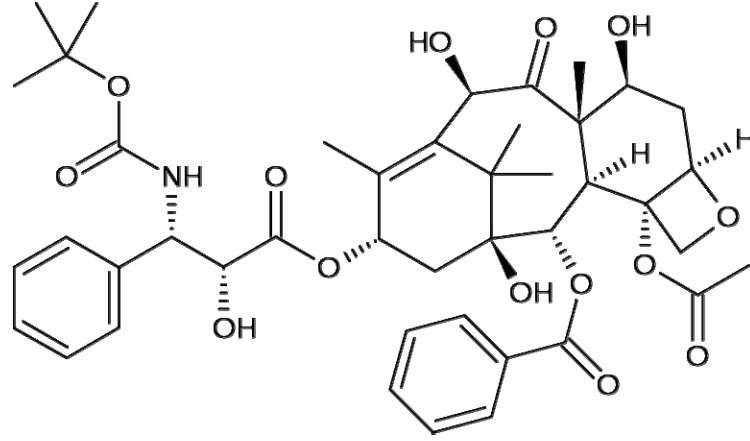
Mukaiyama Taxol toplam sentezi (1998) öncül: L-serine stratejisi: lineer sentez B, sonra C, sonra A ve en son D sentezi.

2.2.2. Taksoter (Docetaxel) Sentezi

Taksoter (Docetaxel), göğüs, yumurtalık ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılan anti-mitotik kemoterapi ilacıdır. Taksoter, hastalıkların tedavisinde lokal olarak etkin bir ilaç iddası ile ortaya çıkmış ve doxorubicin, paklitaksel ve flouourasil gibi sitotoksik antimikrotübül gibi ilaçlardan daha etkili olduğu düşünülmüştür. Docetaxel, Sanofi-Aventis firması tarafından Taksoter markası ile markalaştırılmış ve yıllık satış oranı yaklaşık 2 milyar dolar civarındadır.(Şekil 2.9)

Paklitakselin klinik araştırmalar ve uygulamalar için yeterince tedarik edilememesinden dolayı docetaxel üzerinde geniş çapta araştırmalar başlatılmıştır. Docetaxel *Taxus baccata* L.'nin yenilenebilir yapraklarında mevcut olan 10-deasetilbakatin III'ün esterleşmesi sonucu oluşan bir üründür.(Şekil 2.10) Docetaxel, kimyasal yapısındaki iki farklı pozisyondan dolayı paklitakselden farklı olmaktadır. Bu farklılık docetaxelin C-10 karbon atomunda -OH fonksiyonel grubuna sahip olması, paklitakselin ise burada bir asetat esteri içermesinden ve taxotere'nin, paklitakseldeki benzil amid yerine fenilpropiyonat yan zincirine bağlı tersiyer-butil karbamat esteri içermesinden kaynaklanmaktadır. C-10 karbon

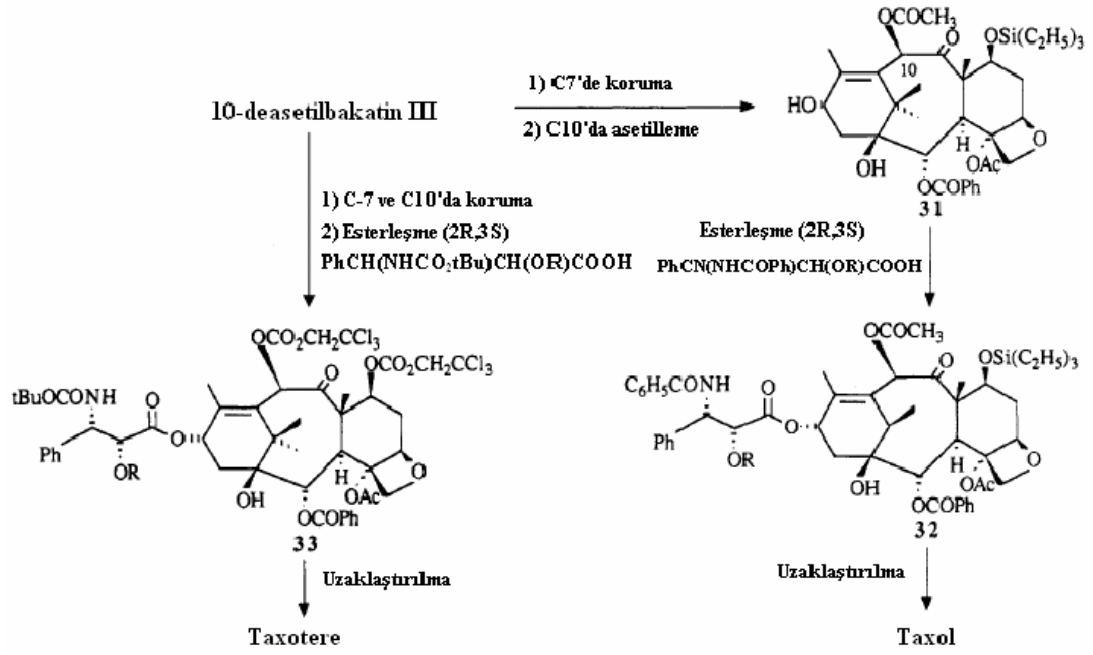
atomundaki fonksiyonel gruplarından kaynaklanan bu değişiklik docetaxel'in paklitaksele göre suda daha fazla çözünmesine olanak sağlamaktadır [25].



Şekil 2.9. Taksoter'in (Docetaxel) molekül yapısı

Guenard ve ark. 1993 yılında Taksolün analogu olan Taksoteri (Docetaxel) duyurmuşlardır. Sentez halkasının sentezlenmesine yönelik yapılan pek çok stratejik çalışmanın yanı sıra, bazı gruplar oxetane halkasının sentezlenmesi için sikloheksan türevleri ve en basit doğal taksan olan Taksin B'den yola çıkmışlardır [26].

C-7 ve C-10'daki hidroksil gruplarının uygun bir şekilde korunmasından sonra, Taksolün yan zinciri ile bağlantılı olan C-13'deki hidroksil grubunun asitle esterleştirilmesi oldukça zor bir durumdur. Guenard ve ark. bu yüzden taksolün kısmi sentezini sentetik olarak mevcut olan 13-sinamol türevlerinden ve tersiyer bütül-*N*-kloro-*N*-sodyumkarbamat kullanarak Sharpless hidroksiaminasyon reaksiyonu ile gerçekleştirmişlerdir [27].



Şekil 2.10. 10-DAB III'den Taksoter sentezi [27]

2.2.3. *Taxus baccata* L.

Avrupa, Akdeniz ülkeleri ve Kafkasya'da yayılış gösteren porsuk ağacı ülkemizde kuzeyden güneye birçok yörede görülür. Kendi başına büyük ormanlar kurmaz ve kayın, göknar, ladin ormanlarında tek tek veya küçük gruplar halinde bulunur. Bazen küçük bir çalı, bazen sık dallı yuvarlak tepeli bir ağaç formunda görülür. Çoğunlukla boylu çalı, bazen de 20 metreye değin boylanabilen sık dallı, yuvarlak tepeli bir ağaç görünümünde olan Adi Porsuk'ta, kırmızı kahverengi olan kabuk gelişmiş güzel çatlaklar ve dökülür. Genç sürgünler, yeşil renkli ve çok elastiklidir. İğne yapraklar, 1- 2,5 cm uzunluğunda olup, koyu yeşil ve üst yüzleri parlaktır. İğne yaprakların uçları sivri ve enine kesitleri yassıdır. Uzun ömürlü, 2000-3000 yıl kadar yaşayabilmektedir. Adi Porsuğun (Şekil 2.11) doğal yayılış alanı Kuzey ve Orta Avrupa ile Akdeniz ülkeleri, Azor Adaları, Türkiye ve Kafkasya'dır. Ülkemizde birçok orman alanlarında, özellikle Karadeniz (Euxine ve Colchis) ormanlarının gölgeli ve kuytu kesimlerinde tek tek bulunur. Ayancık, Bolu, Karabük, Düzce ve Istrancalar'da yayılır. Karabük ve Yenice ormanlarında en iyi gelişimini yapar. Bu ormanlarda yer yer 35 m boy ve bir metre çap yapan bireylerine rastlanmaktadır. Az da olsa, bu yayılış dışında güneyde Amanos Dağları'nda da

izlenmektedir. Bu yayılış alanlarında hiçbir zaman egemen bir orman ağacı değil, asıl ağaç türleri olan *Fagus orientalis*, *Abies nordmanniana*, *Picea orientalis* gibi türlere teker teker ya da küçük gruplar halinde karışmaktadır. *Taxus* cinsinin öteki türlerinden *T. chinensis* (Pilger) Rehder adlı tür Çin’de, *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. Japonya’da, *T. brevifolia* Nutt. Kuzey Amerika’da ve *T. canadensis* Marsch. Kanada’da doğal olarak yetişmektedir [28-29-30].



Şekil 2.11. *Taxus baccata* L.

Taxus baccata L. taksan içeriği bakımından oldukça zengindir, *Taxus baccata* L.’de bulunan taksanlar Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *Taxus baccata* L.'de bulunan taksanlar [31]

Taksan	Molekül formülü	Molekül Ağırlığı	Erime noktası (°C)
5 α ,9 α , 10 β , 13 α -tetrahidroksi-4(20),11-taksadien	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336	195-198
9 α ,10 β -diasetoksi-5 α , 13 α -dihidroksi-4(20),11-taksadien	C ₂₄ H ₃₆ O ₆	420	235
2,10-di-0-asetil-5-desinnamol-taksisin I	C ₂₄ H ₃₄ O ₈	450	165
2 α ,9 α -diasetoksi-1 β ,5 α ,10 β ,13 α -tetrahidroksitaksa-4(20),11-dien	C ₂₄ H ₃₆ O ₈	452	154
2-deasetildesinnamol taksinin E	C ₂₆ H ₃₈ O ₈	478	
Triasetil-5-desinnamoltaksisin I	C ₂₆ H ₃₆ O ₉	492	206-207
5 α ,9 α ,10 β ,13 α -tetraasetoksi-4(20),11-taksadien (taksusin)	C ₂₈ H ₄₀ O ₈	504	126
2-deasetoksi-5-desinnamol taksinin J	C ₂₈ H ₄₀ O ₉	520	185-187
Taksa-4(20),11-dien-5 α -hidroksi-1 β ,7 β ,9 α , 10 β -tetraasetat	C ₂₈ H ₄₀ O ₉	520	
2 α -(α -metilbutil)oksi-5 α , 7 β ,10 β -triasetoksi-4(20),11-taksadien	C ₃₁ H ₄₆ O ₈	546	115
5 α -hidroksi-2 α -(α -metilbutil)-oksi-7 β ,9 α , 10 β -triasetoksi-4(20),11-taksadien	C ₃₁ H ₄₆ O ₉	562	227-229
2 α , 5 α ,9 α , 10 β , 13 α -pentaasetoksi-4(20),11-taksadien	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₀	562	165
5 α , 7 β ,9 α , 10 β , 13 α -pentaasetoksi-4(20),11-taksadien	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₀	562	205-207
Desinnamol-1-hidroksi-taksinin J	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₂	594	213
2 α -(α -metilbutil)oksi- 5 α ,7 β , 9 α , 10 β , -tetraasetoksi-4(20), 11-taksadien	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₀	604	155-156
2 α -asetoksibrevifoliol	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₁	614	198
2-deasetoksi-9-asetoksitaksin B	C ₃₃ H ₄₅ NO ₇	567	
2-deasetoksi-10-asetoksitaksin B	C ₃₃ H ₄₅ NO ₇	567	
Taksin B	C ₃₃ H ₄₅ NO ₈	583	
13-deokso-13 α -asetiloksi-1-deoksinortaksine B	C ₃₃ H ₄₇ NO ₈	597	165
13-deokso-13 α -asetiloksi-1-deoksinortaksine B	C ₃₅ H ₄₉ NO ₈	611	192
10-asetoksitaksin B	C ₃₅ H ₄₇ NO ₉	625	
9-asetoksitaksin B	C ₃₅ H ₄₇ NO ₉	625	
13-deokso-13 α -asetiloksi- taksin B	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉	627	119
13-deokso-13 α -asetiloksi-7 β ,9 α -diasetil-1-2-dideoksitaksine B	C ₃₉ H ₅₃ NO ₁₀	695	162-164
(+)-2 α -asetoksi-2',7-dideasetoksi-1-hidroksiaustrospicatine	C ₃₉ H ₅₃ NO ₁₁	711	
(+)-2 α -asetoksi-2'-deasetil-1-hidroaustrospikatin	C ₄₁ H ₅₅ NO ₁₄	785	120
5-sinnamol-10-asetiltaksisin II	C ₃₁ H ₃₈ O ₇	522	204-205
2-0-asetil-5-0-sinnamoltaksisin I	C ₃₁ H ₃₈ O ₈	538	152-154

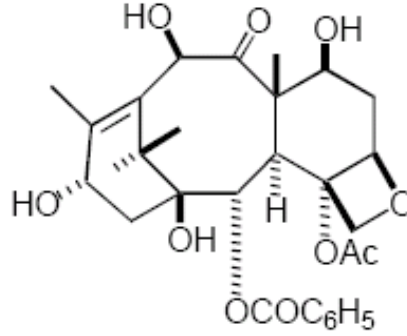
Çizelge 2.1.'nin devamı

5-sinnamol-9,10-diasetiltaksisin I	C ₃₃ H ₄₀ O ₉	580	185
Taksinin(0-sinnamoltaksisin II triasetat)	C ₃₅ H ₄₂ O ₉	606	265-267
0-sinnamoltaksiin I triasetat	C ₃₅ H ₄₂ O ₁₀	622	235-239
Taksa-4(20),11-dien-10β-metoksi-2α,5α-diasetoksi-14β-(α-methyl) butirat	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	518	
2α, 5α,10β-triasetoksi-14β-(2-metil) butiriloksitaksa-4(20),11-dien	C ₃₁ H ₄₆ O ₈	546	
Taksagifin	C ₃₇ H ₄₄ O ₁₃	696	265-267
5α-deasetilbakatin I	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₂	594	256-258
1β-hidroksi-7β-deasetoksi-7α- Hidroksibakatin I	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₃	610	217-218
Bakatin I	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₃	636	298
1β-hidroksibakatin I	C ₃₀ H ₄₄ O ₁₄	652	273
2-debenzoil-2-tigloil-10- deasetilbakatin III	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₀	522	
10-deasetilbakatin III	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₀	543	242-245
13-epi-10-deasetilbakatin III	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₀	543	
Bakatin III	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	586	236-238
Bakatin V	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	586	254-255
19-hidroksibakatin III	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₂	601	180-182
9(βH)-9-dihidro-19-asetoksi-10-deasetilbakatin III	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₂	604	148
10-(β-hidroksibutil)-10-deasetilbakatin I	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₂	630	
Bakatin VI	C ₃₇ H ₄₆ O ₁₄	714	248-250
N-debenzoil-N-propanoil-10-deasetilpaklitaksel	C ₄₁ H ₄₉ NO ₁₃	763	245
N-debenzoil-N-bütanoill- 10-deasetilpaklitaksel	C ₄₂ H ₅₁ NO ₁₃	777	244
10-deasetilsefalomanin(10-deasetiltaksol B)	C ₄₃ H ₅₁ NO ₁₃	789	
10-deasetiltaksol	C ₄₅ H ₄₉ NO ₁₃	811	
Taksultin	C ₄₄ H ₅₃ NO ₁₃	819	155
Sefalomanin (Taksol B)	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₄	831	181-184
Taksol (paklitaksel)	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄	853	205-208
N-metiltaksol C	C ₄₇ H ₅₉ NO ₁₄	861	225-228
10-(β-hidroksibutiril)-10-deasetilsefalomanin	C ₄₇ H ₅₇ NO ₁₅	875	
10-(β-hidroksibutiril)-10-deasetiltaksol	C ₄₉ H ₅₅ NO ₁₅	897	
7-(β-ksosil)-10-deasetiltaksol D	C ₄₇ H ₅₉ NO ₁₇	909	
7-(β-ksosil)-10-deasetiltaksol C	C ₄₉ H ₆₃ NO ₁₇	937	215-217
7-(β-ksosil)-10-deasetiltaksol	C ₅₀ H ₅₇ NO ₁₇	943	246-248
7-(β-ksosil)sefalomanin	C ₅₀ H ₆₁ NO ₁₈	963	
7-(β-ksosil)taksol C	C ₅₁ H ₆₅ NO ₁₈	979	229-231
7-(β-ksosil)taksol	C ₅₂ H ₅₉ NO ₁₈	985	236-238
Teksidol	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₀	536	159
9-deasetil-9-benzoil-10-debenzoiltaksisin A	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₀	572	

Çizelge 2.1.'nin devamı

7-(β -ksosil)-10-deasetiltaksol	$C_{50}H_{57}NO_{17}$	943	246-248
7-(β -ksosil)sefalomanin	$C_{50}H_{61}NO_{18}$	963	
7-(β -ksosil)taksol C	$C_{51}H_{65}NO_{18}$	979	229-231
7-(β -ksosil)taksol	$C_{52}H_{59}NO_{18}$	985	236-238
9-deasetil-9-benzoil-10-debenzoiltaksin A	$C_{31}H_{40}O_{10}$	572	
2 α -asetoksibrevifoliol	$C_{33}H_{42}O_{11}$	614	198
7,9,10-trideasetil- <i>abeo</i> -bakatin VI	$C_{31}H_{40}O_{10}$	588	
4 α ,7 β -diasetoksi-2 α ,9 α - dibenzoiloksi-5 β ,20-epoksi-10 β ,13 α , 15-tri-hidroksi-11(15 \rightarrow 1)- <i>abeo</i> -taksan	$C_{38}H_{44}O_{12}$	692	
13-asetil-13-desinnamol-taksin B	$C_{37}H_{46}O_{14}$	718	243-244
5-sinnamolfototaksisin II	$C_{29}H_{36}O_6$	480	
5- <i>o</i> -sinnamol-9- <i>o</i> -asetil-fototaksisin I	$C_{31}H_{38}O_8$	538	78-80
Deaminoaçilltaksin A	$C_{24}H_{34}O_8$	450	
2-deasetiltaksin A	$C_{33}H_{45}NO_9$	599	
Taksin A	$C_{35}H_{47}O_{10}$	641	204-206
7- <i>o</i> -asetiltaksin A	$C_{37}H_{49}NO_{11}$	683	178-180

Çizelge 2.1’de belirtilen taksanlardan, 10-desasetilbakatin III (Şekil 2.12) *Taxus baccata* L.’de oldukça mevcut olup paklitakselin yarı sentetik olarak sentezlenmesinde çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.12. 10-deasetilbakatin III’ün molekül yapısı

2.2.4. 10-deasetilbakatin’den Paklitaksel Sentezi

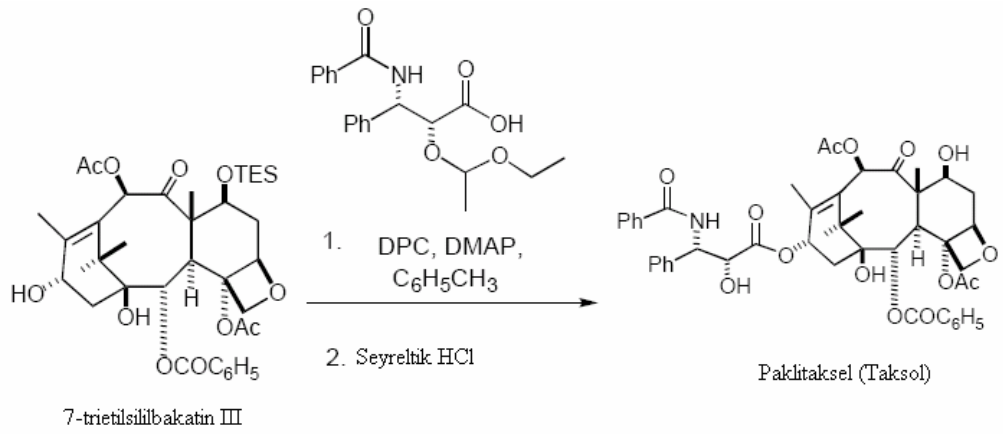
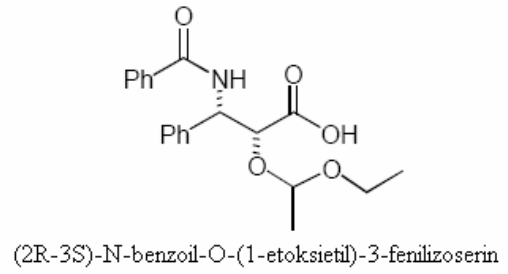
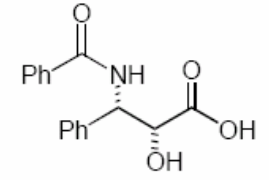
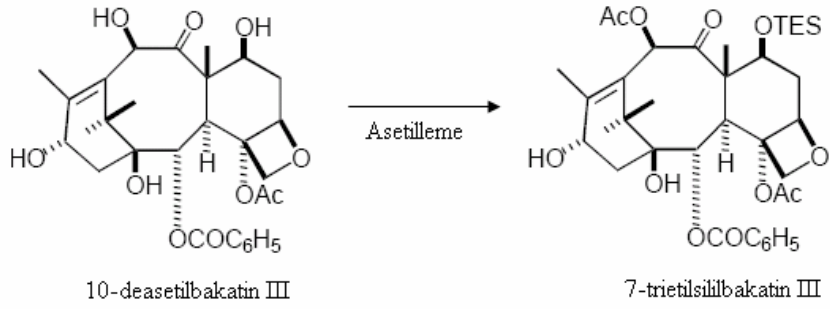
Taksolun total sentezini günümüze kadar altı farklı araştırma grubu gerçekleştirmiştir. İlk olarak 1994 yılında Holton ve Nicolau tarafından gerçekleştirilen sentez basamaklarında, Holton ve ark. (-)-kamforu başlangıç maddesi olarak kullanmış ve bir dizi etkili sentetik reaksiyonlar gerçekleştirmişlerdir. Nicolau ise ilk etapta A ve C halka sistemlerini inşa edip daha sonra halka kapanma reaksiyonu ile B halkasını oluşturmuştur. 1995 yılında Danishefsky Heck kapanma reaksiyonunu kullanarak, 1997’de Wender α -pinen’den türevlendirilmiş bir epoksi alkolün parçalara ayrılması metodu ile, ve yine aynı yıl Mukaiyama, neopentil glikol ya da L-serini başlangıç maddesi olarak kullanarak önce B halkasını daha sonra A ve C halkasını onun üzerine inşa ederek taksolun total sentezini gerçekleştirmişlerdir [32].

Taksol, sentezlenmesinin yanı sıra pek çok Taksus türünün yapraklarından izole edilebilmekte ve bu yöntemde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda bitki doku kültürü Taksol üretimi için dikkat çekici bir yöntem olmaya başlamıştır. Taksolün elde edilmesiyle ilgili önemli ve farklı başlangıç çalışmalarından biri Taksolün *Taxomyces andreanae* adlı mantar türü tarafından

üretimiyle ilgili 1993 yılında yapılan çalışmadır. Ürün miktarının çok az olmasına rağmen (24-50 ng/L), genetik mühendisliği tarafından mantarlar üzerine genetik ayarlamalar ile bitkiye göre ürün miktarında ve metot gelişiminde artış söz konusu olabilmektedir. Bu yöntemin geliştirilmesi ile Taksolün fermantasyon yöntemi ile elde edilmesi sürecinde başlamış olmakla beraber bu yöntem bitki doku kültüründen daha ucuz bir maliyete sahip bir uygulamadır.

Taksol'ün dörtlü halkaya sahip diterpen özelliğe sahip parçası 10-deasetilbakatin III, Taksol'ün total sentezi için en fazla dikkat çeken yapıların başında gelmektedir ve *Taxus baccata* L.'nin yenilenebilir yapraklarında bol miktarda bulunmaktadır. 10-DAB III porsuk ağacının yapraklarından 1 g/kg oranında izole edilmiştir.

Taksol'ün 10-DAB III'dan sentezi için ilk etapta Taksol yan zincirinin hazırlanması, ikinci etapta 2'-OH yan zincirini korumak ve üçüncü etapta 10-DAB III üzerinde gerekli değişiklikleri yapmak gerekmektedir. Üçüncü etapta yapılması gerekenler 7'-OH grubunun korunması ve 10'-OH grubunun asetillenmesi olarak belirtilebilir. Final basamağında ise korunmuş yan zincir ve korunmuş 10-DAB III (örneğin 7-trietilsilil bakatin III) moleküllerinin birleştirilmesidir. Paklitaksel'in 10-DAB III'den sentez mekanizması Şekil 2.13'de özet olarak verilmiştir [32].



Şekil 2.13. 10-Deasetilbakatin III'den Paklitaksel Sentezi [32]

2.3. SÜPERKRİTİK AKIŞKANLAR

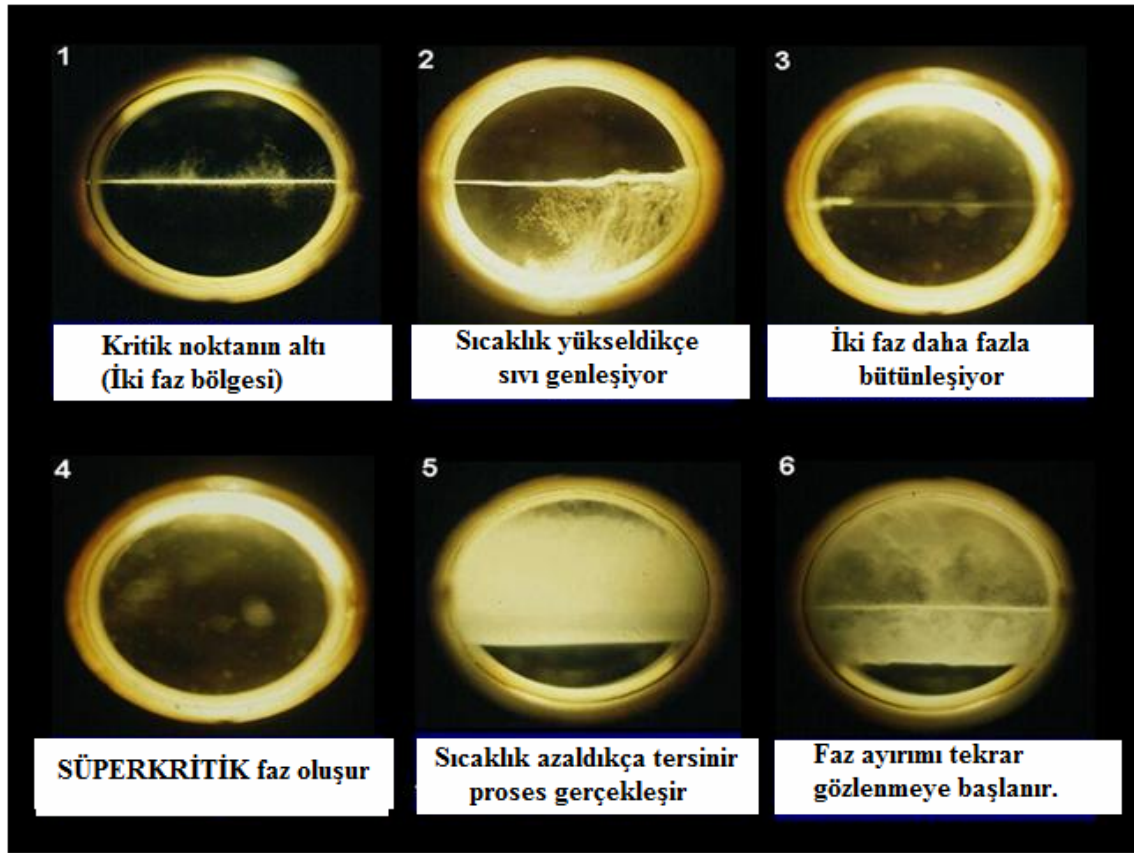
Son yirmi yılda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) artan bir ilgi ile bilinen ekstraksiyon metotlarına karşı ilginç alternatif bir metot olarak dikkat çekmektedir. SFE, destilasyon, soxhlet, sıvı ekstraksiyon ve sıvı kromatografisi gibi diğer metotlarla başarısız olan üstünlükleri sağlayan yeni bir metottur. Bu metot da çözügen tüketimi ve basamak sayısı azalmakta, analiz süresi kısalmaktadır. Çözügen tüketimi hacminin azaltılması sadece yüksek fiyatlardan kaçınmak açısından değil, çevresel faktörler bakımından da önemlidir. Süperkritik akışkanların önemli özelliği çözme gücünün, yoğunluktaki değişimler yolu ile kontrol edilebilmesidir. Farklı polarite ve molekül boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanımı ile ekstrakte edilebilmektedir. Ayrıca süperkritik akışkan hızı, süperkritik akışkanda moleküllerin difüzyon katsayıları bir sıvı ortamındakinden daha fazla olması nedeni ile yüksektir. Bu metot kolaylıkla otomatikleştirilebilmekte ve kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle birleştirilebilmektedir.

Bir maddenin kritik noktası ilk kez Baron Cagniardde'la Tour tarafından 1822'de gözlenmiştir. 1879'da Hannay ve Hogart metal halojenürler gibi katı maddelerin süperkritik metanol ve karbon tetraklorür de çözüldüğünü rapor etmişlerdir. Francis 1954'de yayımladığı bir makalede 261 tane farklı bileşenin süperkritik CO₂'de çözüldüğünü belirtmiştir. 1980'lerden sonra süperkritik sıvıların analitik kimyada uygulamalarda büyük gelişme göstererek hızla pek çok endüstriyel alanda yer almaya başlamıştır. Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) süperkritik akışkan ekstraksiyon metotlarının gelişimi için çaba göstermektedir [33-34].

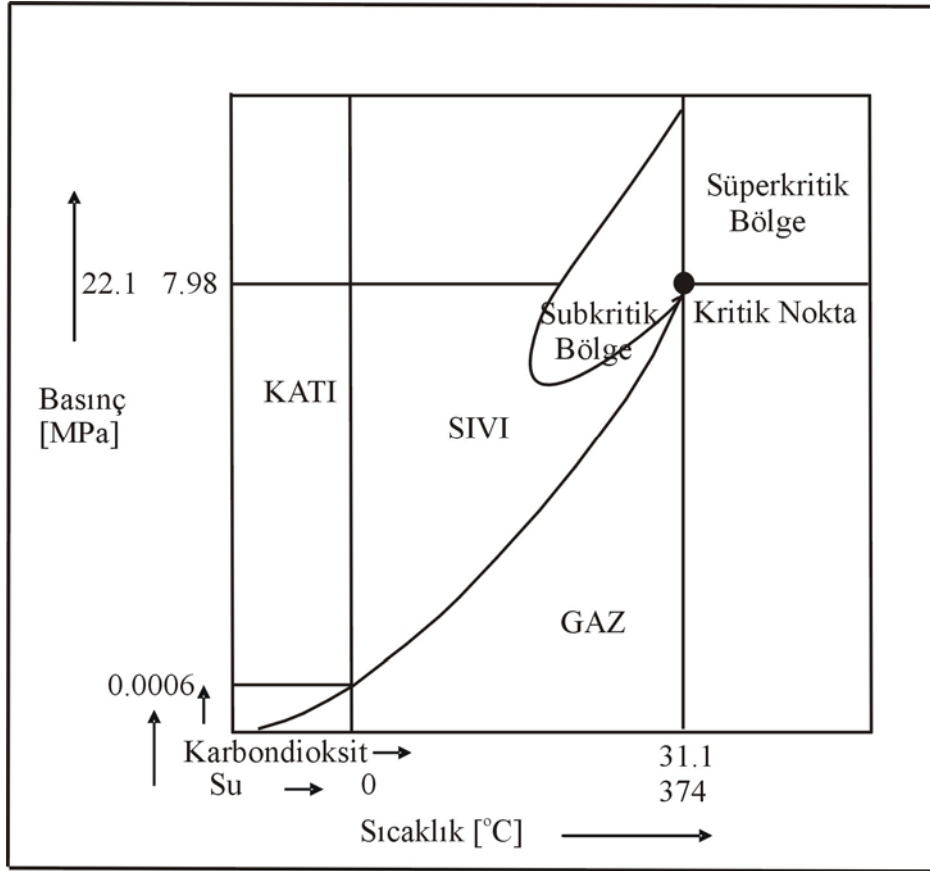
2.3.1. Süperkritik Akışkanın Tanımı

Bir madde için kritik sıcaklık (T_c), basınç değeri ne olursa olsun, o sıcaklığın üstünde maddenin sıvı faz olarak bulunamayacağı değerdir. Maddenin kritik sıcaklığındaki buhar basıncına kritik basınç (P_c) denilmektedir. Böylece maddenin, hem sıcaklığı hem de basıncı kritik noktanın üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı yeni bir bölge ortaya çıkmaktadır ve bu bölgedeki akışkan "süperkritik akışkan" olarak tanımlanmaktadır. Süperkritik akışkanların

oluşum süreci Şekil 2.14’de ve saf bir madde için sıcaklık-basınç diyagramı Şekil 2.15’de belirtilmiştir. Kritik nokta bütün maddeler için karakteristik özellik göstermektedir. Süperkritik akışkanların yoğunlukları, viskoziteleri ve diğer özellikleri, maddenin gaz ve sıvı fazındaki özellikleri arasında yer almaktadır. Süperkritik akışkanların çözücü etkisi göstermesi gibi pek çok avantajları vardır. Süperkritik bölgede bazı bileşikler çok iyi çözünebilmekte ve çözünürlüğü düşük olan bileşiklerin bu bölgede çözünürlüğü artırılabilir. Çizelge 2.2’de bazı bileşiklerin kritik özellikleri belirtilmiştir [35].



Şekil 2.14. Süperkritik akışkanın oluşum süreci [36]



Şekil 2.15. Su ve CO₂ için sıcaklık-basınç diyagramı [37]

Çizelge 2.2. Bazı çözücülerin kritik özellikleri [35]

Çözücü	T _c (°C)	P _c (bar)	ρ _c (g/ml)
Karbondioksit	31.1	72	0.47
Azotdioksit	158	98.7	0.27
Amonyak	132.5	109.8	0.23
Su	374.2	214.8	0.32
Helyum	-268	2.2	0.07
Hidrojen	-240	12.6	0.03
Ksenon	17	56.9	1.11
Metan	-82	46.0	0.169
Etan	32.3	47.6	0.2
n-Hekzan	234.2	28.9	0.23
Benzen	288.9	98.7	0.302
Toluen	319	41.1	0.292
Metanol	239	78.9	0.27
Etanol	243.4	72	0.276
İzopropil Alkol	235.3	47.6	0.273
Dietileter	193.6	63.8	0.267
Aseton	235	47.0	0.279
Asetonitril	275	47	0.25

2.3.2. Süperkritik Akışkanların Özellikleri

Kritik noktada maddelerin birçok özelliği değişim göstermektedir. Bu özelliklerin değişmesiyle süperkritik akışkanların çözücü etkisi artmakta, kromatografi ve ekstraksiyon metotlarının uygulamalarında büyük bir önem kazanmaktadır [35-38]. Sıvıların, gazların ve süperkritik akışkanların bazı fiziksel özellikleri Çizelge 2.3’de belirtilmiştir. Süperkritik akışkanların genel özellikleri Şekil 2.16’da gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Sıvıların, gazların ve süperkritik akışkanların bazı fiziksel özellikleri

Fiziksel özellik	Gaz	Süperkritik Akışkan	Sıvı
Yoğunluk (g/cm ³)	(0.6-2)x10 ⁻³	0.2-0.5	0.6-2
Difüzyon katsayısı (cm ² /s)	(1-4)x10 ⁻¹	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	(0.2-2)x10 ⁻⁵
Viskozite (g/cm.s)	(1-3)x10 ⁻⁴	(1-3)x10 ⁻⁴	(0.2-3)x10 ⁻²

2.3.2.1. Yoğunluk

Süperkritik akışkanların yoğunlukları, sıcaklığa ve basınca bağlı olarak, sıvı ve gaz akışkanların yoğunluklarına yakın değerdedir. Süperkritik bölgede yoğunluk, sabit sıcaklıkta, basıncın azalmasıyla ani düşüş gösterirken, sabit basınçta, sıcaklığın azalmasıyla artış göstermektedir [35-38]. Süperkritik akışkanların sıcaklık ve basınçla değişen yoğunluk eğrisi Şekil 2.17’de gösterilmektedir.

2.3.2.2. Difüzyon katsayısı

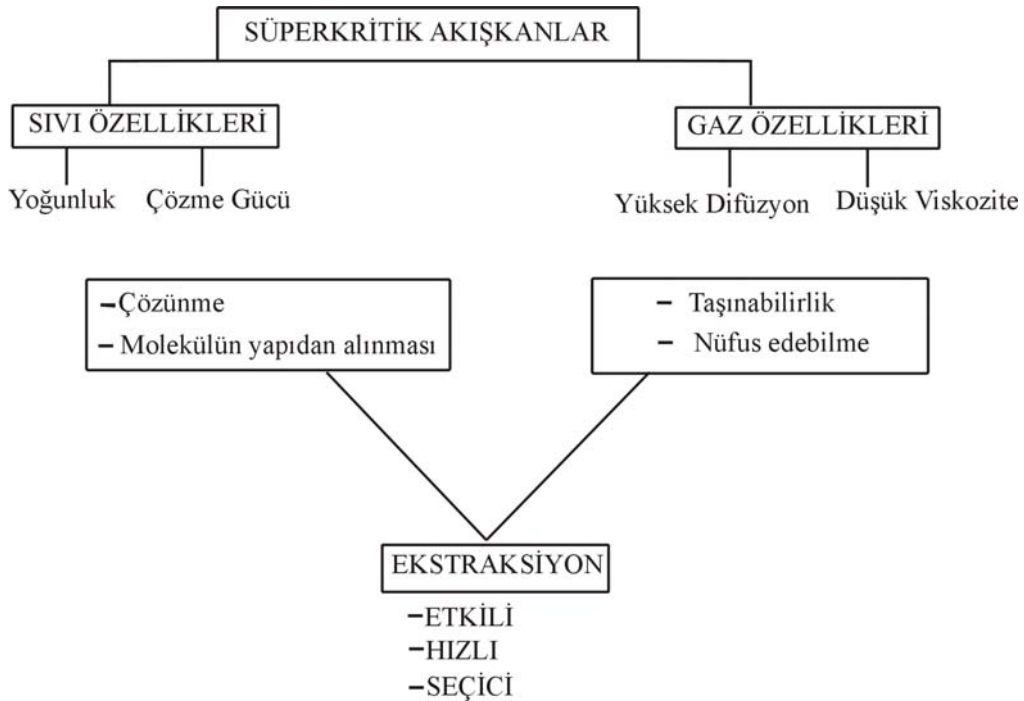
Süperkritik akışkanların difüzyon katsayısı, normal koşullar altındaki akışkanların difüzyon katsayısından daha büyüktür. Difüzyon katsayısı basıncın azalmasıyla veya sıcaklığın artmasıyla artmaktadır. Yüksek difüzyon katsayısı akışkanlarda hızlı kütle transferi sağlamak ve bileşiklerin ekstraksiyonu ve kromatografik uygulamalarına olanak vermektedir [35-38]. Süperkritik akışkanların sıcaklık ve basınçla değişen difüzyon eğrisi Şekil 2.18’de gösterilmektedir.

2.3.2.3. Viskozite

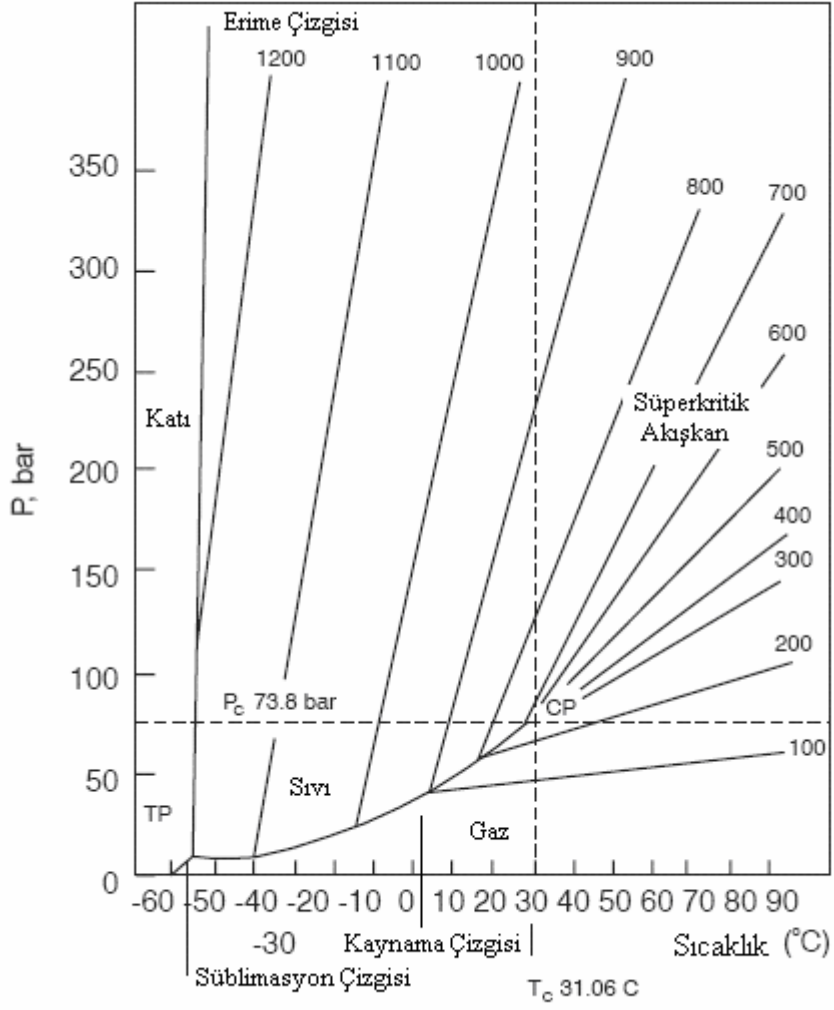
Süperkritik akışkanların viskozitesi, sıvı ve gazların viskoziteleri arasında yer almaktadır. Gaz veya akışkanlarda olduğu gibi süperkritik akışkanlarda da viskozite, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak davranmakta fakat basınç değişimlerinde akışkanlarla benzer özellik göstermemektedir [35-38]. Süperkritik akışkanların sıcaklık ve basınçla değişen viskozite katsayısı eğrisi Şekil 2.19'da gösterilmektedir.

2.3.2.4. Isıl İletkenlik

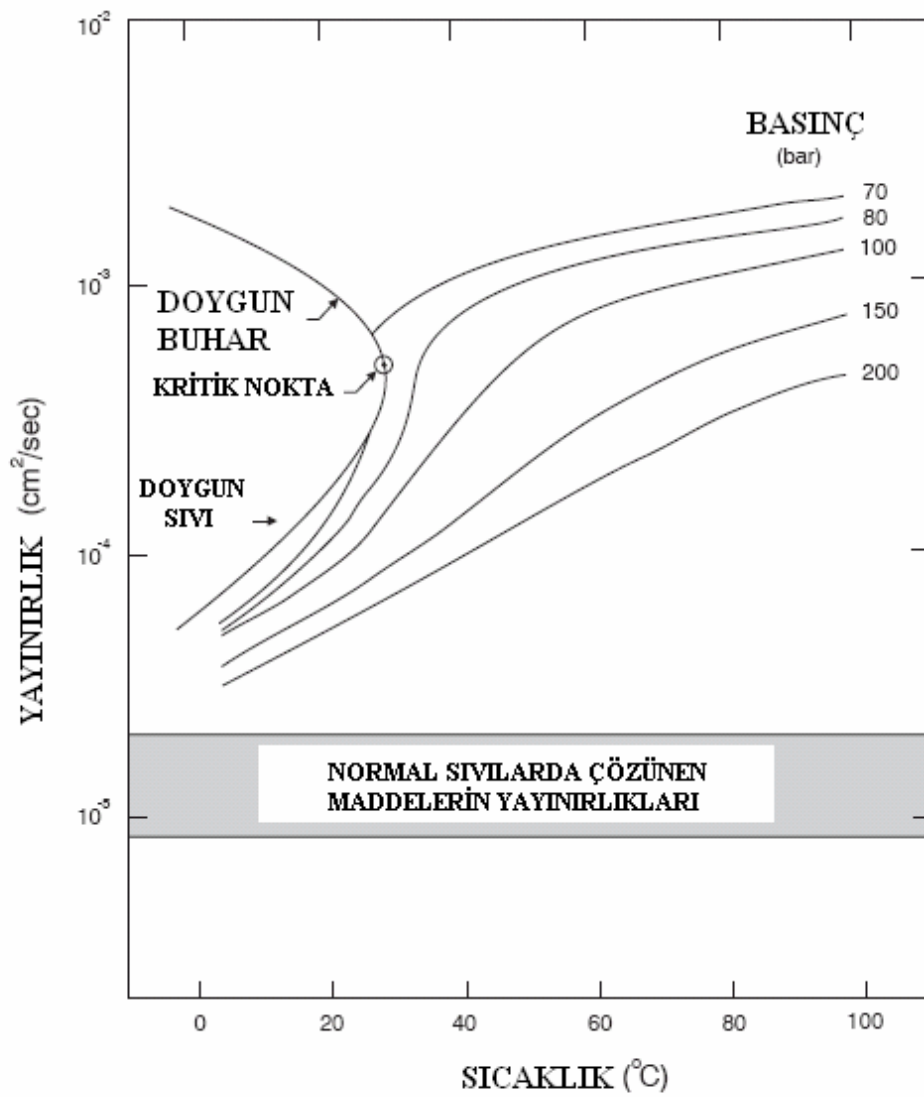
Isıl iletkenlik (λ), sıcaklık, basınç ya da sıvının yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Süperkritik şartlarda ısıl iletkenlik sıcaklığın artması ile azalmaktadır. Çoğu süperkritik akışkan için herhangi bir basınçta en düşük değerden geçer ve sonra artan sıcaklık ve yoğunlukla artış gösteririr [39]. Süperkritik akışkanların ısıl iletkenliğinin yoğunlukla değişimi Şekil 2.20'da gösterilmiştir.



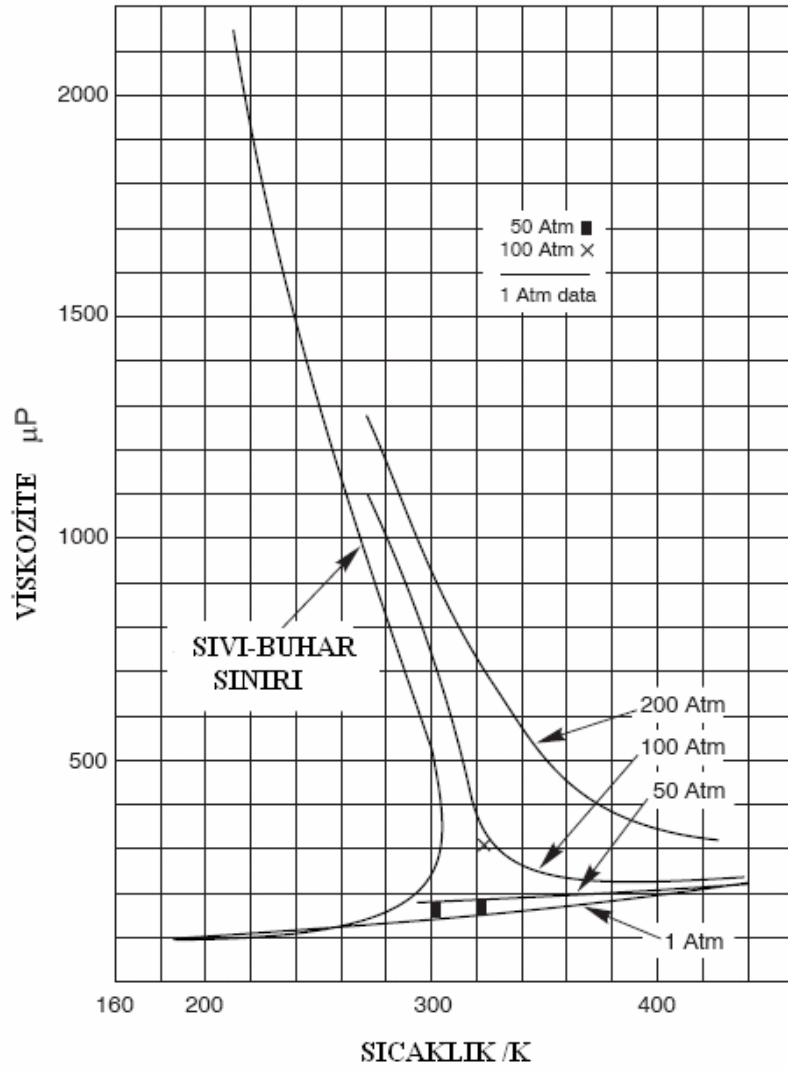
Şekil 2.16. Süperkritik Akışkanların Özellikleri [40]



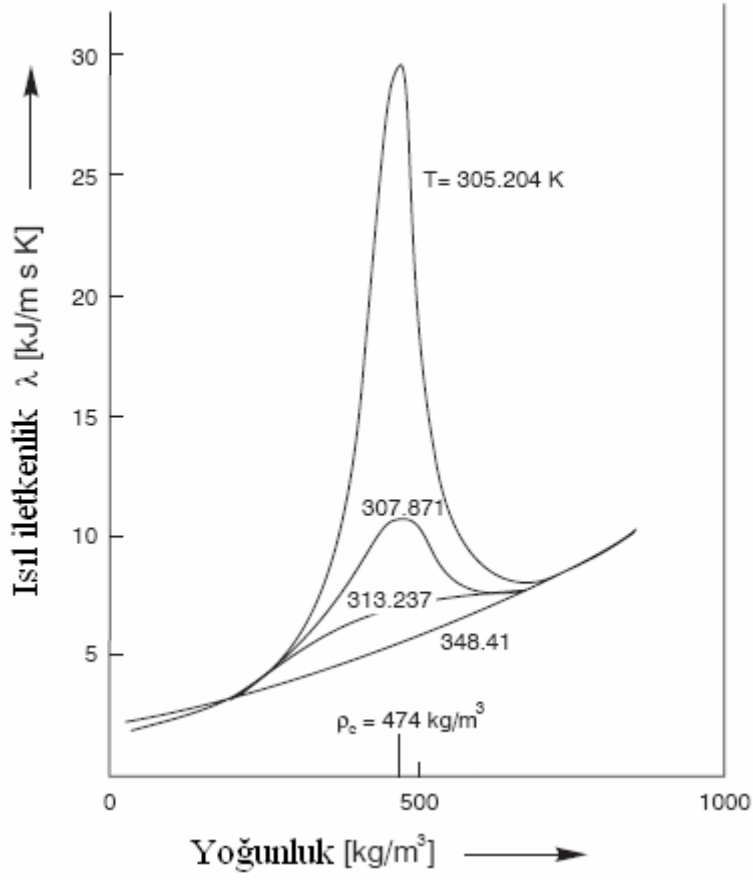
Şekil 2.17. Karbondioksitin yoğunluğunun sıcaklık ve basınçla değişim diyagramı [39]



Şekil 2.18. Süperkritik karbondioksitin yayınlığı [39]



Şekil 2.19. Süperkritik karbondioksitin viskozite değişimi [39]



Şekil 2.20. Kritik nokta yakınında CO_2 'nin ısı iletkenliği [39]

2.3.3. Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları

Süperkritik akışkan (scf) süreçleri, bilimsel ve teknolojik açıdan hızla gelişen bir alan haline gelmiştir [41]. Son yıllarda, Almanya başta olmak üzere ABD ve Japonya'da bu konuyla ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Çözünürlüğünün ayarlanabilir olmasından dolayı, süperkritik akışkanlar (başta süperkritik karbondioksit-sc-CO₂ olmak üzere) ayırma ve saflaştırma, kromatografi, polimerizasyon ve fraksiyonlama, tanecik tasarımı, biyoteknoloji, yağların modifikasyonu, suların arıtılması gibi çok değişik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Özellikle, doğal ürünlerin süperkritik akışkan kullanılarak ekstrakte edilmesine, fraksiyonlanmasına veya saflaştırılmasına dayalı olarak son 20 yıl içerisinde gerçekleştirilmiş araştırmalardan ve süreç geliştirme çalışmalarından elde edilen ümit verici sonuçlar araştırmacıları ekstraktif olmayan uygulama alanlarında da yoğun araştırmalara yöneltmiştir [42]. Süperkritik akışkan uygulamaları endüstride daha çok geçmişte doğal maddelerin ekstraksiyonu, kahveden kafeinin giderilmesi, bitki tohumlarından yağ ekstraksiyonu, kömür ve petrolden kimyasal maddelerin ekstraksiyonu gibi süreçlere yoğunlaşmıştır [43-46]. Genel olarak süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen uygulamalara bakılacak olursa [47];

GIDA

- ◆ Çay ve kahveden tein ve kafeinin giderilmesi
- ◆ Tütünden nikotin ve katranın uzaklaştırılması
- ◆ Yağlı çekirdeklerden yağ ekstraksiyonu
- ◆ Aroma ekstraktlarının hazırlanması
- ◆ Kolesterolün uzaklaştırılması
- ◆ Narenciye sularının acılığının giderilmesi
- ◆ Yağ ve aromaların fraksiyonlanması
- ◆ Şerbetçi otu ekstraktı eldesi
- ◆ Tütün hücresi genleşmesi
- ◆ Reçel sterilizasyonu

ECZACILIK

- ◆ Doğal ürünlerden aktif bileşenlerin ekstraksiyonu
- ◆ Biyokimyasal karışımların ayrılması
- ◆ Tanecik tasarımı, yüksek basınç mikronizasyonu ve püskürtmeli kurutma (toz halinde aktif madde üretimi) : * RESS *SAS *GAS *SEDS
- ◆ Kristalizasyon (kaplama)
- ◆ Yüksek basınç sterilizasyonu

POLİMER

- ◆ Polimerizasyon, polimerik köpüklerin üretimi, polimer aşılama
- ◆ Polimerlerin fraksiyonlanması
- ◆ Kaplama
- ◆ Polimer işleme

MALZEME

- ◆ İmplant malzemelerin tasarımı
- ◆ Mikro- ve nanotaneciklerin tasarımı
- ◆ Aerojel eldesi
- ◆ Otofretaj
- ◆ Su jetiyle kesme/temizleme

KİMYASAL İŞLEMLER

- ◆ Düşük buhar basınçlı yağların fraksiyonlanması veya saflaştırılması
- ◆ Seramik işleme
- ◆ Aktif karbon rejenerasyonu
- ◆ Polar ve polar olmayan bileşenlerin ayrılması

ÇEVRE

- ◆ Sulu çözeltilerden organik atıkların uzaklaştırılması
- ◆ Süreç akımlarından toksik malzemelerin uzaklaştırılması
- ◆ Topraktan ağır metallerin uzaklaştırılması

HİDROKARBON İŞLEMLERİ

- ◆ Kömür sıvılaştırma
- ◆ Kömürden gazlaşabilir maddeler ve yağların ekstraksiyonu
- ◆ Yağlardan asfaltın uzaklaştırılması
- ◆ Kalıntı ekstraksiyonu
- ◆ Jeolojik oluşumlardan yağ ve gaz kazanımı

YÜZEY İŞLEMLERİ

- ◆ Tekstil boyama (polietilen elyafları)
- ◆ Tekstil temizleme ve kuru temizleme

REAKSİYON

- ◆ Fischer-Tropsch sentezi
- ◆ Diels-Alder Reaksiyonu
- ◆ Hidrojenasyon
- ◆ Alkilleme
- ◆ Oksidasyon (sc-H₂O oksidasyonu)
- ◆ Transesterifikasyon (biyodizel)
- ◆ Biyoreaksiyonlar
- ◆ Hidroformülasyon

ANALİTİK

- ◆ Süperkritik Akışkan Kromatografisi

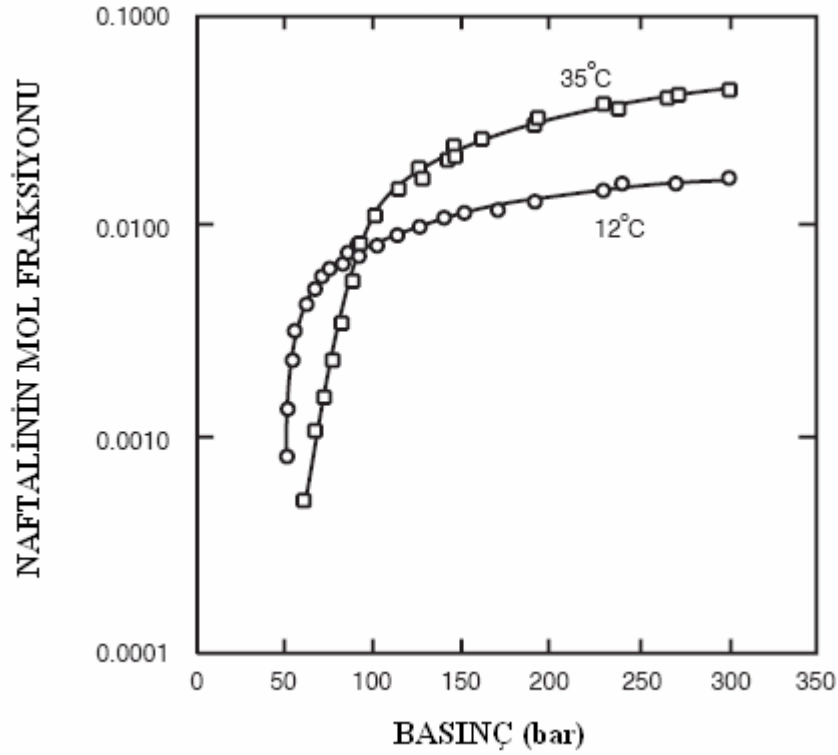
2.3.4. Süperkritik akışkanın seçimi

Süperkritik akışkanın seçimi kullanılacağı uygulama alanına göre değişkenlik göstermektedir. Bu seçimde analit maddenin süperkritik akışkan içindeki çözünürlüğü, akışkanın kolay ve ekonomik olması ile birlikte çevre ve insan sağlığı bakımından güvenilir olması gibi etkenler ilk sıralarda yer almaktadır. Bazı inorganik ve organik süperkritik akışkanlar ile bu akışkanların sahip olması gereken özellikler Çizelge 2.4'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı süperkritik akışkanların avantaj ve dezavantajları [40]

Özellik	İnorganik			Organik		
	CO ₂	H ₂ O	N ₂ O	CFCs	HK	MeOH
Toksosite	+	+		+	+	-
Tutuşabilirlik	+	+		+	-	-
Maliyet	+	+		+	+	-
Reaktiflik	+	-	-	+	+	-
ScF koşullara ulaşılma kolaylığı	+	-	+	+	+	-
Çevreye zararlılık	+	+		-		
NŞA'da gaz olabilme	+	-	+	+	-	
Dedektöre uygunluk	+				-	
Polarite	-	+	+	+	-	+

Çizelge 2.4'e bakıldığı zaman süperkritik akışkanların sahip olması gereken özellikler bakımından en uygun çözücü tespit edilebilmektedir. Süperkritik akışkanlar içerisinde zehirli olmaması ve alev almaması ayrıca süperkritik şartlara kolay ulaşması (74 atm ve 31°C üstü) nedeniyle karbondioksit çok yaygın olarak saflaştırma, kristallendirme ekstraksiyon ve sentez işlemlerinde sıkça kullanılmaktadır. Diğer süperkritik akışkanlarda olduğu gibi karbondioksitinde çözme gücü basınç ve sıcaklığın kritik nokta üzerinde artırılmasıyla artırılabilir. Bunun en güzel örneği naftalinin çözünürlüğüdür. 75 atm ve 45°C de naftalinin çözünürlüğü % 0 iken basınç 100 atm'e çıkarıldığında naftalinin çözünürlüğü % 10 civarına yaklaşmaktadır (Şekil 2.21). Çözme gücünün basınç ve sıcaklıkla bu derece değişmesi CO₂'i ekstraksiyonda çözücü olarak kullanılması için önemli bir avantaj sağlamaktadır [48].



Şekil 2.21. Naftalinin CO₂'deki çözünürlüğü [39]

Süperkritik akışkanların yayımlılık özelliği katılara kolaylıkla difüzenmeyi sağlamakta, yüksek yoğunluk akışkanın çözücü gücünü arttırmaktadır. Bu açıdan şifalı bitkilerden aktif bileşiklerin ayrılması için etkili bir ekstraksiyon tekniğidir [49].

Birçok sıvı ve gazın sıcaklığı ve basıncı düzenlenerek süperkritik akışkan haline getirilebilse, özellikle karbondioksit bir takım üstünlükleri nedeniyle daha sıklıkla kullanılmaktadır. Süperkritik koşullarda karbondioksitin difüzyon katsayısı ve çözünürlüğünün yüksek, buharlaşma entalpisi, viskozitenin ve maliyetinin düşük olması, toksik olmaması ve oksidatif reaksiyonları önlemesi gibi özellikleri dikkate alındığında süperkritik akışkanlar içinde en uygun çözücü olduğu görülmektedir [50]. Karbondioksit, endüstriyel işlemler sonucunda yan ürün olarak oldukça fazla üretilmektedir, bununla birlikte süperkritik akışkan olarak kullanılabilen bir diğer madde olan su da doğada bulunan saf ve ucuz bir akışkan olması gibi avantajların yanında kritik sıcaklığının oldukça yüksek olması (374.2 °C) kullanım alanına birtakım sınırlandırmalar getirmektedir.

2.3.5. Süperkritik Akışkanların Çözme gücü

Akışkanların çözme gücü yoğunluğa bağlı olarak değişmektedir. Klasik organik çözücülerde çözme gücü temel olarak çözücünün basıncına bağımlı olmakla birlikte çözücünün yoğunluğundan bağımsız bir davranış sergilemektedir.

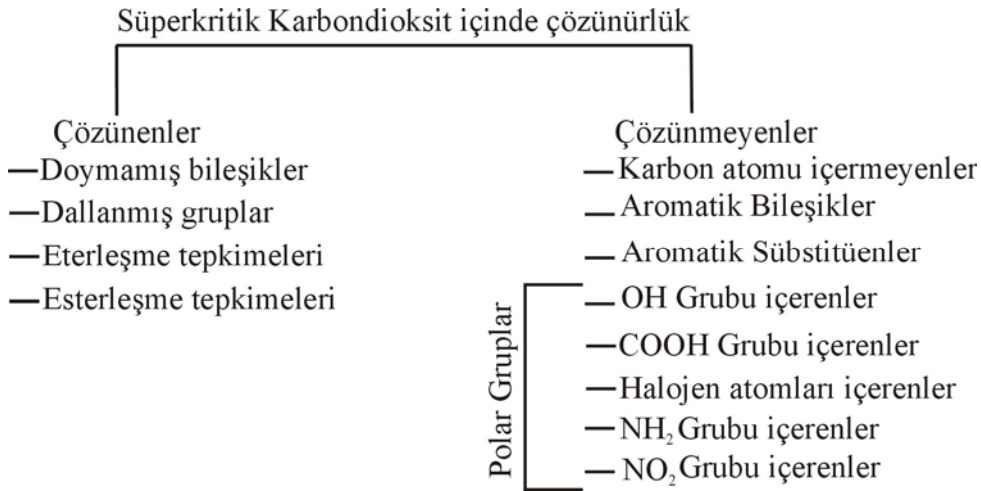
Süperkritik akışkanların çözme gücü, o akışkanın yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Süperkritik bölgede yoğunluk sabit sıcaklıkta basıncın artırılması ile keskin bir şekilde artmakta bununla birlikte sabit basınçta sıcaklığın artırılması ile azalmaktadır. Bu veriler doğrultusunda sabit sıcaklıkta ve düşük basınçlarda apolar ve kısmen polar olan bileşiklerin, bununla birlikte yüksek basınçlarda ise polar ve yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerin çözünürlüğünde artış olmaktadır [40].

Akışkanların çözme gücünü etkileyen bir diğer faktör de polariteleridir. Karbondioksit zayıf polariteye sahip polar çözücülere benzediğinden dolayı apolar çözücüler grubunda sınıflandırılmaktadır, bununla birlikte moleküldeki karbon atomunun dört kutuplu bir düzene sahip olması karbondioksitin sınırlı olsa alkoller, esterleri ve aldehitleri çözmesine olanak sağlamaktadır. Karbondioksitin polaritesinin artırılması ve polar maddelerin ekstraksiyonuna olanak sağlamak amacıyla polaritesi yüksek bir takım organik çözücüler eklenebilmektedir, bu maddeler yardımcı çözücü (modifier, entrainer) olarak adlandırılmaktadırlar [50]. Bununla birlikte süperkritik karbondioksit içinde çözünen maddelerin kısmi molar entalpileri ve kısmi molar hacimleri çözünürlük gücünü etkileyen parametreler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ortamda çözünen maddenin yapısına bağlı olarak, düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonlar ve lipofilik organik bileşikler kolaylıkla çözünürken, yüksek molekül ağırlığına sahip hidrokarbonlar ve bunların polimerleri kolaylıkla ekstrakte edilemezler. Karbondioksit, hidroksil, karboksil gruplarını içeren moleküller ile aminoasitler ve şekerler için uygun çözücü değildirler. Doğal maddelerin süperkritik karbondioksitteki çözünürlükleri Çizelge 2.5’de gösterilmiştir [50-51].

Çizelge 2.5. Doğal maddelerin sc-CO₂'deki çözünürlükleri [50-51]

Çok çözünenler	Zayıf çözünenler	Kısmen çözünenler
Molekül ağırlığı 250'den düşük olan kısmen polar ve apolar bileşikler (mono ve seskiterpenler, tioller, parazinler, asetik asit, benzaldehit,hekzanol, gliserol, asetatlar)	Molekül ağırlığı 250 ile 400 arasında değişen organik bileşikler (Oleik asit, dekanol, C ₁₂ 'nin üzerindeki doymuş yağlar)	Molekül ağırlığı 400'den büyük olan organik bileşikler (Şeker,proteinler, vakslar,inorganik tuzlar,pestisitler,klorofiller, karotenoidler.

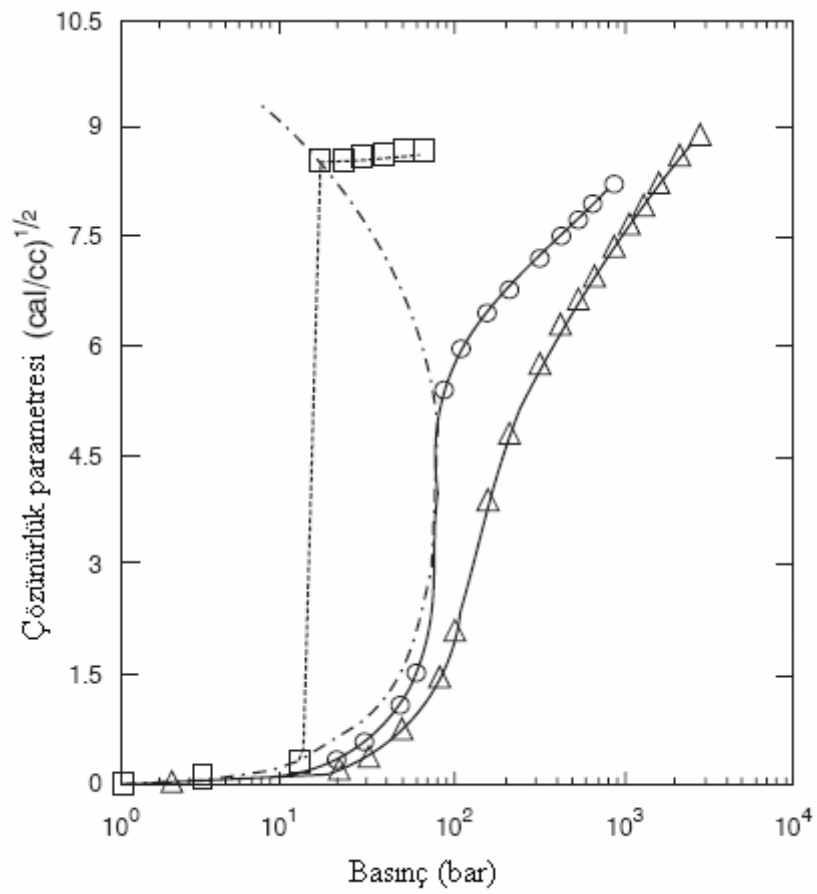
Süperkritik karbondioksit içinde çözünürlük sınıflandırması Şekil 2.22'de belirtilmiştir.



Şekil 2.22. Süperkritik CO₂ içinde bileşiklerin çözünürlüğü [40]

Gibbs serbest enerjisi değişimi negatif olduğunda çözünme gerçekleşir. Gibbs serbest enerji değişiminin negatif olup olamayacağını karışma entalpi ve entropisinin işareti ve büyüklüğü belirler. Polar olmayan moleküller için entalpi değişimi pozitifdir. Bu durumda birim hacim başına karışma ısısı Hildebrandt tarafından; $\Delta H = v_1 v_2 (\delta_1 - \delta_2)^2$ eşitliği ile verilmiştir.

ΔH moleküller arasındaki bağların parçalanma ve birleşmesi sonucu ortaya çıkan enerji değişimini, v_1 ve v_2 ise sırasıyla çözücü ve çözünenin kısmi hacimlerini δ_1 ve δ_2 ise sırasıyla çözücü ve çözünenin çözünürlük parametrelerini göstermektedir. $\delta_1 - \delta_2$ arasındaki fark 1.7-2.0 den daha küçükse karışımın olacağı varsayılır. Fark 2'nin üzerindeyse karışma mümkün değildir. (Hidrojen bağı köz konusu değilse geçerlidir) [40]. Basınca bağlı olarak değişen çözünürlük parametresi değerleri Şekil 2.23'de belirtilmiştir.



Şekil 2.23. CO₂ için Hildebrandt çözünürlük parametresi.(□) 30 °C, (○) 31 °C, (Δ) 70 °C [52]

2.4. EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ

Bitkiler belirli oranlarda bioaktif bileşikler içermektedirler. Bitki ekstraktları gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde geniş çapta kullanılmaktadır. Bununla bağlantılı olarak elde edilen doğal bileşiklerin ticarileştirilmesi amacıyla ekstraksiyon metotları geniş çapta araştırılmaktadır. İdeal bir ekstraksiyon süreci hızlı, basit ve ucuz olmalıdır. Ekstrakte edilen maddeler kayıp ve bozunmaya uğramadan elde edilmeli, ilaveten bir saflaştırma gerektirmemeli ve atık çözücü içermemelidir. Genelde çözücü ekstraksiyonu bu koşulları sağlamakta yetersiz kalmaktadır. Çözücü ekstraksiyonu basit, ucuz ve kuramsal olarak yerleşmiş bir yöntemdir fakat birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bunların en başında yüksek ısı ve çözücü tüketimi gelmektedir. Genelde çevre, sağlık ve güvenlik açısından zararlı çözücüler kullanılır. Kullanılan ısı ve çözücüler ürün kalitesini etkiler, dolayısıyla ısıl bozunmaya uğrayan hassas maddelerin ekstraksiyonu için geleneksel çözücü ekstraksiyonu uygun bir yöntem değildir. Ayrıca ekstraksiyon işleminden elde edilen alt akım seyreltiktir. Hedef ürünün çözücülerden ayrılıp derişiklendirilmesi için ek bir ayırma işlemine gerek duyulur. İşlem süresi uzun ve işletme maliyeti yüksektir. Tüm bunlardan dolayı alternatif ekstraksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur [57,53]. Soxhlet ekstraksiyonu ile birlikte bu yeni ekstraksiyon teknikleri;

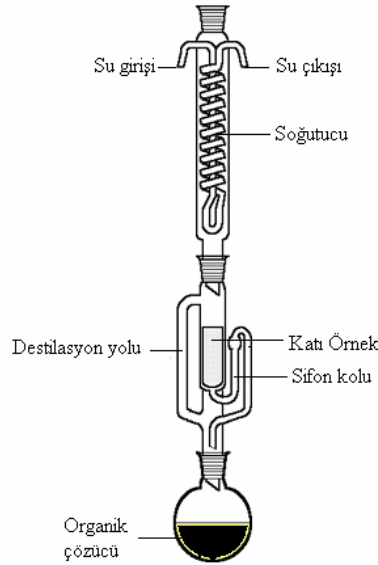
1. Soxhlet Ekstraksiyonu
2. Ultrasonik ekstraksiyon
3. Mikrodalga ekstraksiyon
4. Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu
5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

olarak belirtilebilir. Bu teknikler ile yüksek sıcaklık ve basınçta çalışmak mümkün olmakta ve ekstraksiyon zamanı dikkat çekici bir şekilde azaltılmaktadır.

2.4.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraktörü; 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından katı bir deney numunesinden yağ ekstrakte edilmesi amacıyla icat edilen bir laboratuvar

cihazıdır. Yağ ekstrakte etmek için tasarlanmış olmasına rağmen bir bileşiği bir katıdan ekstrakte etmek zor olduğu her şartta kullanılabilir. Genellikle, kuru deney numunesi Soxhlet ekstraktörüne yerleştirilen, filtre kağıdından yapılmış yüksük şeklinde bir ekstraksiyon tübüne konur.(Şekil 2.24) Ekstraktöre, çözücüye içeren şilifli bir cam balon ve yoğunlaştırıcı takılır. Çözücü ısıtılır ve böylece buharlaştırılır. Sıcak çözücü buharı yoğunlaştırıcıya ilerler, yoğunlaşarak katı numunenin üzerine düşer. Numuneyi içeren ekstraksiyon tübünün bulunduğu yüksük yoğunlaşan çözücü ile tam dolduğunda, bypass kolunun seviyesine ulaşır ve sifon oluşarak çözücü tekrar cam balona boşalır. Bu yoğunlaşma, yükselme ve sifon döngüsü, 'reflux' olarak adlandırılır ve sürekli tekrar edilir. Her döngü sırasında, katının içerdiği bir miktar yağ çözücüde çözünür. Ama çözücünün ısıtılan cam balonuna ulaştığında orada kalır, döngüye tekrar katılmaz. Bu durum, bu ekstraksiyon metodunun en önemli avantajıdır, sadece saf çözücü, katıyı ekstrakte etmek için buharlaşır ve yoğunlaşır, döngüye katılır. Bu nedenle, bir cam balonda katıyı çözücü içerisinde ısıtarak ekstrakte etme yöntemiyle karşılaştırıldığında Soxhlet ekstraktörü ile uygulanan bu yöntemin verimi daha yüksektir. Bir ekstraksiyonun sonunda arta kalan çözücü, ekstrakte edilen yağı bırakarak rotary buharlaştırıcısı ile uzaklaştırılabilir [54].



Şekil 2.24. Soxhlet düzeneği

Soxhlet ekstraksiyonu matriksin karakterine ve tanecik boyutuna (iç difüzyonun sınırlandırılması ile ilgili) önemli ölçüde bağlıdır. Bu ekstraksiyon

tekniklerinin avantajları arasında, çözücünün transfer dengesinin katı matrisle tekrarlanan bir şekilde etkileşmesinden dolayı sürekli değişmesi, ekstraksiyondan sonra filtreleme işlemine gerek duyulmaması, metodun basit ve ucuz olması gösterilebilir. Bununla birlikte ekstraksiyon zamanının çok uzun olması, çok miktarda çözücü kullanılması, prosesi hızlandırmak için balonun çalkalanamaması ve termal olarak bozulmaya duyarlı bileşiklerin yüksek sıcaklıkta ekstrakte edilememesi bu metodun dezavantajları olarak gösterilebilir. Genel olarak bakıldığında, iyi uygulanan bir metottur ve endüstriyel proseslerde daha etkili ve iyi tekrarlanabilirlik göstermesi, ekstrakta daha az manipulasyon olması diğer metotlara kıyasla üstün özellikleridir [53].

2.4.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

Ses dalgaları, farklı ortamlar içinde yayılan ve frekansları 20 kHz üstünde olan boyuna dalgalardır. Bu dalgalar buldukları ortama bağlı olarak (katı, sıvı ve gaz) farklı titreşimde ve hızda yayınırlar. Ses dalgası bir ortamda yayılırken; ortamın parçacıkları, dalganın hareket doğrultusu boyunca yoğunluk ve hacim değişiklikleri oluşturarak titreşirler. Bu parçacık hareketi, dalga hareketinin yönüne dik olan enine dalga hareketindeki durumun tersidir. Ses dalgaları şeklinde ortaya çıkan yer değiştirmeler, denge konumundan itibaren her bir molekülün boyuna yer değiştirmesini gerektirir. Bu sıkışma ve genişleme, yüksek ve alçak basınç düşmelerine yol açar. Bir mikrofona diyaframındaki gibi, ses dalgası kaynağı sinüsel olarak titreşirse, basınç değişimleri de sinüsel olur [55-56].

Ses ötesi dalgaların diğer yararlı uygulaması da hala tam olarak anlaşılabilen ancak kesinlikle çok etkili olan kavitasyon işlemidir. Bu sayede etkin bir temizlik yapmak mümkündür. Şöyle ki; bir ses dalgası art arda meydana gelen sıkışma ve genişlemelerden oluşur. Bir sıvı sıkışmalara kolaylıkla dayanabilir ancak genişleme yani basıncın şiddetli bir biçimde düşmesi sıvının içinde bir boşluk meydana gelmesine neden olur. Boşluk buharla veya sıvıdaki çözünmüş gazın ortaya çıkışıyla hemen doldurularak küçük bir kabarcığa dönüşür. Bu kabarcık dağıldığında şiddetli bir şok dalgası meydana gelir ve açık etkilere yol açabilir. İster

büyük isterse küçük olsun mühendislikte kullanılan parçalar içinden ultrasonik bir ses dalgasının geçtiği bir sıvı banyosuna batırılarak çok iyi temizlenebilir [56].

Ultrasonik indüklemenin mekanik etkisi olarak, kütle transferinin artırılarak çözücülerin hücrelere etki etmesi olarak gösterilebilir. Ekstraksiyon esnasında ultrasonik (ses dalgaları) hücre duvarına etki etmekte ve bileşenlerin bırakılmasına olanak sağlamaktadır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan çalışmalarda ultrasoniğin mekaniksel etkisi sonucu hücre duvarının yıkıldığı ve bundan kaynaklı olarak bileşenlerin serbest kaldığı kanıtlanmıştır. Bitkiye özgü nem oranı, tanecik büyüklüğü ve kullanılan çözücü gibi faktörler yanında, frekans, sıcaklık ve zaman gibi faktörlerde ultrasonik ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Pahalı olmaması, basit olması, ekstraksiyon kinetiğinin hızlı olması ve ısıya duyalı bileşiklerin ekstrakte edilebilir olması bu metodun avantajları olarak belirtilebilir [53].

2.4.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu

İkinci dünya savaşından beri kullanılan mikrodalga teknolojisinin, analitik laboratuvarında kullanımı 1970'lerin sonunda olmuştur. Mikrodalgalar 0.3-300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır ve genellikle doğal ürünlerde 2.5-75 GHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olmaktadır. Polar moleküller ve iyonik türlerin bulunduğu durumlarda daha hızlı bir enerji yayılması gerçekleşmektedir [57].

Mikrodalga ısıtmasının avantajı moleküllerin kutuplarındaki yükseltgenen zayıf hidrojen bağlarının bozundurulmasıdır. Klasik temas yoluyla ısı iletimi yöntemlerinin aksine, mikrodalgalar ile örneğin tamamı aynı anda ısıtılmaktadır. Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon iki farklı sistemle gerçekleştirilmektedir. En yaygın sistem, sıcaklık ve basınç kontrol edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresinin ve kullanılan çözücü miktarının büyük oranda az olmasıdır. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir [57-59].

Mikrodalga, çözücü ve matrikslerin dielektrik duyarlılığına bağlıdır. Yüksek dielektrik sabiti ile bağlantılı olarak nemli örneklerde daha iyi geri dönüşüm elde edilmektedir. Kuru örneğin ekstraksiyondan önce nemlendirilmesi sonucunda, matriks kendiliğinden mikrodalga ile etkileşebilmekte ve ısınma işleminin kolay olmasına olanak sağlamaktadır. Mikrodalga ekstraksiyonda çözücü ve bitki matriksleri arasındaki ilişkiden yararlanılarak ve ekstraktın çözünürlüğü göz önüne alınarak çözücü seçimi gerçekleştirilir ve sonuç itibarıyla çözücünün dielektrik sabitine bağlı olarak mikrodalga tarafından absorbe edilir. Çözücünün dielektrik sabiti ile mikrodalga ekstraksiyonu arasında bir ilişki var olup, genellikle yüksek dielektrik sabitine sahip çözücüler mikrodalga enerji tarafından daha iyi absorbe edildikleri için tercih edilir. Etanol, metanol ve su gibi etkin polar çözücüler mikrodalga ile daha ısıtılabilir olmaktadır [53].

Hekzan ve toluen gibi polar olmayan ve düşük dielektrik sabitine sahip çözücüler mikrodalga ekstraksiyonu için çok uygun olmamaktadırlar. Klasik çözücü ekstraksiyonunda ürün miktarını arttırmak için katı matriksler çözücü içerisine tamamen batırılırken, mikrodalga ekstraksiyonda çözücü miktarının artırılması ekstraksiyon verimini, mikrodalga ile çözücünün yeterince etkileşememesine bağlı olarak azaltmaktadır. Sıcaklığın artırılması ile ekstraksiyon veriminin arttığı fakat ısıya duyarlı bileşiklerin yıkımında da etkili olduğu belirtilmiştir. Ekstraksiyon zamanının ve kullanılan çözücü miktarının azaltılması, ekstraksiyon veriminin iyileştirilebilmesi, basit ve ucuz bir proses olması bu metodun avantajları olmaktadır. Bununla birlikte katı atıkların giderilmesi için filtreleme ve santifürüj gerekmesi, apolar ve uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili bir yöntem olmaması dezavantaj olarak belirtilebilir [53].

2.4.4. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, 50-200 °C sıcaklık ve 10-15 MPa basınç aralıklarında gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyon tekniğidir. Bu yönüyle hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu basınçlı çözücü ekstraksiyonunun bir türü olmakla birlikte süperkritik akışkan ekstraksiyonuna da oldukça benzemektedir [58,60]. Ekstraksiyon yüksek sıcaklıklarda ve basınç altında çözücünün sıvı fazda olduğu şartlarda gerçekleşmektedir ve ekstraksiyon esnasında çözücü kritik şartların

altındadır. Ekstraksiyon sıcaklığının artırılması ile ekstraksiyon kinetiği arttırılmakta ve yüksek basınç ile çözücü sıvı fazda tutularak güvenli ve hızlı ekstraksiyon gerçekleştirilebilmektedir. Basınç sıvı ile ekstraksiyon hücresindeki katı matriks ile sıvının güçlü bir şekilde etkileşmesine olanak vermektedir. Sıcaklığın artırılması çözücünün difüzyonunu arttırmakta ve bunun sonucunda ekstraksiyon kinetiği artmaktadır. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, yüksek sıcaklıkta kararlı organik kirleticilerin ekstraksiyonunda oldukça kullanılmaktadır.

Karbondioksit ve su gibi toksik olmayan, ekonomik ve çevresel çözücülerin bu teknikte kullanılması, polar bileşiklerin ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi ve klasik çözücü ekstraksiyonu ile kıyaslandığında çözücü kullanımının oldukça düşük olması bu tekniğin avantajları olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen prosesden dolayı ısıya duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun bir ekstraksiyon tekniği olmamaktadır [53].

2.4.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, bileşenlerin ana yapıdan ayrılması esnasında çözücü olarak süperkritik akışkanın kullanıldığı metottur. Son yıllarda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu gitgide artan ilgi ile bilinen ekstraksiyon metotlarına karşı ilginç alternatif bir metot olarak dikkat çekmektedir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, su buharı destilasyonu, Soxhlet, sıvı ekstraksiyon ve sıvı kromatografisi gibi diğer ekstraksiyon yöntemleri ile gerçekleştirilemeyen pek çok uygulamayı sağlayan yeni bir yöntem olarak sunulmaktadır.

2.4.5.1. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Avantajları

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, sahip olduğu birtakım avantajlar nedeniyle klasik çözücü ekstraksiyon metotlarının yerini almaktadır, bu avantajlar sıralayacak olursak;

1. Süperkritik akışkanlar difüzyon katsayılarının yüksek ve viskozitelerinin düşük olmasından dolayı normal akışkanlara göre katılara daha hızlı nüfuz edebilmektedir. Yüksek difüzyon katsayısı gözeneklerdeki kütle aktarım dirençlerinin azalmasına neden olmaktadır. Bunun yanında süperkritik karbondioksit düşük yüzey gerilimine sahip olduğundan gözenekli katılara daha iyi nüfuz etmekte

ve küttele aktarım hızındaki artış ekstraksiyon süresinin kısılmasına ve diğer ekstraksiyon metotlarına göre işlemin daha kısa sürede gerçekleşmesine olanak vermektedir.

2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, ekstraksiyon kolonunun akışkan tarafından sürekli beslenmesi, ekstraksiyon işlemi esnasında sürükleyici kuvvetin gitgide artmasına ve bunun sonucu küttele aktarım hızının artmasına sebep olur.

3. Süperkritik akışkanların çözme güçleri basınç ve sıcaklık üzerinde yapılan bir takım değişiklikler ile değişmektedir. Başta yoğunluk olmak üzere diğer değişkenlerin değişmesi ile ürün seçiciliği ve verimliliği etkilenmektedir. Çözme gücündeki bu değişikliğin kontrol edilebilir olması süperkritik akışkan kromatografisi ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu uygulamaları için önemli avantajlar oluşturmaktadır.

4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerin inert olması, bu şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde hidroliz, oksidasyon veya degradasyon tepkimelerinin önüne geçmektedir.

5. Klasik çözücü ekstraksiyonu uygulamalarında harcanan çözücü miktarına göre süperkritik şartlarda minimum düzeyde çözücü harcanması ve ana çözücü olarak karbondioksit kullanılması çevreye duyarlılık açısından çok daha iyi proses oluşturmaktadır.

6. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile prosesler sonunda, basıncın düşürülmesi akışkan ve çözünen madde birbirinden ayrılmasına olanak vermekte ve bunun sonucunda üründe çözücü kalıntısı kalmamakta ve yeni bir saflaştırma işlemine gereksinim duyulmamaktadır.

7. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile termal yönden hassas olan bileşikler ekstrakte edilebilir ve saflaştırılabilir.

8. Ticari olarak değerli olan ve düşük miktarlarda bulunan doğal bileşiklerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında süperkritik akışkan ekstraksiyonu etkili bir proses olmaktadır.

9. Süperkritik akışkan sistemi, kromatografik analiz cihazlarına doğrudan bağlanabilir ve elde edilen ekstraktın analizi aynı proses içinde gerçekleştirilebilir.

10. Klasik çözücü ekstraksiyon uygulamalarında çalışılacak numune miktarı 20-100 g arasında değişirken, süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminde 0,1-1,5 g aralığında numune miktarları ile bile çalışılabilmektedir.

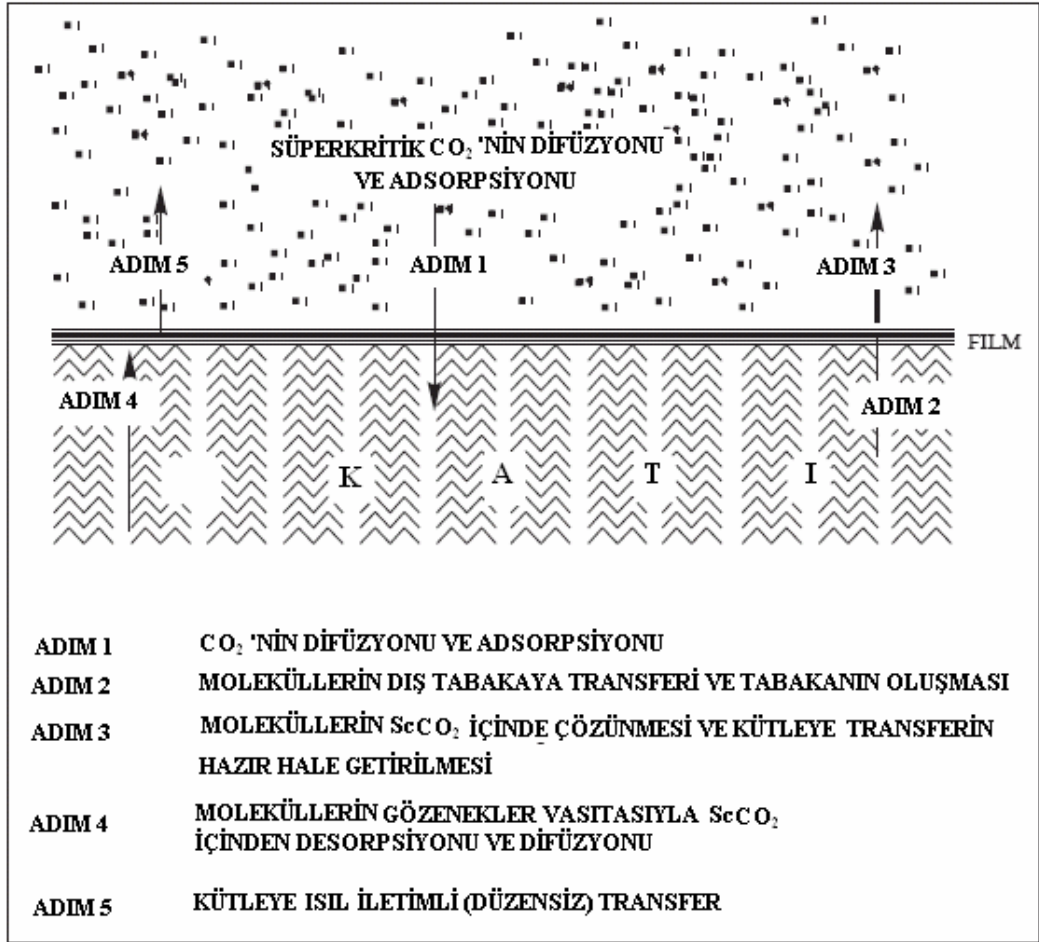
11. Süperkritik akışkan ekstraksiyon uygulama sistemi farklı ölçeklere göre değişiklik gösterebilmektedir. Analitik ölçeklere (gram mertebesinde madde miktarı), pilot fabrika ölçeklere (kilogram mertebesinde) ve endüstriyel ölçeklere (ton mertebesinde madde miktarı) uygulanabilmektedir [50,56].

2.4.5.2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun dezavantajları

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılacak çözücü seçimi uygulama alanına göre ve ekstrakte edilecek bileşenin yapısına göre değişiklik göstermektedir. Birçok polar maddenin ekstraksiyonunda su ve N_2O tercih edilmesi gereken çözücü olması gerekirken suyun kritik sıcaklığının yüksek olması ve N_2O 'nun toksik özellik göstermesi bu çözücülerin süperkritik akışkan olarak kullanılmasında dezavantaj oluşturmaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu prosesinin yüksek basınçlarda gerçekleşmesinden dolayı yatırım maliyeti ve enerji gereksinimleri yüksek olmakta ve dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Karbondioksit tüplerinde mevcut olan %1-2 oranındaki oksijen içeriğinin antioksidantlar gibi oksijene hassas bileşikler ile reaksiyona girip onların yapısını bozması bir diğer dezavantaj olarak nitelendirilebilir [50].

2.4.5.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonun Mekanizması

Akışkan CO_2 ile katı matriks seçilen süperkritik şartlarda etkileşime girdiği zaman, kütle transferi çözünenin desorpsiyonu ile süperkritik akışkanın adsorpsiyon ve difüzyonunu içermektedir[39]. Ekstraksiyon prosesi bu belirtilen bir takım mekanizmalar üzerinden yürümektedir. Bu mekanizma Şekil 2.25'de gösterilmiştir.



Şekil 2.25. Süperkritik akışkanların katılardan transfer mekanizması [39]

Ekstraksiyon başlangıcından itibaren ardı ardına ve birbirine paralel olarak meydana gelen olaylar irdenelirse;

1. CO₂'nin gözenek içine difüzyonu ve katı yüzey üzerinde adsorpsiyonu
2. Moleküllerin dış tabakaya taşınımı ve katı parçacıklar etrafında ince sıvı film oluşumu
3. Moleküllerin sc-CO₂ içinde çözünmesi
4. Akışkanın kütlesine ısıl iletimli transfer
5. Çözünenin katıdan veya gözenekli yüzeyden desorpsiyonu
6. Çözünenin sc-CO₂ içinde çözünmesi
7. Çözünenin gözenekler içinde difüzyonu
8. Akışkanın kütlesine düzensiz durumda ısıl iletimli transfer

şeklinde belirtilebilir.

2.4.5.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu verimliliğini etkileyen değişkenler

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu verimliliğini bir takım deneysel değişkenler etkilemektedir. Bu deneysel değişkenler akışkanın özellikleri, çözünenin özellikleri, katının özellikleri, dinamik faktörler ve örnek hazırlanması şeklinde sıralanabilir. Bu değişkenler alt başlıklar halinde sıralayacak olursak[40];

Akışkanın Özellikleri

- ◆ Akışkanın doğası (Polarite)
- ◆ Basınç (Yoğunluk)
- ◆ Sıcaklık
- ◆ Modifierin varlığı ve derişimi
- ◆ Akışkanın toplam hacmi

Çözünenin özellikleri

- ◆ Analitin tipi (buhar basıncı, polarite, moleköl ağırlığı)
- ◆ Konsantrasyon

Katının Özellikleri

- ◆ Numune boyutu
- ◆ Partiköl boyutu
- ◆ Matriksin doğası (Polarite-yardımcı çözücü ile matriks arasındaki bağ)
- ◆ Ortamda hazır bulunan diğér ekstrakte edilebilecek maddeler
- ◆ Numune şartları (nem-yağ oranı- pH)
- ◆ Kapsüllenme oranı

Dinamik faktörler

- ◆ Ekstraksiyon zamanı
- ◆ Akış hızı
- ◆ Ekstraksiyon hücresi (boyut-geometri-boşluk hacmi-karışım)

Örnek Hazırlanması

- ◆ Reaktifin, çözücülerin, sıvıların eklenmesi
 - ◆ Katıların eklenmesi
- şeklinde belirtilebilir.

2.4.5.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunda yardımcı çözücü kullanılması

Süperkritik akışkanlar içinde karbondioksit kritik sıcaklık ve kritik basıncının ($T_c = 31.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $P_c = 73.8 \text{ bar}$) uygulanabilir koşullarda olması, yanıcı özellik göstermemesi, zehirli olmaması, yüksek saflıkta kullanılabilmesi ve maliyetinin yüksek olmamasından dolayı süperkritik akışkanlar içinde en çok tercih edilen akışkanların başında gelmektedir. Karbondioksit apolar yapısından dolayı hidrokarbonlar gibi apolar bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun bir çözücü özelliği gösterirken, alkoller, esterler, aldehitler ve ketonlar gibi polar özellik gösteren yapıların ekstraksiyonu için çok uygun olmamaktadır. Bunun yanısıra polar bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılacak akışkan olarak süperkritik su ve süperkritik nitroz oksit ön plana çıkmaktadır. Bu iki çözücü incelendiğinde nitroz oksitin kritik sıcaklık ve basıncı uygulanabilir aralıkta olmasına rağmen zehirli etki göstermesi nedeniyle, su ise yüksek kritik sıcaklık ve basınca sahip olması ($T_c = 374 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $P_c = 220 \text{ atm}$), prosesin korozif etkiden dolayı zarar görmesi ve ısıya duyarlı bileşiklerin ekstrakte edilememesi nedeniyle dezavantajlı olmaktadır.

Polar bileşiklerin süperkritik akışkan ile ekstraksiyonuna olanak sağlamak için etkin bir metot olan yardımcı çözücü kullanımı ön plana çıkmaktadır. Yardımcı çözücülerin seçimi ve kullanılacak miktarının ayarlanması süperkritik akışkanın özelliklerini kolayca değiştirebilmektedir. Süperkritik akışkana yardımcı çözücü eklenmesi iki farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. İlkinde yardımcı hücre içindeki numune üzerine damlatma yöntemi ile damlatılır, ikincisinde ise bir pompa vasıtasıyla akışkan ile belirli mol oranlarında karıştırılarak numuneye gönderilir. Çoğu zaman çok az miktarlarda kullanılan yardımcı çözücü ilavesi ekstraksiyon verimini yükseltilebilmekte ve proses zamanını azaltabilmektedir. Doğal bileşiklerin süperkritik akışkan ekstraksiyonu için pek çok yardımcı çözücü ile çalışılmaktadır. Bu yardımcı çözücüler arasında metanol yüksek polarlıkta olması ve karbondioksit ile iyi bir karışım oluşturması nedeniyle en çok kullanılan yardımcı çözücü olmaktadır. Kullanılan metanol yüzdesinin çok fazla olmasının bitki matrisleri ve çözünen arasındaki ilişkiyi bozabileceği ileri sürülmektedir. Etanol de polar yapısı ve minimum düzeydeki toksik etkisinden dolayı doğal bileşiklerin eldesinde ve özellikle gıda uygulamalarında sık kullanılan bir yardımcı çözücü olmaktadır [61].

Ticari olarak kahveden kafeinin uzaklaştırılması işleminde su süperkritik

karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır [62]. Bir yardımcı çözücünün en önemli etkisi çözünürlük gücünü arttırmaktır ve bunun sebebi olarak çözücünün yoğunluğunun artması ve/veya çözücü-çözünen arasındaki ilişkiden kaynaklanır. Yardımcı çözücünün kullanılmasıyla, yardımcı çözücü ile karışımdaki bileşenler arasındaki spesifik ilişkiden yararlanılarak seçicilik ve ayırma gerçekleştirilebilir. Spesifik uygulamalarda, yardımcı çözücü eklenmesinin çözünürlük davranışına etkisi, kütle transferi ve işlemin ekonomikliği açısından yardımcı çözücü seçimini çok iyi anlamak gerekmektedir. Çözücü yoğunluğunun artması ve moleküllerarası etkileşim yardımcı çözücünün en önemli faktörleri olarak tespit edilmiştir. Çok bileşenli sistemlerde çözünürlük seçici veya seçici olmayan uygulamalarda artırılabilir. Bu uygulamalarda seçiciliğin geliştirilmesi için çözücü karışımlarının yoğunluğu artırılarak çözünürlük artırılır. Yardımcı çözücü etkisinde, yardımcı çözücü ile çözücü arasındaki moleküllerarası bağlar tespit edilirse, örneğin H bağları, seçicilik ve çözünürlüğün ikisi birden artırılabilir [63]. Çözücü yoğunluğunun artmasına yardımcı çözücünün etkisi, yardımcı çözücü eklenmesi ile yüksek yoğunluğa sahip yardımcı çözücünün ve süperkritik moleküllerin yardımcı çözücü etrafında kümelenmesinin etkisi olduğu şeklinde açıklanmaktadır. Süperkritik akışkanların daha fazla kümelenmeleri ve yardımcı çözücü ile çözücü karışımlarının yoğunlukları arasındaki farklılıktan dolayı kritik noktaya yakın bölgelerde yoğunluğun artacağı belirlenmiştir. Süperkritik akışkan karışımı ve süperkritik akışkan arasındaki bu yoğunluk farklılığı basınç ile azaltılabilir ve sonuçta süperkritik akışkan yoğunluğundaki artış ve kümelenme basınç azaltılarak giderilebilir [64]. Bunun yanı sıra eklenen bir yardımcı çözücü, (bir hidrokarbon ile yüksek hacme sahip olan oktan) çözücünün molar yoğunluğunu düşürmesine rağmen süperkritik akışkanın çözme gücünü artırabilir. Yardımcı çözücü etkisi ile yoğunluk ve moleküllerarası ilişkiler arasındaki farklılığa katkıda bulunmak için çözücü karışımının yoğunluğu belirlenmelidir. Çözücü karışımlarının yoğunlukları birtakım eşitlikler kullanılarak hesaplanabilmektedir [65-67].

Çözücü ve yardımcı çözücü arasındaki fiziksel etkileşimler örneğin, dipol-dipol, dipol-indirgenmiş dipol veya indirgenmiş dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri ile hidrojen bağı ve yük transfer kompleksleri gibi spesifik etkileşimler yardımcı çözücü etkisine katkı sağlamaktadır. Bu yüzden yardımcı çözücü etkisini

kesin olarak yorumlamak için çözünen ve çözücü ile ilgili moleküllerarası etkileşimlerin bilinmesi gerekmektedir. Çözücüler, kimyasal yapıları ile bağlantılı olarak fiziksel sabitlerinden yararlanılarak, spesifik çözücü-çözünen etkileşimleri ve asit-baz davranışları irdelenerek karakterize edilebilirler [68]. Deneysel çözücü parametreleri, örneğin Kamlet-Taft çözücü parametreleri, H-bağı verici (donör- α) ve H-bağı alıcı (akseptör- β)'lerin çözücülerin çift kutuplu / kutuplanabilirlik (π^* -polarlanabilirlik) ve genel çözücü polaritelerinin ayrı ayrı katkıları belirtilerek kullanılabilir [69-70].

Molekülün simetrik yapısından dolayı, karbondioksit net bir dipol momente sahip değildir fakat dört kutuplu bir yapısı vardır. CO₂'in polarlanabilirliği 2.74×10^{-30} m³'dür. Karbondioksitin asit-baz etkileşimleri pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Kamlet-Taft çözücü parametreleri süperkritik karbondioksitin karakterizasyonu için kullanılmaktadır. Spesifik moleküllerarası etkileşimler, örneğin H-bağları ve yardımcı çözücü ile çözücü arasında oluşan yük transfer kompleksleri yardımcı çözücü etkisine önemli katkılar yapmakta, seçicilik ve ayırma işlemlerinde kullanılmaktadır. H-bağları bir donör ve akseptör ilişkisidir ve spesifik olarak H-bağ donör ve akseptör atomlar gereklidir. H-bağı elektronegatif olan ve hidrojen kabul eden A ile A-H kovalent bağı oluşturur. Donör A-H bağı ile etkileşime girmek için, akseptör olan B'nin yalın halde bir çift elektrona ya da polarize olabilen π elektrona sahip olması gerekir. Fonksiyonel gruplar hem donör hem akseptör olarak (örneğin su, alkol ve karboksilli asitlerdeki OH) ya da sadece akseptör (örneğin karboksilik asit, keton ve esterdeki C=O) veya sadece donör olarak davranabilmektedir. Doğada ve kimyadaki çoğu hidrojen bağı, orta dereceli H bağıdır ve bunlar nötür donörler ile -OH ve C=O gibi akseptör gruplar arasında oluşur [71]. Hidrojen bağı süperkritik metanol [72], etanol [72-73] ve suda oluşmaktadır. Süperkritik sistemlerde çözünen -yardımcı çözücü, yardımcı çözücü-çözücü arasındaki ilişkilerden oluşan hidrojen bağlarının varlığı kanıtlanmıştır. Döteryumla işaretlenmiş metanol-*d*'nin H-bağı, metanol-*d*-CO₂ arasındaki zayıf komplekslerin oluşumu, dört kutuplu dipol etkileşimlerden dolayı süperkritik CO₂-metanol-*d* karışımı arasında gözlemlenmiştir [74]. Çözücü özelliklerine ek olarak, çözünenin özellikleri ile ilgili bilgi sahibi olmak için yardımcı çözücü sistemindeki moleküllerarası etkileşimleri iyi anlamak gerekmektedir.

2.5. TAKSANLARIN ELDE EDİLMESİ İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Guénard ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda klasik çözücü ekstraksiyonu ile *Taxus baccata* L.'nin iğne yapraklarından % 0.02 oranında alınan 10-deasetilbakatin III miktarını % 0.1 oranına çıkarıp, 1 kg yapraktan 1 g 10-deasetilbakatin III izole etmeyi başarmışlardır [75].

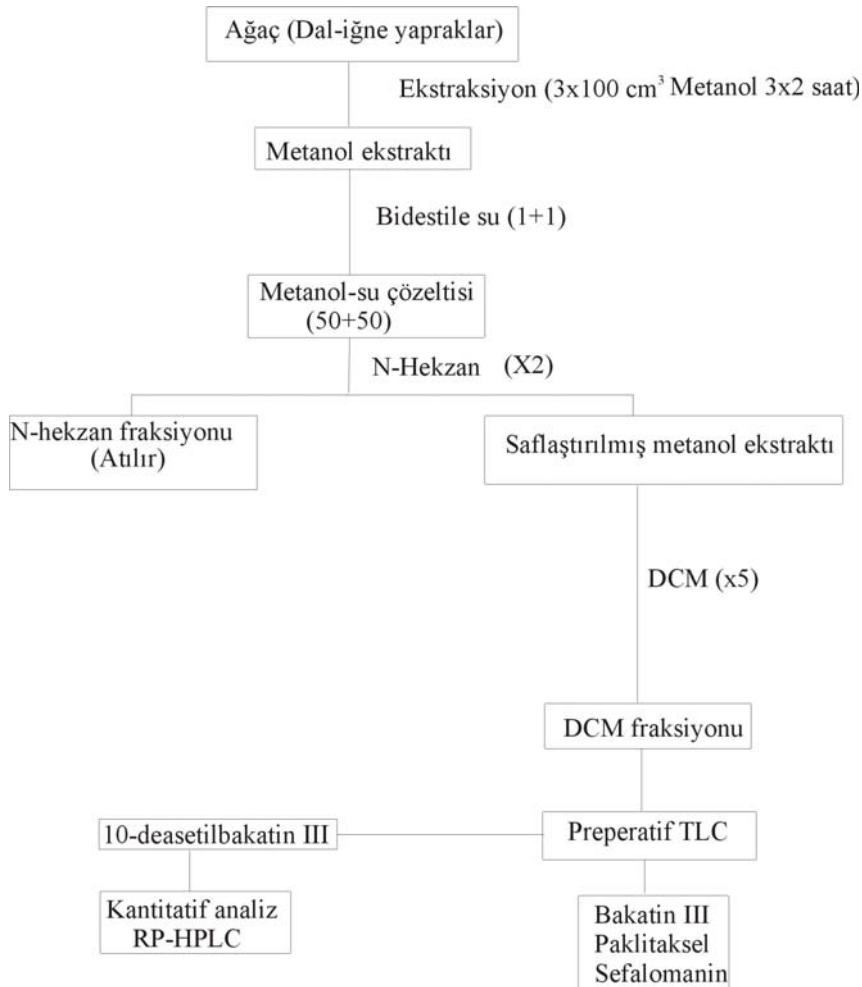
Talebi ve ark. Mikrodalga ekstraksiyon tekniğini kullanarak 95 °C sıcaklıkta 15 dakikalık ekstraksiyon süresinde % 90'lık metanolden 20 ml kullanarak *Taxus baccata* L.'nin yapraklarından 59 mg/kg Paklitaksel elde etmişler ve % 87 oranında geri dönüşüm sağlamışlardır aynı çalışmada oda sıcaklığında gerçekleştirdikleri klasik ekstraksiyon metodu ile, 150 ml metanol kullanarak 17 saatlik işlem sonucunda 62 mg/kg Paklitaksel elde etmişlerdir [76].

Mrocze k ve ark. katı-faz ekstraksiyon metodunu yöntemi ile % 30 metanol kullanarak *Taxus baccata* var. iğne yapraklarından % 0.0566 ve dallarından % 0.0695 oranında 10-deasetilbakatin III elde etmişlerdir [77].

Kukuchi ve ark. sıvı karbondioksitin çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyonda, *Taxus cuspidata*'dan 50 kgf/cm² CO₂ ile 40 °C sıcaklıkta 2 saat ekstraksiyon süresi sonunda ağırlıkça % 0.02 oranında Paklitaksel, % 0.04 oranında bakatin III ve % 0.04 oranında 10-deasetilbakatin III bileşimini ekstrakte etmişlerdir. Aynı çalışmada sıcaklık ve ekstraksiyon değiştirilmeden karbondioksitin polaritesini arttırmak amacıyla metanol kullanılmış ve CO₂ +metanol karışımı ile yapılan ekstraksiyon sonucunda ağırlıkça % 0.05 oranında paklitaksel, % 0.04 oranında bakatin III ve % 0.17 oranında 10-deasetilbakatin III ekstrakte etmişlerdir. Çalışmanın üçüncü aşamasında çözücü olarak metanol kullanılarak oda sıcaklığında 24 saat boyunca gerçekleştirilen ekstraksiyon süresi sonunda % 0.03 oranında paklitaksel, % 0.05 oranında bakatin III ve % 0.06 oranında 10-deasetilbakatin III ekstrakte etmişlerdir [78].

Vandana ve ark. süperkritik nitroz oksiti ana çözücü olarak kullandıkları çalışmada, *Taxus brevifolia*'nin dal kısımlarından paklitakselin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. 331.9 K sıcaklık ve 34.76 MPa basınç altında gerçekleştirilen deney sonucunda 24.2 mg/kg paklitaksel ekstrakte etmişlerdir. Aynı çalışmanın ikinci aşamasında süperkritik nitroz oksit ile etanol belirli yüzdelerde karıştırılarak farklı sıcaklık ve basınçlarda işlem gerçekleştirilmiştir. 320.6 K sıcaklık ve 10.45 MPa basınçta % 6.3 mol etanolün yardımcı çözücü kullanılması ile 24.4 mg/kg paklitaksel elde edilirken bu değer 330.8 K sıcaklık, 34.34 MPa basınçta % 10.5 etanol kullanımı ile 159.56 mg/kg değerine ulaşmıştır [79].

Glowniak ve ark. aşağıdaki şemada belirtilen klasik çözücü ekstraksiyon metodunu kullanarak *Taxus baccata* L.'nin dal ve yaprak kısımlarını ekstrakte etmişlerdir.



Ekstraksiyon sonucunda *Taxus baccata* L.'nin dal kısımlarından 302.2 mg/kg 10-deasetilbakatin III, 45.7 mg/kg bakatin III ile 12.7 mg/kg paklitaksel ve 7.9 mg/kg sefalomannin elde etmişlerdir. Ağacın iğne yaprakları kullanıldığında ekstraksiyon sonucu 145.9 mg/kg 10-desasetilbakatin III, 37.2 mg/kg bakatin III , 12.9 mg/kg paklitaksel ve 34.6 mg/kg oranında sefalomanin elde edilmiştir [80].

Kawamura ve ark. *Taxus cuspidata*'nın kabuk kısımlarını hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction) metodunu kullanarak 10.13 MPa basınç ve değişken sıcaklık aralığında 15 dakika boyunca ekstrakte etmişlerdir. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda bu metot ile bitkiden geri kazanımın 160 °C sıcaklığa kadar artış gösterdiği bu sıcaklıktan 200 °C sıcaklığa kadar ise geri kazanımda düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde ekstrakte edilen madde miktarında da 160 °C sıcaklığa kadar artış bundan sonraki sıcaklıklarda ise bir azalma olduğu belirtilmiştir. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda metanol, etanol, izopropil alkol, asetonitril, etil asetat, diklorometan, benzen, aseton ve su çözücü olarak kullanılmış ve paklitakselin geri kazanımı için en iyi çözücünün metanol olduğu tespit edilmiştir. Klasik çözücü ile ekstraksiyon metodunda ekstraksiyon süresinin uzun olması nedeniyle yüksek sıcaklıklarda çalışılmasından kaçınılırken, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda bu sürenin kısa olması ve yüksek sıcaklıklarda çalışılabilmesi, ayrıca bitkiden ekstrakte edilen paklitaksel miktarında klasik ekstraksiyon metoduna göre 50 kat ve ısıtılmış su ekstraksiyonuna göre 5 kat daha iyi sonuç vermesi metodun avantajları arasında gösterilmiştir [81].

Nguyen ve ark. *Taxus cuspidata*'dan hücre kültürü yöntemini kullanarak 4 hafta sonunda paklitaksel miktarını 0-149 µg/L, 10-deasetilbakatin III miktarını 0-1.9 mg/L ve bakatin III miktarını 0-583 µg/L düzeyine çıkarmışlardır [82].

Chun ve ark. *Taxus cuspidata*'nın yapraklarını süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile ekstrakte etmişlerdir. 308 K sıcaklık ve 300 bar basınçta, 4 saatlik ekstraksiyon süresi sonunda paklitaksel kütlece % 0.262 ve aynı ekstraksiyon süresi ve basınçta 323 K sıcaklıkta bakatin III kütlece % 0.644 oranında elde edilmiştir [83].

Vandana ve ark. Paklitakselin çözünürlüğünü süperkritik karbondioksit ve süperkritik nitröz oksit ortamında araştırmışlardır. Karbondioksitin ve nitröz oksitin çözücü olarak seçilmelerinin nedeni kritik sıcaklıklarının normal koşullarda olması ve bu çözücülerin polaritelerinin birbirinden oldukça farklı olması olarak belirtilmiştir. Paklitakselin süperkritik karbondioksit ortamındaki çözünürlüğü 311.1, 322.2 ve 328.9 K sıcaklıklarda ve 14.12-34.62 MPa basınç aralıklarında ölçülmüş ve maksimum çözünürlüğün 329 K ve 34.6 MPa'da 5.67×10^{-6} mol fraksiyon olduğu tespit edilmiştir. Aynı maddenin süperkritik nitröz oksitteki çözünürlüğü 326.2 K sıcaklıkta ve 14.03-27.72 MPa basınç aralığında ölçülmüş ve maksimum çözünürlük 7.41×10^{-6} mol fraksiyon olarak bulunmuştur. Paklitaksel, karbondioksite göre daha polar olan nitröz oksitte daha fazla çözüldüğü fakat nitröz oksitin zehirli olmasından dolayı karbondioksit kullanımının daha uygun olduğu tespit edilmiştir [84].

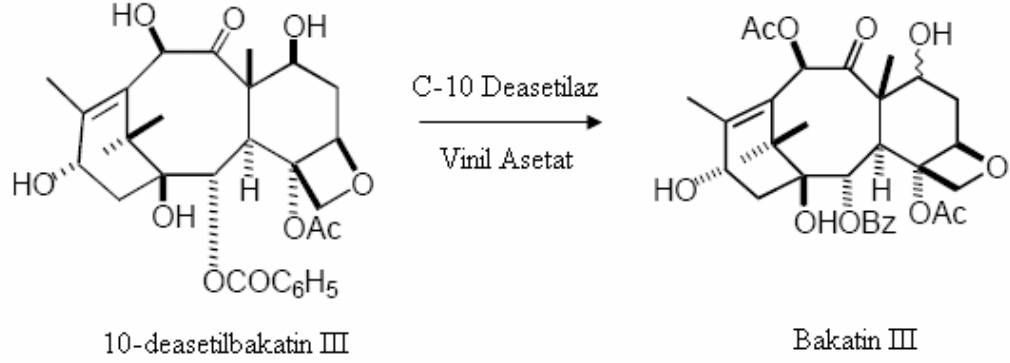
Son yıllarda Taksol'un biyosentezi hakkındaki bilgi ve araştırmaların artmasıyla bu yolla taksol üretiminde önemli gelişmeler sağlanmaktadır. Taksol'un elde edilmesi sadece Taksus türlerinden değil aynı zamanda endofit mantar *Taxomyces andreanae* ve Fusarium, Alternaria, Pithomyces ve diğer pek çok mantar türleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalarda *Taxus hicksii* en fazla tercih edilen mantar olmakta ve fermantasyon yolu ile 116 mg/L paklitaksel elde edilebilmektedir. Bunun yanı sıra bitki hücre kültürü ile paklitaksel elde etmeye çalışan bir çok araştırma grubu mevcuttur ve bir haftada 55 mg/L paklitaksel elde edilebilmektedir [31].

Saicic ve ark. etanol, diklorometan ve etilasetatin çözücü olarak kullanıldığı klasik çözücü ekstraksiyonu metodu ile *Taxus baccata*'nın yapraklarından 265 mg/kg oranında 10-deasetilbakatin III izole etmişlerdir [85].

Suffness ve ark. *Taxus brevifolia*'nın dal kısımlarını kullanarak klasik çözücü ekstraksiyonu ile % 0.014 oranında paklitaksel izole etmeyi başarmışlardır [86].

Patel ve ark. C-13 taksolaz ve C-10 deasetilaz enzimlerini içeren *Nocardioides luteus* SC 13913 mantar türünü kullanarak sefalomanin, 7- β -xylosyl 10-deasetiltaksol ve 10-deasetiltaksolün C-13 yan zincirinin bölünmesini ve bunun

10-deasetilbakatin III ile bakatin III'e dönüşümünü gerçekleştirmişlerdir. Taksol'ün yarı sentetik eldesi için 10-deasetilbakatin III 'ün bakatin III'e dönüşmesi gerekmektedir [87].



Mattina ve ark. Mikrodalga ekstraksiyon sistemini kullanarak, paklitaksel, sefalomanin ve 10-deasetilbakatin III'ün geri kazanımı üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada çözücü olarak metanol kullanıldığında her üç molekül için % 90 oranında geri kazanım elde etmişlerdir. Çözücü olarak %95'lik etanol kullanıldığı zaman paklitaksel ve 10-deasetilbakatin III için % 85 ve sefalomanin için %90 oranında, kloroformun çözücü olarak kullanıldığı deneylerde ise paklitaksel ve sefalomanin için % 40 ve 10-deasetilbakatin III için % 60 oranında geri kazanım elde etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda mikrodalga ekstraksiyon ile yapılan deneyler sonucu elde edilen geri dönüşüm değerlerinin klasik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen değerlere yakın olduğu ve bu metodun taksanların geri dönüşümü için yapılan ekstraksiyon deneyleri için uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir [88].

Witherup ve ark. Paklitaksel ve 10-deasetilbakatin III'ün ekstraksiyonu için *Taxus brevifolia*, *Taxus cuspidata*, *Taxus canadensis*, *Taxus media c.v* gibi farklı Taksus türleri ile çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda *Taxus canadensis*, *Taxus cuspidata*, ve *Taxus brevifolia*'da en fazla paklitaksel içeriği tespit edilmiştir. *Taxus brevifolia*'da kuru ağırlık olarak % 0.06, *Taxus canadensis*'de % 0.009, *Taxus cuspidata*'da % 0.008, *Taxus media cv. Densiflora*'de % 0.002 ve *Taxus media cv. Hicksii*'de % 0.001 oranında paklitaksel olduğu belirlenmiştir. *Taxus brevifolia*'da kuru ağırlık olarak % 0.01, *Taxus canadensis*'de % 0.002,

Taxus cuspidata'da % 0.002, *Taxus media* cv. *Densiformis*'de % 0.007 ve *Taxus media* cv. *Hicksii*'de % 0.009 oranında 10-deasetilbakatin III olduğu belirlenmiştir [89].

Theodoridis ve ark. İmmunoaffinity kromatografi tekniğini kullanarak 10-deasetilbakatin III'ü 0.4-32 µg/ml miktarlarında kullanarak HPLC ile ayırmaya çalışmışlar ve %69 ve % 82 arasında değişen bir geri dönüşüm elde etmişlerdir [90].

Verpoorte ve ark. Taksus hücre kültürlerini kullanarak taksan elde edilmesinde, HPLC analizleri için farklı tiplerde katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniklerini kullanmışlar ve paklitaksel ile 10-deasetilbakatin III'ü analiz etmişlerdir. SPE ile yapılan çalışmalar sonucunda farklı SPE modelleri kullanıldığında 10-deasetilbakatin III için % 45-105 ve paklitaksel için %65-105 aralığında değişim gerçekleştiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda taksanların geri kazanımı için 50 µm partikül boyutunda, 60 °A poroziteye sahip C-8 ve C-18 kartuşların en iyi performansı gösterdikleri belirtilmiştir [91].

Heaton ve ark. süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunu kullanarak *Taxus baccata* L.'nin iğne yapraklarını, 400 atm. basınç, 50 °C sıcaklık ve 15-105 dakika zaman aralıklarında % 10 metanolü yardımcı çözücü olarak kullanıp ekstrakte etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda, klasik çözücü ekstraksiyonu ile 800 mg/kg oranında elde edilen taksisin, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile yukarıda belirtilen şartlarda 666 mg/kg oranında elde edilmiştir. Aynı çalışmanın devamı olarak Taksisin I ve Taksisin II bileşiklerinin süperkritik akışkan kromatografisi ile ayırımı gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda polar nitril paket kolon ile daha iyi ayırım yapıldığı tespit edilmiştir [92].

Cao ve ark. yüksek hızda akım kromatografi metodunu kullanarak 10-deasetilbakatin III'ün ayrılmasını ve saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Ekstraktın kompleks bir karışım içerisinde olmasından dolayı iki aşamalı bir ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada n-hekzan-etil asetat-etanol-su (2:5:2:5 v/v), ikinci aşamada ise n-hekzan-kloroform-metanol-su (5:25:35:20 v/v) çözücü

sistemlerini kullanarak 254 nm’de, 2 ml/dk akış hızında analizler gerçekleştirmiş ve bu metodun taksanların ayrılması için uygun bir metot olduğu belirtilmiştir [93].

Suleiman ve ark. paklitakselin çözünürlüğünü süperkritik karbondioksit ortamında araştırmışlardır. Çözünürlük çaişmalarını 35, 45 ve 55 °C sıcaklık, 100-250 atm. basınç aralığında gerçekleştirmişler ve paklitakselin çözünürlüğünün $1,2- 5,9 \times 10^{-6}$ mol fraksiyon aralığında değiştiğini belirtmişlerdir [94].

Ballero ve ark. *Taxus baccata* L.’nin yapraklarındaki 10-deasetilbakatin III ve Taksin miktarlarını araştırmışlardır. Yaz sezonu boyunca İtalya’nın 11 farklı bölgesinden topladıkları numunelerin analizi sonucunda 10-deasetilbakatin III miktarının toplanan bölgeye göre değiştiğini ve 243-1665 mg/kg aralığında olduğunu, taksin miktarının ise 0-300 mg/kg aralığında olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte 10-deasetilbakatin III miktarının kuru yapraklarda 2 g/kg oranında olabileceğini belirtmişlerdir [95].

Wianowska ve ark. *Taxus baccata* L.’nin ince dallarını, ultrasonik ekstraksiyon, mikrodalga ekstraksiyon, soxhlet ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemlerini kullanarak ekstrakte etmişler ve bu metotları birbirlerine göre kıyaslamışlardır. Ekstraksiyon sonucu elde edilen taksanlar ve miktarları (mg/g) Çizelge 2.6’da belirtilmektedir.

Çizelge 2.6. Farklı Ekstraksiyon metotları ile elde edilen taksanlar

Ekstraksiyon metodu	10-DAB III	Sefalomanin	Paklitaksel
USE (20 °C)	0.1114	0.0795	0.0249
USE (60 °C)	0.1229	0.0755	0.0246
MDE (Kapalı)	0.0341	0.0181	0.0008
MDE (Açık)	0.1454	0.0429	0.0136
BSE (I)	0.1470	0.0831	0.0360
BSE (II)	0.1766	0.0890	0.0104
SE	0.2059	0.1175	0.0518

Yapılan çalışmanın diğer bir aşamasında basınçlı sıvı ekstraksiyonu için kullanılan çözücülerin taksan eldesindeki rolü araştırılmış ve kıyaslanmıştır. Çizelge 2.7’de kullanılan çözücüler ve elde edilen taksan miktarları belirtilmektedir [96].

Çizelge 2.7. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen taksanlar

Çözücü	10-DAB III	Sefalomanin	Paklitaksel
n-Hekzan	0.0051	0.0131	0.0030
Toluen	0.0607	0.0440	0.0206
Diklorometan	0.0777	0.0424	0.0201
Kloroform	0.0769	0.0349	0.0195
Etil Asetat	0.0742	0.0408	0.0238
n-propanol	0.0982	0.0646	0.0316
Metanol	0.1470	0.0831	0.0360
Su	0.0499	0.0477	0.0056

Pinol ve ark. bioreaktörde kültür yöntemini kullanarak *Taxus wallichiana*’dan paklitaksel ve bakatin III elde etmeye çalışmışlar ve 28 gün sonunda bioreaktörde 25.67 mg/L bakatin III ve 24 gün sonunda da 21.04 mg/L paklitaksel elde etmeyi başarmışlardır [97].

Omidi ve ark. hücre kültürü yöntemini kullanarak *Taxus baccata* L.’den paklitaksel elde etmeye çalışmışlar ve yapılan çalışmalar sonucunda maksimum 25.17 mg/L paklitaksel elde etmeyi başarmışlardır [98].

Hook ve ark. *Taxus baccata*’daki taksan içeriğinin sezonsal değişimleri ile ilgili çalışma yapmışlar. *Taxus baccata* var. *fastigiata* üzerinde yaptıkları çalışmada iğne yapraklarda maksimum 300 mg/kg, gövde kısımlarında ise 125 mg/kg oranında 10-deasetilbakatin III konsantrasyonuna ulaşmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda en düşük taksan alkaloidleri oranı 5.18 g/kg ile Ocak ayında ve maksimum 9.49 g/kg ile Ağustos ayında olduğu tespit edilmiştir. Paklitaksel miktarı için yapılan çalışmalarda maksimum paklitaksel oranına Şubat ve Nisan ayları arasında yapılan

harmanlama sonucunda ulaşılmış ve minimum 90 mg/kg ve maksimum 190 mg/kg oranında elde edilmiştir [99].

Nalensik ve ark. paklitakselin süperkritik karbondioksit ortamında çözünürlüğünü araştırmışlardır. 3000-7000 psi basınç ve 35-45 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilen deney sonunda paklitakselin çözünürlüğünün 0.7×10^{-7} - 5.0×10^{-7} mol fraksiyon aralığında değiştiğini belirlemişlerdir. Paklitakselin çözünürlük çalışmaları esnasında CO₂ yoğunluğu 818 g/K ve 1000 g/L aralığında değişmektedir [100].

Vesela ve ark. Avrupa'da topladıkları *Taxus baccata* L.'deki paklitaksel miktarını sezonsal değişime göre araştırmışlar ve bu oranın Şubat ayından Ekim ayına kadar olan periyotta % 0.002'den % 0.037'ye kadar değiştiğini belirtmişlerdir [101].

Nakajima ve ark. paklitakselin sudaki çözünürlüğünü siklodekstrinli ortamda incelemişlerdir. 11 farklı siklodekstrin kullanılarak yapılan çalışma sonucundamaksimum çözünürlük DM-β-CD (heptakis-2,6-di-O-metil)'nin kullanıldığı deneylerde 49 μM olarak belirlenmiştir. HP-β-CD ve dioksan kombinasyonu ile paklitakselin maksimum çözünürlüğüne (97 μM) ulaşılmıştır [102].

Gibson ve ark. *Taxus media* ve *Taxus brevifolia*'nın ham yapraklarını klasik çözücü ekstraksiyonu metodunu kullanarak ekstrakte etmişlerdir. Çözücü olarak toluen, diklorometan, etil eter, etil asetat, metanol ve etanol kullanılmıştır[103].

<u>İşlem</u>	<u>% Paklitaksel (<i>Taxus media</i>)</u>	<u><i>Taxus brevifolia</i></u>	<u>Paklitaksel(μg/g)</u>
Taze yaprak	0.005	(1) % 40 Etanol	361
Dondurulmuş kuru yaprak	0.015	(2) % 40 Etanol	182
% 100 Metanol	0.031		
% 50 Metanol	0.042		
C18-SPE	0.0324		
% 40 EtOH-C18-SPE	1.543		

Lou ve ark. katı faz ekstraksiyon tekniğini (SPE) kullanarak *T.cuspidata* ve *T. media*'dan taksanları izole etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda 10-DAB III *T.cuspidata* ve *T. media*'dan sırasıyla 46.16 ve 132 mg, paklitaksel ise 50.39 ve 51 mg oranında elde edilmiştir [104].

Jennings ve ark. yaptıkları çalışmalarda *Taxus brevifolia*'nın kabuk kısımlarındaki Taksol oranının 50-160 mg/kg aralığında değiştiğini belirlemişlerdir. Klasik çözücü ekstraksiyonunda etanol kullanarak % 0.125 oranında Taksol elde etmişlerdir fakat sc-CO₂ ile gerçekleştirilen ekstraksiyon deneyleri sonucu elde edilen ekstraktlar içindeki Taksol konsantrasyonu % 0.27 ile % 1.82 aralığında değişmektedir. Yapılan başlangıç çalışmalarında *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan elde edilen Taksol oranı % 0.016 iken bu oran 180-260 bar basınç aralığında ve 45 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen deneyler sonucunda 10 ile 100 kat arasında arttırılmıştır. sc-CO₂ ekstraksiyonunun etanol kullanılarak yapılan çözücü ekstraksiyonuna göre daha seçici olduğu belirtilmiştir. sc-CO₂ ekstraksiyonunda etanol kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda sadece CO₂ kullanılan deneylere göre iki kat daha fazla geri dönüşüm elde edilmiştir. Ekstraksiyon zamanı, basınç ve CO₂ ile karışan etanol konsantrasyonuna bağlı olarak *Taxus brevifolia*'nın kabuğundaki Taksol'ün % 50-85 oranında geri dönüşümü gerçekleştirilmiştir. (Çizelge 2.8) Genel olarak artan basınç, ekstraksiyon zamanı ve eklenen etanol miktarı polar olan Taksol'ün geri kazanımına etki etmektedir. scCO₂ ile % 3.6 oranında karıştırılan etanol ve 210 bar basınç, 45 °C sıcaklıkta %1.82 oranı ile maksimum verim elde edilmiştir [105].

Çizelge 2.8. Taksolün *Taxus brevifolia*'dan 45 °C 'da sc-CO₂ ve scCO₂+Etanol ortamında ekstraksiyonu [105]

sc-CO ₂ Basınç (bar)	İşlem	Ekstraktaki Taksol(%)	sc-CO ₂ +EtOH Basınç (bar)	İşlem	scCO ₂ 'deki Etanol (%)	Ekstraktaki Taksol(%)
257	1	-	257	1	1.3	0.271
257	2	0.865	257	2	2.0	0.861
257	3	1.137	257	3	2.5	1.645
257	4	0.663	257	4	2.4	1.541
213	1	0.579	257	5	2.8	1.185
213	2	0.838	208	1	0.7	0.335
213	3	1.131	208	2	3.4	0.976
183	1	0.431	208	3	3.9	1.719
183	2	0.618	208	4	3.6	1.822
183	3	0.918	208	5	3.8	1.682
183	4	0.891	181	1	0.2	0.371
			181	2	3.7	0.913
			181	3	5.7	1.559
			181	4	3.5	1.331
			181	5	4.8	1.051

2.6. TAKSANLARIN ANALİZİNDE KULLANILAN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER

Taksanların analizinde HPLC ve HPLC-MS kromatografik yöntemleri kullanılmaktadır.

2.6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözünmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografisi sistemlerine, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) denir. HPLC günümüzde analitik kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için kullanılmaktadır. Diğer kromatografik tekniklerle karakterizasyonu zor olan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygun olmaktadır. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız olan bileşiklerle, yüksek polariteye sahip bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayrılabilirler [106].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi;

- 1-Hareketli/ Taşıyıcı Faz Deposu
 - 2-Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa
 - 3-Enjeksiyon Birimi
 - 4-Ayırma Birimi ; Kolon
 - 5-Ölçüm Birimi; Dedektör
 - 6-Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör
 - 7-Atık Deposu
- birimlerinden oluşmaktadır.

Normal faz HPLC' de sabit faz olarak silikajel gibi polar dolgu maddesi, hareketli faz olarak ise n-hekzan veya tetrahidrofuran gibi apolar çözücüler kullanılır. Böylece polar örnekler sabit fazda daha çok tutunarak apolar bileşenlerinden ayrılır.

Ters faz HPLC' de sabit faz olarak hidrofobik apolar bir dolgu maddesi, hareketli faz olarak ise su ve metanol veya asetonitril gibi çözücü karışımları kullanılır. HPLC' nin tüm tiplerinde çözücü polaritesi en büyük rol oynar.

İki elüent tipi vardır: izokratik ve gradient. Birinci tipte aynı çözücü karışımı tüm analiz boyunca kolona pompalanır. İkinci tipte ise analiz boyunca çözücü bileşimi değişir.

HPLC, analitik, yarıpreparatif ya da preparatif amaçlı olarak kullanılır. Analitik amaçlı HPLC çok küçük miktardaki örneklerin ayrılmasında kullanılır. Ayırma örneğın bileşimi hakkında bilgi verir.

Yarı preparatif amaçlı HPLC genellikle 1– 100 mg' lık örneklerin son saflaştırılmasında kullanılır.

Preparatif amaçlı HPLC 5 – 200 cm çaplı kolonlarda yüksek miktardaki karışımların ayrılması için kullanılır [107-108].

Taksanların tanımlanması ve saflaştırılması için en çok kullanılan yöntem HPLC'dir. Genellikle fenil, siyano veya oktadesil bağılı kolonlarda metanol, asetonitril, diklorometan , su çözücü karışımlarının gradient veya izokratik elüsyonla uygulandığı ters faz HPLC, özellikle taksol, sefalomannin, bakatin III ve 10-deasetilbakatin III türevlerinin ayrılmasında başarılı olmuştur. Çizelge 2.9-2.11'de taksanların karakterizasyonunda analitik amaçlı kullanılan HPLC sistemleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.9. Taksanların karakterizasyonunda analitik amaçlı kullanılan HPLC sistemleri [107-108]

Kolon	Çözücü Sistemi	Elüsyon
Zorbax ODS (C ₁₈)	Asetonitril : Su	Gradient
Zorbax SB-CN (CN bağlı)	Asetonitril : Metanol	Gradient
Lichrosorb [®] RP ₁₈	Asetonitril:Metanol:Su (38 : 42 : 20)	İzokratik
Curosil B	Asetonitril : Su (2 : 3) % 0.05 formik asit	İzokratik
Techsphere (Fenil kolon)	Asetonitril: Su : Metanol : Tetrahidrofuran (37 : 63 : 20 : 2.5)	İzokratik
C ₁₈	Metanol : Su (68 : 32)	İzokratik
Fenil bağlı kolon	Asetonitril: Metanol:Su	Gradient
Fenil bağlı kolon	Metanol : Asetonitril : Amonyum asetat (20:32:48) (pH 4.4)	İzokratik
BioRad Bio-Sil C ₁₈ HL 90 – 10	Asetonitril : Metanol : % 1 Formik asit	Gradient
Nucleosil C ₁₈	Asetonitril:Su (pH 2.5)	Gradient
Hypersil C ₁₈	Asetonitril:Su	Gradient
Shandon Hypercarb (Poröz grafitize karbon kolon)	1,4-Dioksan : Su (46 : 54)	İzokratik
Zorbax SB-C ₈	Asetonitril:Metanol:Su	Gradient
Taxil (Pentaflorofenil), Supercosil (Difenil) ve Curosil G	A)Alkol:Tetrahidrofuran: Metil- t-butil eter (50 : 30 : 20) B) Alkol:Su (6 : 94) C) Asetonitril (% 100)	Gradient (A, B ve C karışımı)
1) Nova-Pak [®] C ₁₈ 2) Symmetry [™] C ₁₈	1 ve 2 için Asetonitril : Su : THF (23 : 77 : 0.05)	İzokratik
Scherisorb C ₁₈	Asetonitril: Metanol: Su (25 : 35 : 45)	İzokratik
Taxil [™] ve Taxol [™]	Asetonitril: 10 mM Sodyumasetat (47.5 : 52.5)	İzokratik
Dynamax phenyl	Metanol: 50 mM asetat tamponu : Asetonitril (20: 41: 39) (pH 4.4)	İzokratik
Separon-SGX-RP/S	Asetonitril: 20 mM Fosforik asit	Gradient
Curosil G	10 mM Asetat tamponu: Asetonitril (56 : 44) (pH 4.0)	Gradient

Çizelge 2.10. Yarıpreparatif amaçlı kullanılan HPLC sistemleri [107-108]

Kolon	Çözücü Sistemi	Elüsyon
Lichrosorb [®] RP-18	Asetonitril: Metanol: Su (45 : 20 : 40)	İzokratik
Waters Deltapak C ₁₈	Asetonitril : Su (3 : 1)	İzokratik
Prep Nova- Pak [®]	Heptan: izo-Propanol : Trietilamin (90 : 10 : 0.1)	İzokratik

Çizelge 2.11. Preparatif amaçlı kullanılan HPLC sistemleri [107-108]

Kolon	Çözücü Sistemi	Elüsyon
Fenil bağlı kolon	Asetonitril Metanol: Su (44 : 10 : 46)	İzokratik
Waters Microporasil	Kloroform : Etanol (19 : 1)	İzokratik
Waters Pre-pak Bondapak C ₁₈	Asetonitril : Su (25 : 75)	İzokratik
Tessek- Praha SGX-Phenyl	Asetonitril:Metanol: Su	Gradient

2.6.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadırlar. İlk defa 1906 yılında elektronların varlığını kanıtlayarak Nobel ödülünü kazanan JJ Thomson 1913 yılında Neon'un Ne₂₀ ve Ne₂₂ olmak üzere iki izotopunun olduğunu göstererek kütle spektrometresinde ilk adımı atmıştır. Daha sonra Arthur J Dempster'in 1918 yılında elektron iyonizasyon ve termal iyonizasyon konusunda sağladığı ilerlemeler ve

Francis Aston'un 1920'li yıllarda izotoplar ve onların kütleleri üzerindeki çalışmaları ile kütle spektrometresinde gelişmeler kaydedilmiştir. Kütle spektrometresinin ticari amaçla kullanımı 1940'lı yıllarda başlamış, petrol ve kimya endüstrisinde kullanıma sunulmuştur. Holmes ve Morrell isimli araştırmacılar 1957 yılında ilk defa gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) kombinasyonunu oluşturmuşlardır [109-110]. Cihazın biyokimyada kullanımı 1956 yılında steroidlerin analizi ile başlamış, 1960'lı yıllarda peptid ve nükleosidlerin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi uçucu olmayan ve ısıya karşı dayanıksız olan bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılır. Sıvı faz kullanıldığı için yüksek ısı gerekmemektedir. "Thermospray", LC uygulamalarından biri olup yüklü damlacıklar yaratmak esasına dayanır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC)'den gelen kapiller tüpün ucu yüksek voltaj uygulanarak ısıtılır. Isıyı optimize etmek için de tüpün ucundan numune iyon kaynağına püskürtülerek gönderilir. "Thermospray" iyonların sıvı halden gaz hale dönüştürüldüğü iyon evaporasyon işlemi esasına dayanır. Bu teoriye göre damlacıklar + ve - yüklü iyonlar ile çözücü içermektedirler. Ancak iyonlardan birinin polaritesi daha baskındır. Aradaki fark ise net yüküdür. Fazla yükün damlanın yüzeyinde biriktiği varsayılmaktadır. Çözücü buharlaştıkça damlacığın küçülen çapına bağlı olarak yüzeyindeki elektrik alanı artar. Damlacık yeterince buharlaştığında damlacığın yüzeyinde biriken iyonlar yüzeyden ayrılır. İyon "spray" (püskürtme), "thermospray"e benzeyen daha yeni bir tekniktir. Isıya daha duyarlı bileşiklerin kütle spektrometreye gönderilmesine yarar. "Thermosprayden" farklılığı püskürtme yapabilmek için ısıya gereksinim duymaması ve atmosferik basınçta çalışmasıdır. "Thermospray" ise genellikle yüksek vakum altında çalışır ve yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyar [109, 111,112].

Sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometresinde iyon üretmek için birtakım teknikler kullanılmaktadır.(Çizelge 2.12) Bu teknikler Electrospray iyonizasyon (ESI), Atmosferik basınç foto iyonizasyon (APPI) ve Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) olarak belirtilebilir [113]. ESI, sıvı kromatografisi-kütle spektrometresinde kullanılan iyonlaştırma teknikleri arasında, şarjlı iyon sayısının artmasına olanak vererek kütle aralığını genişletmesi, en iyi duyarlılığı göstermesi,

makromoleküllerden iyon üretilmesi esnasında ortaya çıkan fragmentlerin oluşmasını engellemesi nedeniyle en çok kullanılan teknik olmaktadır.(Şekil 2.26) Biyolojik makromoleküllerin analizinde ESI tekniğinin geliştirilmesinden dolayı 2002 yılında John Bennett Fenn'e Nobel Kimya Ödülü verilmiştir.

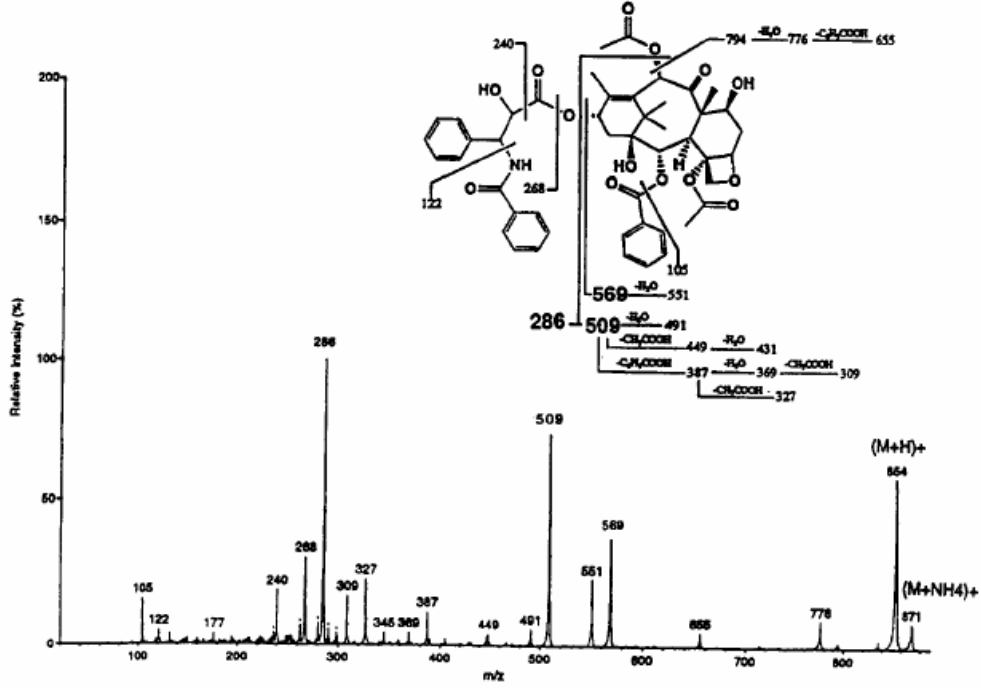
Çizelge 2.12. Kütle Spektrometresinde iyon kaynakları [114]

İyon Kaynakları

<u>İyon Kaynağının Türü</u>	<u>İyon Kaynağının ismi</u>	<u>İyonlaştırıcı Ajan</u>
Gaz Fazı	Elektron İmpakt (EI)	Yüksek Enerjili Elektronlar
	Kimyasal İyonlaştırma (CI)	Reaktif gaz iyonları
Desorpsiyon	Alan İyonizasyonu	Yüksek potansiyelli elektrod
	Alan Desopsiyonu	Yüksek potansiyelli elektrod
	“Electrospray” iyonizasyon (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks destekli desorpsiyon iyonizasyon(MALDI)	Laser Kaynağı
Hızlı bombardımanı	Atom	Atomik Enerji
	“Thermospray” iyonizasyon (TS)	Yüksek Isı

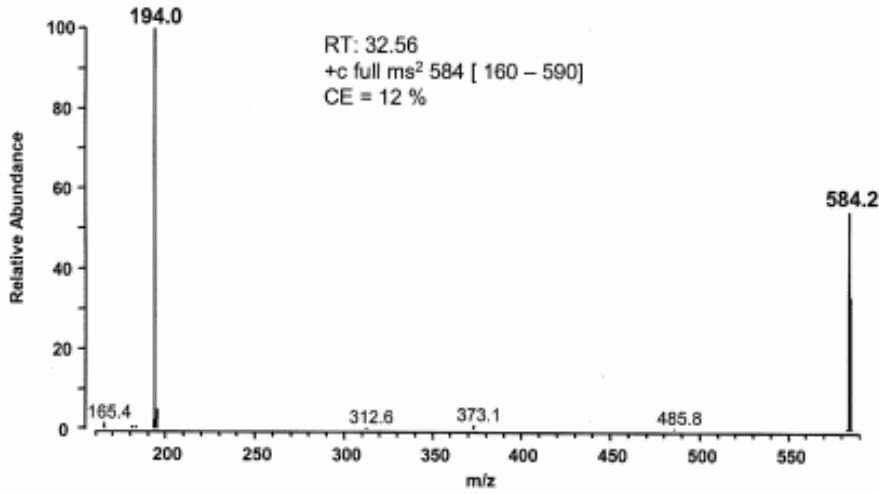
ESI geniş bir kullanım alanına sahiptir ve uçucu olmayan moleküllerin sıvı fazdan doğrudan analizine olanak sağlamaktadır. ESI;

- Biomoleküllerin kütlelerinin tespit edilmesinde
- Ardışık sıralanan proteinlerin ve nükleotitlerin analizinde
- İlaçların, pestisitlerin ve karbonhidratların analizinde
- Uzun zincirli yağ asitlerinin analizinde, kullanılmaktadır.



Şekil 2.27. Paklitaksel'in LC-MS kromatogramı[116]

Paklitakselin geçici yapısı, degradasyon sonucu elde edilen ürünlerin kütlelerinin belirlenmesi ile elde edilebilmektedir. Buna göre m/z 569 ve paklitaksel yan zincirini belirten m/z 286 iyonları yapının tanımlanmasına olanak sağlamaktadırlar [115-116]. *Taxus* alkaloidlerinden olan ve *Taxus baccata* L'nin içerğinde bulunan Taksin B molekülünün LC-MS spektrumu Şekil 2.28'de gösterilmiştir.



Şekil 2.28. Taksin B LC-MS Kromatogramı[115]

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

Taxus baccata L.'den Soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile taksanların elde edilmesinde kullanılan kimyasal maddelerin ne amaçla kullanıldığı, nereden temin edildiği ve saflık dereceleri aşağıda belirtilmiştir.

10-deasetilbakatin III (C₂₉H₃₆O₁₀): HPLC analizlerinde standart madde olarak kullanılmıştır. Sigma-Aldrich[®] firmasından (CAS-No: 32981-86-5) temin edilmiştir. % 95 saflıktadır.

Paklitaksel (C₄₇H₅₁NO₁₄): HPLC analizlerinde standart madde olarak kullanılmıştır. Sigma-Aldrich[®] firmasından (CAS-No: 33069-62-4) temin edilmiştir. % 95 saflıktadır.

Bakatin III (C₃₁H₃₈O₁₁): HPLC analizlerinde standart madde olarak kullanılmıştır. Sigma-Aldrich[®] firmasından (CAS-No: 27548-93-2) temin edilmiştir. % 95 saflıktadır.

Sefalomanin (C₄₅H₅₃NO₁₄): HPLC analizlerinde standart madde olarak kullanılmıştır. Sigma-Aldrich[®] firmasından (CAS-No: 71610-00-9) temin edilmiştir. % 97 saflıktadır.

Metanol (CH₃OH): Kromatografik analizler için ters faz HPLC'de mobil faz olarak, Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü, ultrasonik ekstraksiyonda çözücü ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck[®] firmasından (CAS-No: 67-56-1) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Etanol (C₂H₅OH): Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü, ultrasonik ekstraksiyonda çözücü ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. JT.Baker[®] firmasından (CAS-No: 64-17-5) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Diklorometan (CH₂Cl₂): Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda ekstraktın toplandığı çözücü olarak kullanılmıştır. JT.Baker[®] firmasından (CAS-No: 75-09-2) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Asetonitril (CH₃CN): Kromatografik analizler için ters faz HPLC’de mobil faz olarak, soxhlet ekstraksiyonunda çözücü, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck[®] firmasından (CAS-No: 75-05-8) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Tetrahidrofuran (C₄H₈O): Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck[®] firmasından (CAS-No: 109-99-9) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Dimetilsülfoksit (C₂H₆OS): Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck[®] firmasından (CAS-No: 67-68-5) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Etilen Glikol (C₂H₄(OH)₂): Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck[®] firmasından (CAS-No: 107-21-1) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Aseton (C₃H₆O): Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck[®] firmasından (CAS-No: 67-64-1) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Petrol Eteri: Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. JT Baker[®] firmasından (CAS-No: 8032-32-4) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Etil Asetat (C₄H₈O₂): Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 141-78-6) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

2-propanol (C₃H₇OH): Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 67-63-0) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

n-Hekzan (C₆H₁₄): *Taxus baccata* L.'den apolar bileşikler ve yağları uzaklaştırmak için ekstraksiyonda çözücü olarak kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 110-54-3) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Karbondioksit (CO₂): Süperkritik karbondioksit ortamını sağlamak amacıyla ekstraksiyon hücresinde kullanılmıştır. BOS (Linde Gaz) firmasından temin edilmiş olup % 99 saflıktadır.

Naylon Membran Filtre

Numunelerin HPLC analizinden önce filtrelenmesi işleminde kullanılır. Whatman firmasından temin edilmiştir ve 0.45 µm gözenek boyutundadır.

Deniz kumu

Ekstraksiyon hücresinde bitki ile frit arasına tampon olarak kullanılmıştır. Partikül boyutu 0.1-0.3 mm arasında değişmektedir, Merck firmasından temin edilmiştir.

Rotary Evaporatörü

Soxhlet ekstraksiyonu sonucu, çözücünün uzaklaştırılması işleminde kullanılmıştır.

Heidolph marka döner buharlaştırıcı kullanılmıştır.

Terazi

Bitkinin tartım işlemleri Metler-Toledo analitik terazi ile yapılmıştır.

Yüksek Basınç Pompası

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda ekstraksiyon basıncın sağlanması amacıyla şırınga tipi ISCO 260 D marka yüksek basınç pompası kullanılmıştır.

Fırın

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığının sağlanması amacıyla Teknosem marka programlanabilir fırın kullanılmıştır.

Ultrasonik Banyo

Taxus baccata L.'nin ultrasonik ekstraksiyonu işlemleri Bandelix Sonorex marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Soxhlet Aparatı

Taxus baccata L.'nin Soxhlet ekstraksiyonu 45/40 boyutunda NS marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Selülozik Yüksük

Soxhlet ekstraksiyonunda 28x80 mm boyutunda selülozik kağıt kullanılmıştır. Macherey-Nagel firmasından temin edilmiştir.

Doğrayıcı

Bitkinin yapraklarının küçük parçalara ayrılması işleminde King marka doğrayıcı kullanılmıştır.

Havan

Bitkinin toz haline getirilmesi işleminde kullanılmıştır. Doğa Lmt.Şti.'den temin edilmiştir.

Moleküler elek

Bitkinin farklı partikül boyutlarına getirilmesi için FRITSCH marka moleküler elek kullanılmıştır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Ekstraksiyon ürünlerinin karektarizasyonunu belirlemek amacıyla yapılan kromatografik ölçümler, Perkin Elmer Series 200 marka yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaz izokratik pompa sistemi, yürütücü haznesi, enjeksiyon bölümü, oktadimetilsilil grupları (ODS-2-C18) tutturulmuş 5 µm'lik silika parçacıkları içeren (250x4.6 mm)

paslanmaz kolon, UV-DAD dedektör ve sinyallerin kaydedildiği bir bilgisayar sisteminden oluşmaktadır.

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu sonucu elde edilen maddelerin karakterizasyonunu belirlemek amacıyla Agilent 1100 MSD (TÜBİTAK ATAL) marka sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi cihazı kullanılmıştır.

HPLC kolonu

HPLC analizlerinde Phenomenex marka (25x4.6 mm- 5 µm) kolon ve LC-MS analizlerinde Waters Spherisorb S 50DS2 marka (25x4.6 mm- 5 µm) kolon kullanılmıştır.

3.2. METOT

Taxus baccata L. ağacının iğne yaprakları, Soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu metodu ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen taksanların ekstraksiyon verimleri karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarını dört başlık altında belirtilebilir.

- i) *Taxus baccata* L.'nin toplanması ve ekstraksiyona hazır hale getirilmesi
- ii) Ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi
- iii) Farklı ekstraksiyon metotlarının uygulanması
 - a. Soxhlet Ekstraksiyonu
 - b. Ultrasonik Ekstraksiyon
 - c. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
- iv) Ekstraksiyon verimlerinin karşılaştırılması

3.2.1. *Taxus baccata* L.'nin toplanması

Taxus baccata L. ağacının dal ve yaprak kısımları Haziran-Temmuz 2005 tarihlerinde Bursa Uludağ-Sarıalan mevkiinde toplanmıştır. Toplanan dal ve yaprak kısımları birbirinden ayrılarak tamamen kuruyuncaya kadar açık alanda yaklaşık 1 ay bekletilmiştir. Kuruyan yaprak kısımları önce doğrayıcıda öğütülerek daha sonra havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler moleküler elekte elenerek tanecik boyutlarına göre ayrılmıştır. Bitkinin apolar bileşikler ve yağlardan arındırılması için n-hekzan ile üç defa katı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilerek süperkritik karbondioksit ortamında, sokslet ve ultrasonik ortamda ekstrakte edilecek hale getirilmiştir.

3.2.2. Ekstraksiyon Şartlarının Belirlenmesi

Taxus baccata L.'nin iğne yapraklarından süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile taksanların ekstrakte edilmesi için optimum ekstraksiyon şartları belirlenmiştir. Ekstraksiyon verimi üzerine etki eden parametreler araştırılmıştır.

Sıcaklık, basınç, statik ve dinamik ekstraksiyon süresi, dinamik ekstraksiyon esnasında karbondioksit akış hızı, numunenin partikül boyutu, yardımcı çözücü kullanılması ve yardımcı çözücülerin ana çözücüye eklenmesi yöntemleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilecek deneylerde ekstraksiyon sıcaklığının 35-40 ve 45 °C sıcaklıkta, 100-400 atm basınç aralığında, 30 dakika statik ve 30 dakika dinamik ekstraksiyon sürelerinde, 0.5 ml/dk karbondioksit akış hızında, ≥ 100 μm partikül boyutunda ve yardımcı çözücülerin damlatma metodu kullanılarak 100 ile 200 μL hacminde, ikinci bir pompa kullanılarak ağırlıkça % 2-20 ağırlık oranlarında sisteme gönderilmesine karar verilmiştir. Yardımcı çözücü olarak damlatma sisteminde metanol, etanol, asetonitril, dimetilsülfoksit, tetrahidrofur, aseton, etil asetat, etilen glikol ve 2-propanol'un, ikinci bir pompa ile sisteme yardımcı çözücü olarak metanol ve etanol gönderilmesine karar verilmiştir.

Klasik çözücü ekstraksiyonu (Soxhlet) ile yapılacak deneylerde metanol, etanol ve petrol eterinin çözücü olarak kullanılmasına, ekstraksiyon süresinin 9 saat olmasına karar verilmiştir.

Ultrasonik ekstraksiyonda metanol ve etanolün çözücü olarak kullanılmasına, ekstraksiyon süresinin 5, 15, 30 ve 60 dakika olmasına ve ekstraksiyonun 25-35 ve 45 °C sıcaklıklarda gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

3.2.3. Farklı Ekstraksiyon Metotlarının Kullanılması

3.2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Taxus baccata L. ağacının iğne yaprakları soxhlet cihazı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. 100 μm tanecik boyutundaki örnekten 5 gr alınmış daha sonra bu örnek Şekil 3.1'de görüldüğü gibi selülozik yapı (yüksük) içine konularak saatte 2 devir yapacak şekilde 9 saat boyunca sırasıyla metanol, etanol ve petrol eteri ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonucu çözücüler rotary evaporatör ile uzaklaştırılmış ve örnek kromatografik analize hazır hale getirilmiştir. Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Soxhlet Ekstraksiyon Düzenegi

3.2.3.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

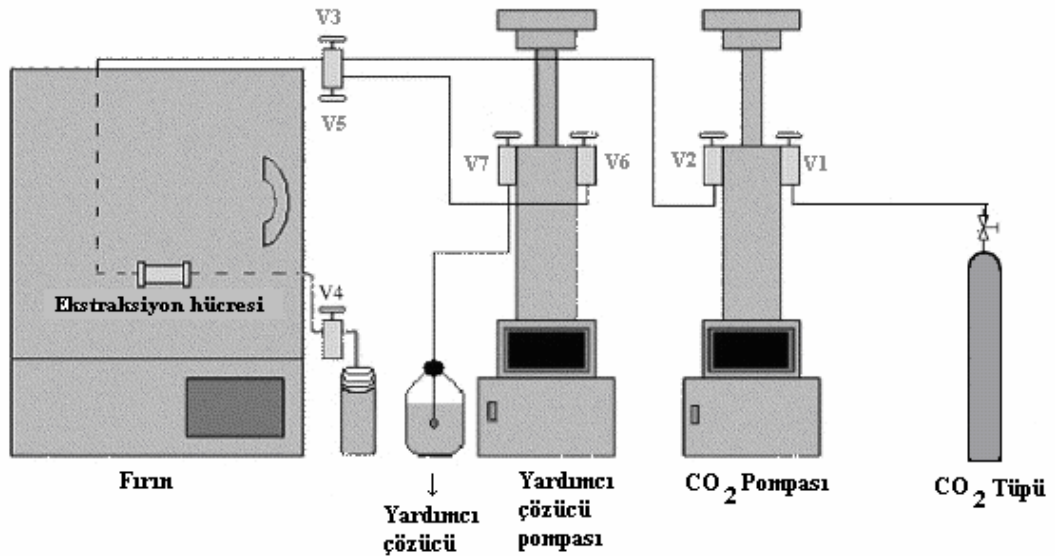
Taxus baccata L. ağacının iğne yaprakları ultrasonik banyo kullanılarak ekstrakte edilmiştir. 100 µm tanecik boyutundaki örnekten 3 gr alınmış daha sonra bu örneğe 20 ml çözücü (metanol ve etanol) eklenerek ultrasonik banyoda 25, 35 ve 45 °C sıcaklık 5, 15, 30 ve 60 dakikalık zaman aralığında ekstrakte edilmişlerdir. Taksanları içeren çözücü ile arta kalan katı özüt filtre kağıdı kullanarak birbirinden ayrılmış ve çözücü uzaklaştırılarak kromatografik analize hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.3 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu 50 mm × 4.6 mm (Agilent) ekstraksiyon hücresinde ISCO 260 D yüksek basınç pompası kullanılarak 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda 100, 200,300 ve 400 atm basınçlarda, 100 ve 200 µL yardımcı çözücü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilecek bitkinin yaprak kısımları çözücü madde etkileşimini arttırmak amacıyla doğrayıcı ve havan kullanılarak belirli boyutlara getirildikten sonra yapısında bulunan yağlardan ve apolar bileşiklerden arındırmak amacıyla n-hekzan çözücüsü ile katı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyona hazır hale getirilen bitkiden 0.3 gram tartılarak

deniz kumu ile karıştırıldıktan sonra sonra ekstraksiyon kolonu içerisine sabit bir yatak oluşturacak şekilde yerleştirilir. Kolon sc-CO₂ ile basınçlandırılır ve 30 dakika beklenir (statik ekstraksiyon). Daha sonra kolondan belli basınçta ve akış hızında 30 dakika boyunca sc-CO₂ geçirilir (dinamik ekstraksiyon). Kolon çıkışında basıncın düşürülmesiyle çözme gücünü kaybeden sc-CO₂ ve içinde çözülmüş olan katı birbirinden ayrılır.

Ana çözücü olarak kullanılan karbondioksitin apolar, hedeflenen bileşiklerin polar yapıya sahip olması nedeniyle karbondioksitin polaritesini arttırmak amacıyla polariteleri birbirinden farklı çözücüler yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Bu yardımcı çözücülerin fiziksel özellikleri Çizelge 3.1’ de belirtilmiştir. Ekstraksiyon esnasında 100 ve 200 µL yardımcı çözücü (metanol, etanol, asetonitril, etilen glikol, aseton, etil asetat, dimetilsülfoksit, tetrahidrofur, 2-propanol) damlatma yöntemiyle ekstraksiyon hücreğine eklenerek hücre kapatılmış ve ekstraksiyon 30 dakika statik ve 30 dakika dinamik ekstraksiyon sürelerinde 0.5 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Dinamik ekstraksiyon süresince ekstraksiyon ürünler 5 mL diklorometan (DCM) içerisine alınmış daha sonra çözücü azot (N₂) gazı ile uçurulup üzerine 300 µL metanol eklenerek HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir. Şekil 3.2’de süperkritik karbondioksit ekstraksiyon sisteminin şematik yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi

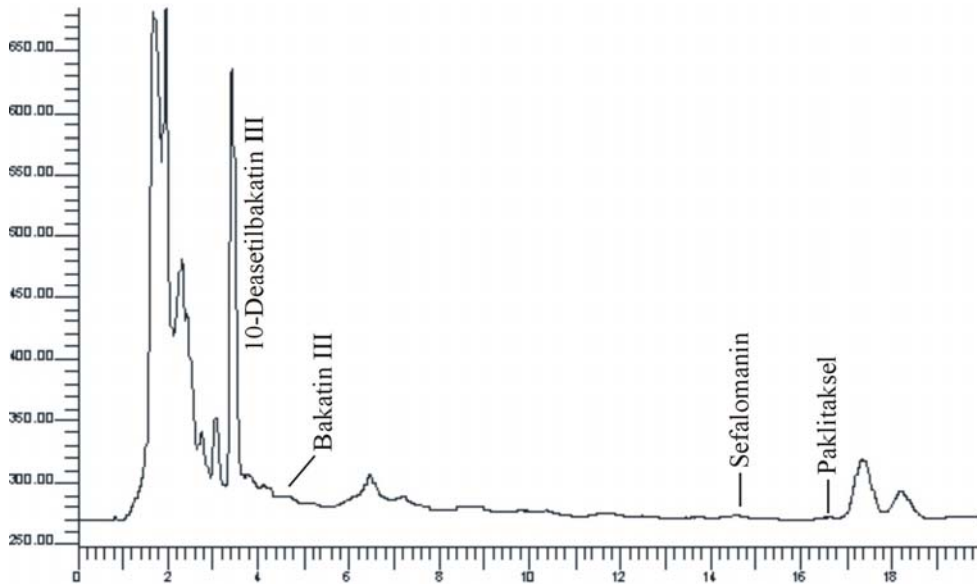
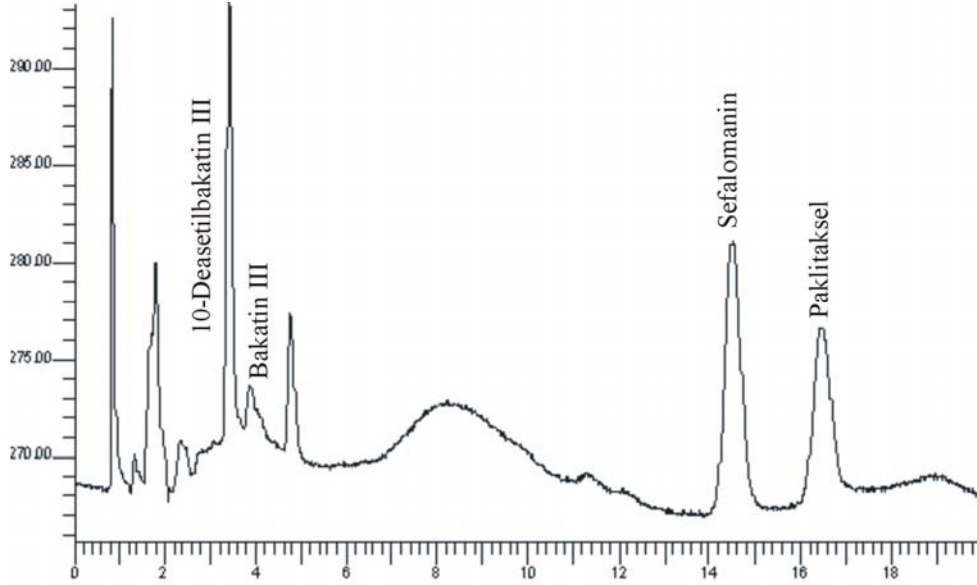
Çizelge 3.1. Süperkritik karbondioksit, soxhlet ve ultrasonik ekstraksiyonda kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri

Çözücü	Dielektrik Sabiti	Kaynama Noktası/ °C	Molekül formülü	Molekül Ağırlığı (g)	Yoğunluk (g/cm ³)
Metanol	32.6	65	CH ₃ OH	32.04	0.791
Etanol	24.5	78	C ₂ H ₅ OH	46.07	0.789
İzopropanol	25.2	82	C ₃ H ₇ OH	60.1	0.786
Etil Asetat	6.02	77	C ₄ H ₈ O ₂	88.10	0.89
Aseton	20.6	56	C ₃ H ₆ O	58.0	0.79
THF	7.58	66	C ₄ H ₈ O	72.11	0.88
Asetonitril	36.6	82	C ₂ H ₃ N	41.05	0.78
DMSO	47.2	189	C ₂ H ₆ OS	78.13	1.10
Etilen glikol	37.0	197	C ₂ H ₆ O ₂	62.06	1.11
Petrol Eteri	2.2	40-65	-	87-114	0.64

Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyonun ikinci aşamasında metanol ve etanol yardımcı çözücü olarak kullanılmış ve ikinci bir yüksek basınç pompası ile ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 20 oranlarında karbondioksit ile karıştırılarak 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda, 400 atm basınçta, ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Ekstraksiyon Ürünlerinin Karakterizasyonu

Taxus baccata L.'nin yukarıda belirtilen metotlar ile ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesinden sonra elde edilen ekstrakt 300 µL metanol içinde çözünerek ters-faz sıvı kromatografisinde analizi gerçekleştirilir. Paklitaksel, sefalomanin, bakatin III ve 10-deasetilbakatin III standartları metanolde çözünerek 2,5-40 mg/L aralığında standart çözeltileri hazırlanarak RP-HPLC'de 250 ×4,6 mm çapında ve 5 µm boyutunda HPLC kolonu kullanılarak mobil faz; 25:35:40 metanol-asetonitril-su karışımı, mobil faz akış hızı:1,4 ml/dk, Dalga Boyu: 227 nm'de DAD dedektörü ile analiz gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon deneyleri ve analizler 3 defa tekrarlanmıştır. Şekil 3.3' de taksanların standart ve ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktların analizi sonucu elde edilen kromatogramlar gösterilmiştir. Taksanların HPLC analizi sonucu çizilen kalibrasyon grafikleri ve elde edilen doğru denklemleri kullanılarak yapılan madde miktarı tayini hesaplamalarının özeti EK 1'de belirtilmiştir.



Şekil 3.3. Taksanların RP-HPLC kromatogramları

- i. Standartlar
- ii. 45 °C ve 400 atm'de gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu

Ekstraksiyon sonucu elde edilen taksanların karakterizasyonu için LC-MS kromatografik analiz yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktların LC-MS analizleri Agilent 1100 MSD cihazı (TÜBİTAK-ATAL) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz şartları ve kromatogramlar Ek 2'de belirtilmektedir. M/Z ($M-2OH^- + 2 Na^+$) 555.1 , ($M-H_2O$) 526.1 ve

(M-2H₂O-C₆H₅COOH-CH₃COOH)- 326 molekül ağırlıkları 10-deasetilbakatin III ve M/Z 584.1 ve 194.1 molekül ağırlıkları Taxicin B molekül yapısını belirtmektedir.

Elektrosprey iyonizasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilen analiz şartları Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. LC-MS analizleri sonucu elde edilen kromatogramlar Ek 2’de belirtilmiştir. Maksimum dalga boyunu tespit etmek için gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar Şekil 3.4’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Taksanların LC-MS Analiz koşulları

LC-MS Analiz Koşulları

Kolon: Waters Spherisorb S 50DS2 (250x 4.6 mm i.d)

Mobil Faz: A: % 0.1 Formik asit içeren 0.01 mM Asetik Asit

B: Metanol: Asetonitril: Su (25:35:40)

Gradyent Program:

<u>Zaman(dak)</u>	<u>% B</u>
0.0	25
40	100
60	25

Akış Hızı: 0.6 mL/dak.

Kolon Sıcaklığı: 40 °C

Dedektör/ λ_{max} : DAD -275.8 nm.

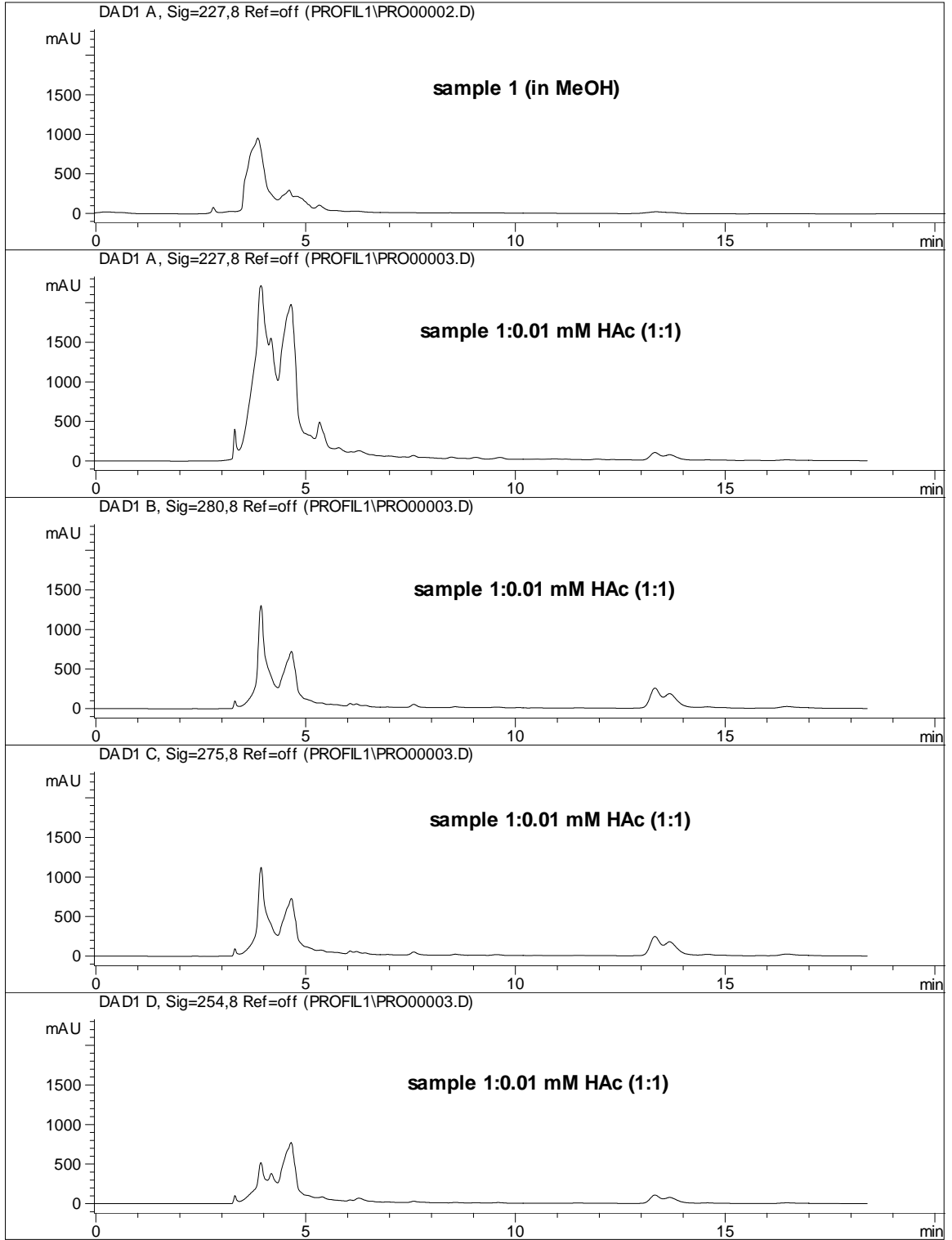
MS Dedektör: ESI 70 eV pozitif polarite

Kuru Gaz Akışı: 10 L/dak

Püskürtme Basıncı: 50 psig

Kuru Gaz sıcaklığı: 350 °C

Kapiler Voltaj: 3500 V (+), 3000 V(-)



Şekil 3.4. LC-MS Analizleri için maksimum dalga boyunun belirlenmesi

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

Taxus baccata L.'nin iğne yaprakları süperkritik karbondioksit, katı-sıvı ekstraksiyonu (Soxhlet) ve ultrasonik ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilerek paklitaksel (Taksol A), sefalomanin (Taksol B) ve paklitakselin yarı-sentetik olarak elde edilmesinde çıkış maddesi olarak kullanılan 10-deasetilbakatin III ve bakatin III bileşikleri ekstrakte edilmiş ve uygulanan ekstraksiyon yöntemleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

4.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Taxus baccata L.'nin iğne yaprakları soxhlet cihazı kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak metanol, etanol ve petrol eteri kullanılmıştır. 9 saatlik ekstraksiyon süresi sonunda elde edilen taksanların miktarları Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

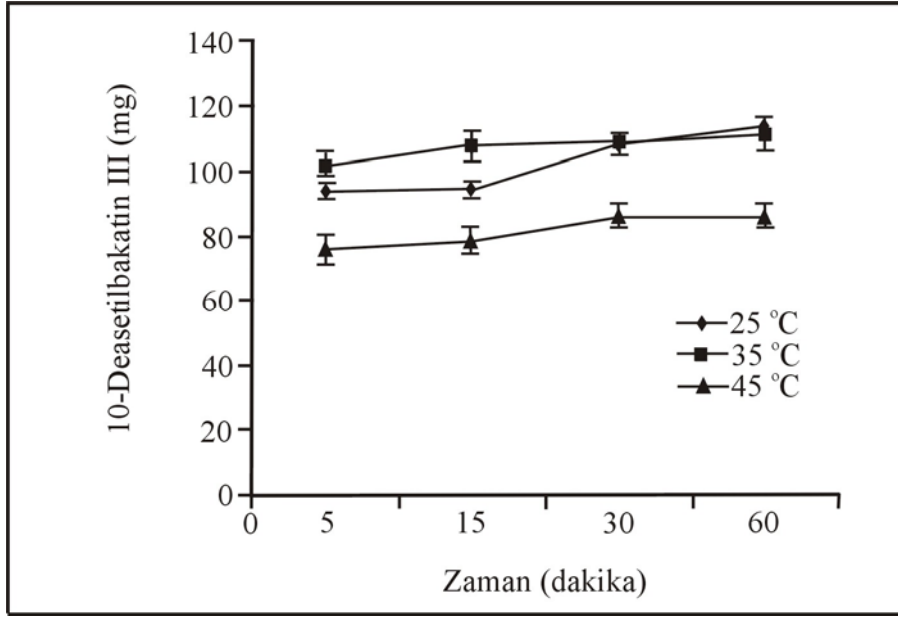
Çizelge 4.1. Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen taksanlar ve miktarları (% RSD)

<u>Taksan (mg/kg)</u>	<u>Metanol</u>	<u>Etanol</u>	<u>Petrol Eteri</u>
10-deasetilbakatin III	396 (25)	555 (11)	113 (12)
Paklitaksel	26 (18)	32 (23)	14 (25)
Sefalomanin	17 (32)	15 (18)	8 (13)
Bakatin III	26 (20)	28 (9)	7 (27)

Çizelge 4.1 incelendiği zaman, soxhlet cihazı kullanılarak gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyonu sonucunda, polar yapıda olan taksanların kazanılmasında metanol ve etanol, petrol eterine kıyasla daha iyi çözücü özelliği göstermişlerdir. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen taksanların miktarlarına bakıldığında *Taxus baccata* L.'nin iğne yapraklarında oldukça yüksek oranda bulunan 10-DAB III'ün ve diğer taksanların literatürde belirtilen değerlerle paralellik gösterdiği anlaşılmaktadır [31,75].

4.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

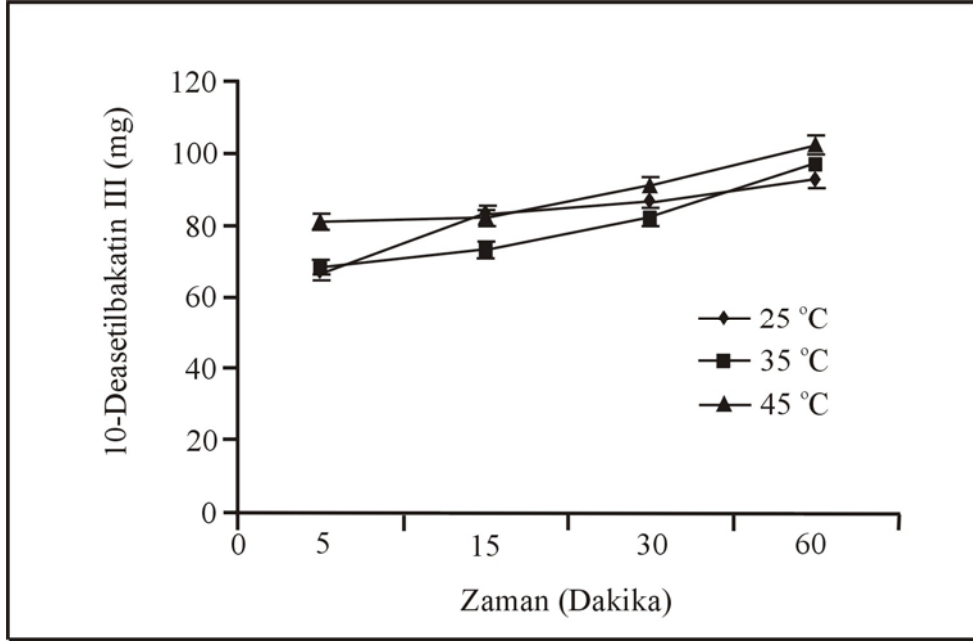
Taxus baccata L.'nin iğne yaprakları ultrasonik ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilmiştir. Çözücü olarak metanol ve etanol kullanılmıştır. Farklı sıcaklık ve ekstraksiyon süreleri sonunda elde edilen taksanların miktarları Şekil 4.1-4.8'de belirtilmiştir. Metanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen 10-deasetilbakatin III miktarı Şekil 4.1'de belirtilmiştir.



Şekil 4.1. USE'de metanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı

Metanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyonda 1 kg bitkiden elde edilen maksimum 10-deasetilbakatin III miktarı 35 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 111 mg olarak elde edilmiştir.

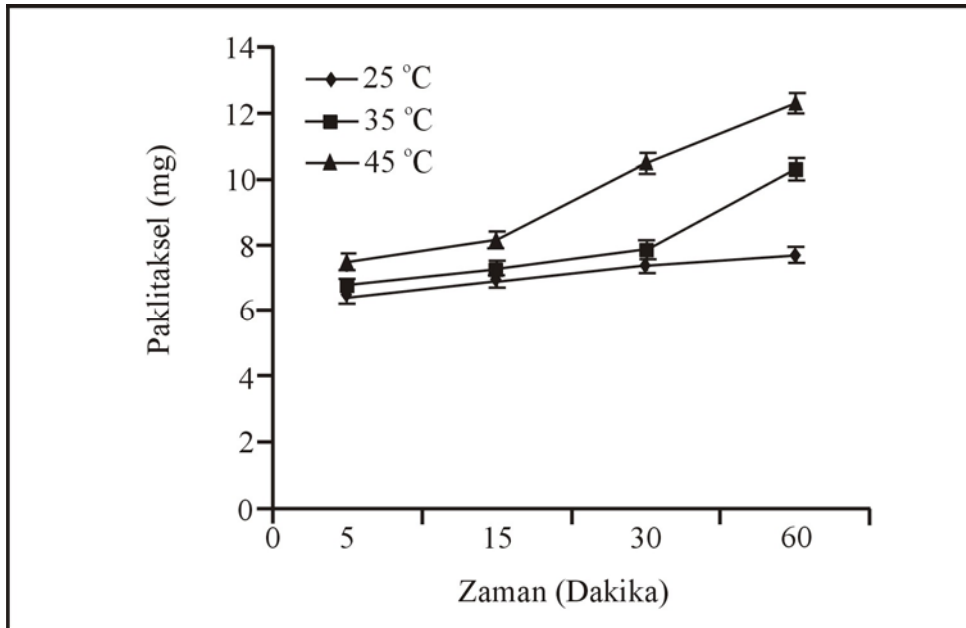
Şekil 4.2 etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen 10-deasetilbakatin III miktarını göstermektedir.



Şekil 4.2. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı

Etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyonda 1 kg bitkiden elde edilen maksimum 10-deasetilbakatin III miktarı 45 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 102 mg olarak elde edilmiştir.

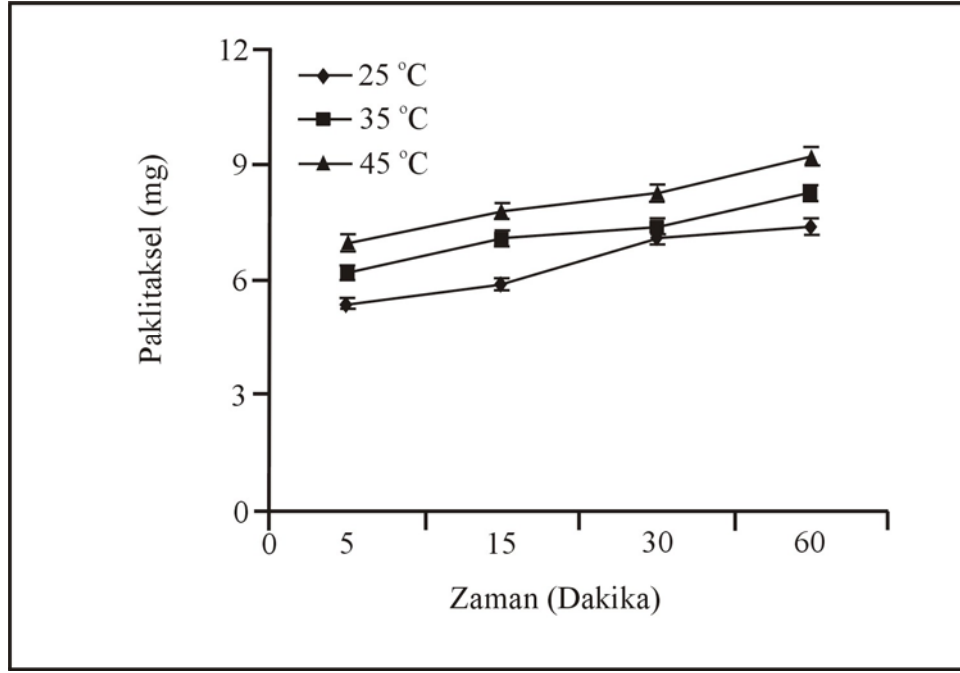
Metanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen paklitaksel miktarını Şekil 4.3’de gösterilmektedir.



Şekil 4.3. USE’de metanol kullanımı sonucu elde edilen paklitaksel miktarı

Metanolün çözücü olarak kullanıldığı USE’da 1 kg bitkiden elde edilen maksimum paklitaksel miktarı 45 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 12,3 mg olarak elde edilmiştir.

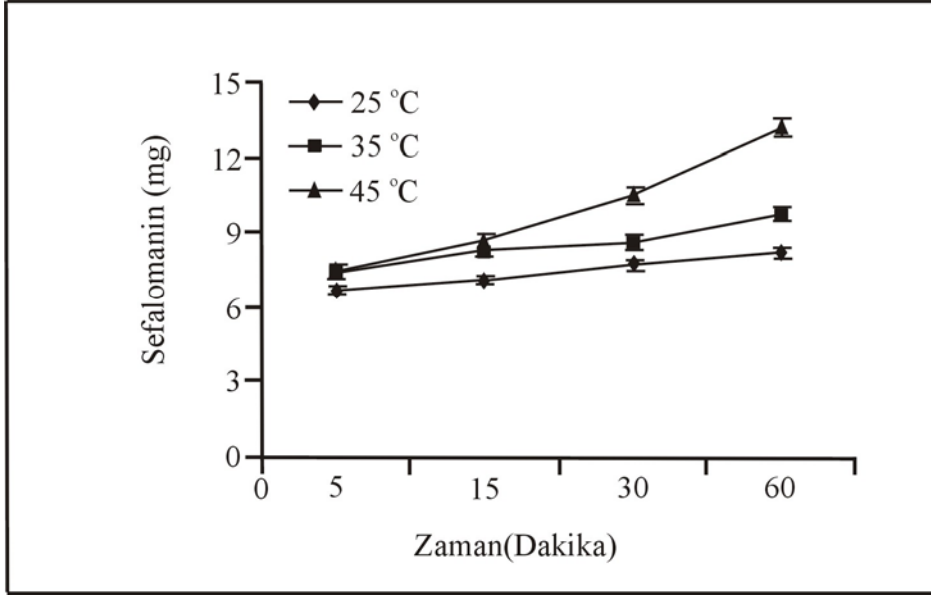
Şekil 4.4 etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen paklitaksel miktarını göstermektedir.



Şekil 4.4. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen paklitaksel miktarı

Etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyonda 1 kg bitkiden elde edilen maksimum paklitaksel miktarı 45 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 9,33 mg olarak elde edilmiştir.

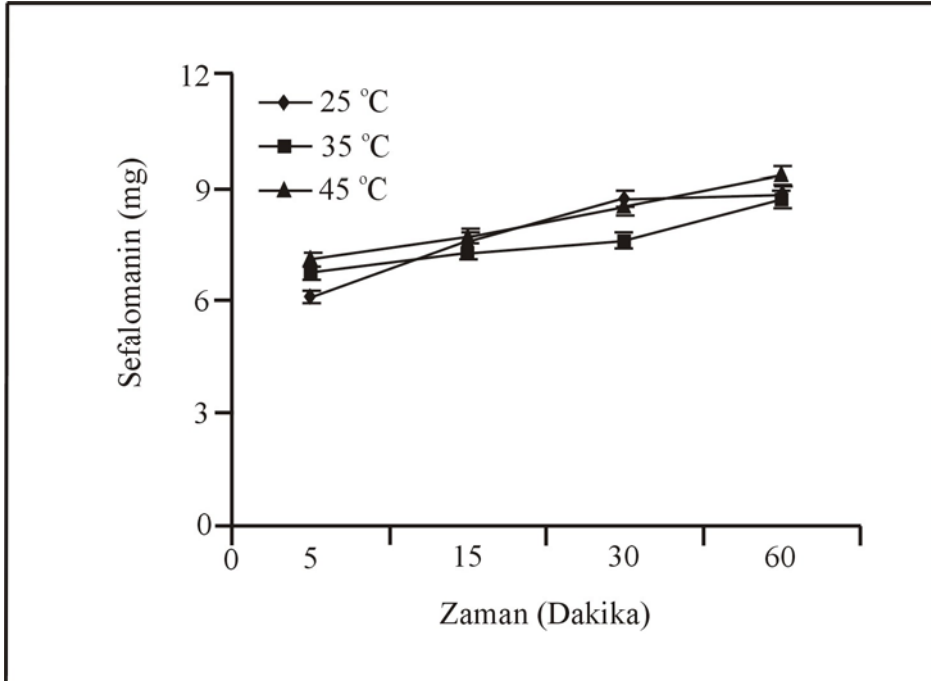
Şekil 4.5 metanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen sefalomanin miktarını göstermektedir.



Şekil 4.5. USE’de metanol kullanımı sonucu elde edilen sefalomanin miktarı

Metanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyonda 1 kg bitkiden elde edilen maksimum sefalomanin miktarı 45 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 13,2 mg olarak elde edilmiştir.

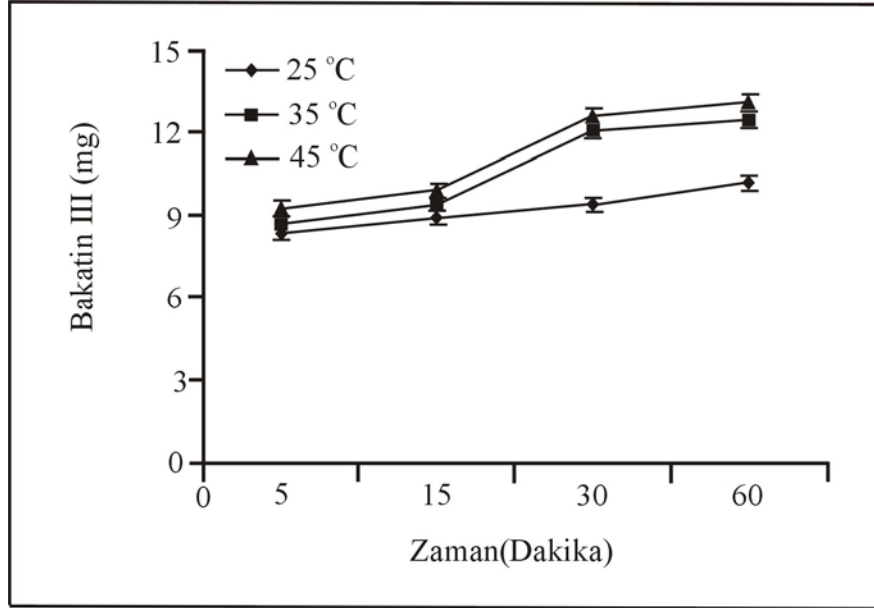
Şekil 4.6 etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen sefalomanin miktarını göstermektedir.



Şekil 4.6. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen sefalomanin miktarı

Etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyonda 1 kg bitkiden elde edilen maksimum sefalomanin miktarı 45 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 9,41 mg olarak elde edilmiştir.

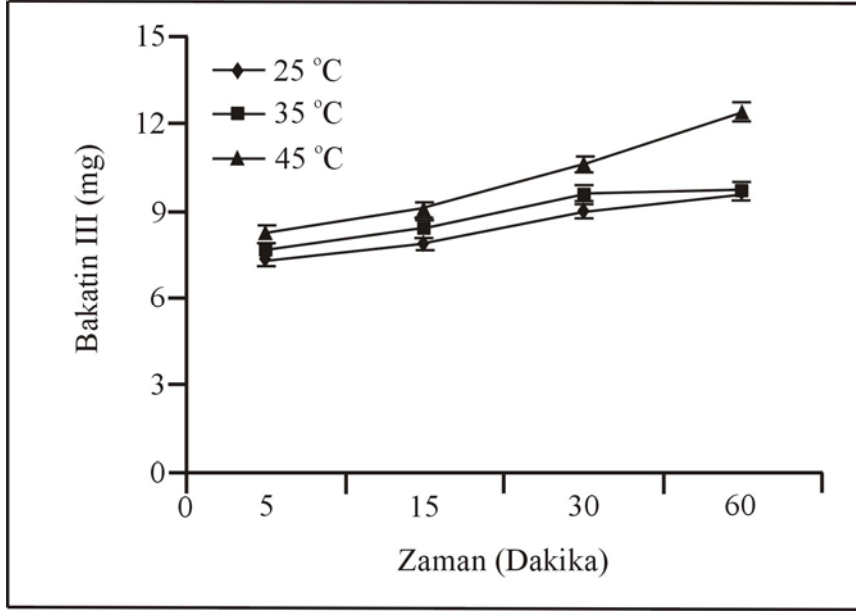
Metanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen bakatin III miktarını Şekil 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. USE’de metanol kullanımı sonucu elde edilen bakatin III miktarı

Metanolün çözücü olarak kullanıldığı USE’da 1 kg bitkiden elde edilen maksimum bakatin III miktarı 45 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 13,1 mg olarak elde edilmiştir.

Şekil 4.8 etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen bakatin III miktarını göstermektedir.



Şekil 4.8. USE’de etanol kullanımı sonucu elde edilen bakatin III miktarı

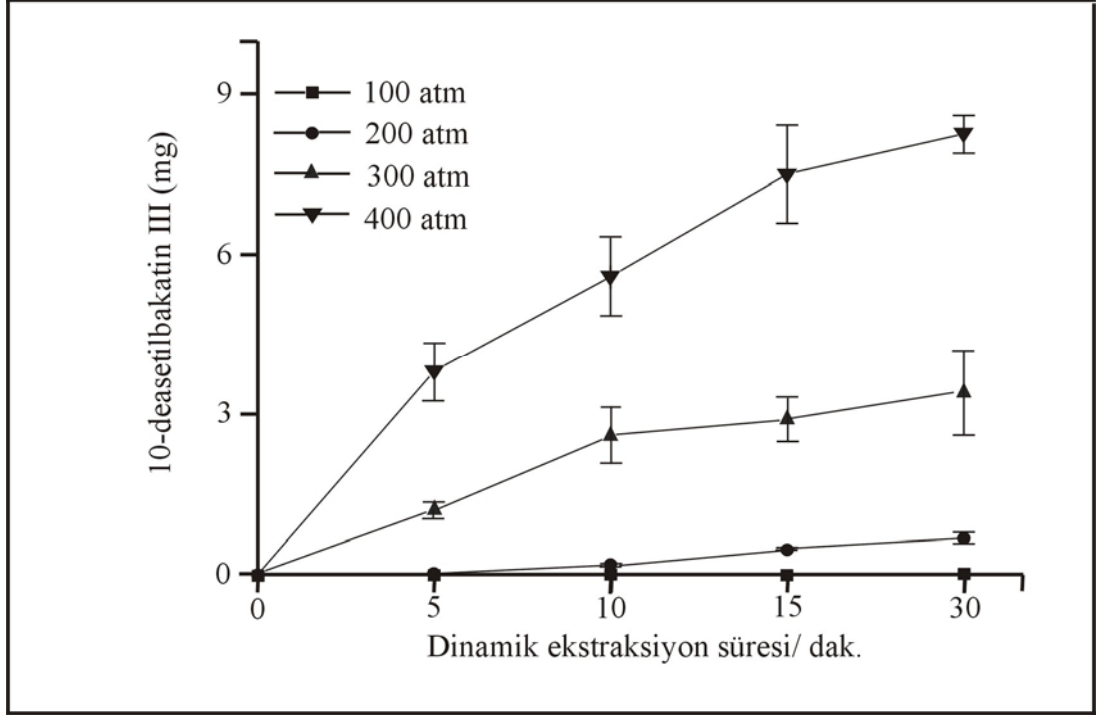
Etanolün çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyonda 1 kg bitkiden elde edilen maksimum bakatin III miktarı 45 °C ve 60 dakika ekstraksiyon süresi sonucunda 12,4 mg olarak elde edilmiştir.

4.3. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu

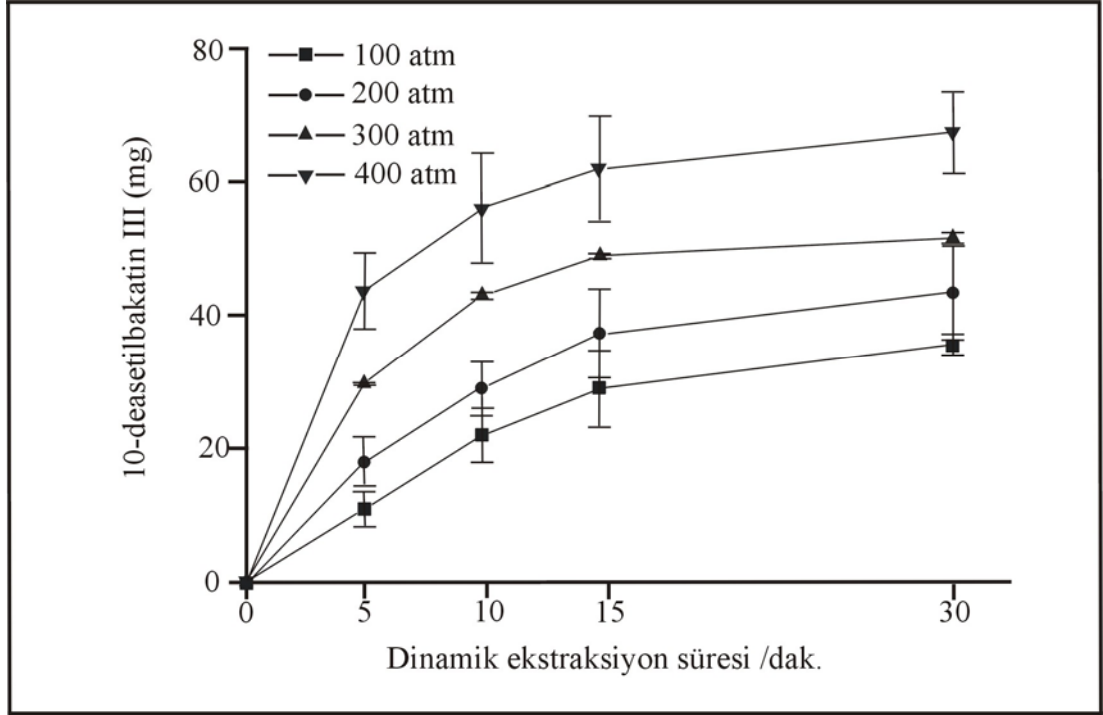
Taxus baccata L.’nin iğne yaprakları süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metodu (sc-CO₂) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon verimine etki eden parametrelerden matriksin tanecik boyutu, dinamik ekstraksiyon süresi, sıcaklık, basınç, karbondioksitin akış hızı, yardımcı çözücü tipi ve yardımcı çözücü hacmi parametreleri araştırılmıştır.

4.3.1. Ekstraksiyon Süresinin Etkisi

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu esnasında dinamik ekstraksiyon zamanının (ekstraktın toplanması esnasında geçen zaman) ekstrakte edilen 10-deasetilbakatin III verimine etkisi araştırılmıştır. Sc-CO₂ ekstraksiyonunda, farklı sıcaklıklarda ve 100-400 atm basınç aralıklarında saf karbondioksit kullanılarak elde edilen veriler Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Dinamik ekstraksiyon süresinin ürün verimliliğine etkisi (35 °C-400 atm)



Şekil 4.10. Dinamik ekstraksiyon süresinin ürün verimliliğine etkisi (45 °C-400 atm)

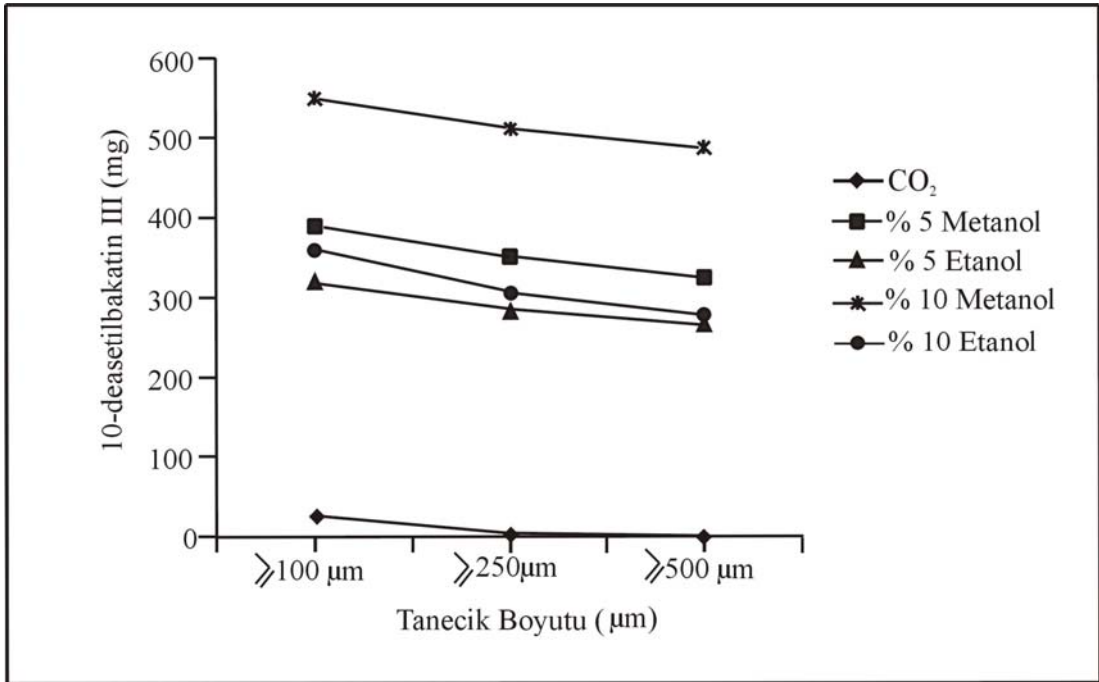
Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 incelendiğinde, farklı sıcaklık ve basınçlarda yapılan deneyler sonucunda ekstraksiyon verimi zamanla matriks ile etkileşen karbondioksit miktarında artış ve karbondioksitin matriksten daha fazla madde sürüklemesi nedeniyle arttığı, ancak bu artış, zaman aralıkları dikkate alındığında giderek azalan hızlarda devam ettiği gözlenmiştir. 45 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta ekstraksiyonun ilk 5 dakikasında 1000 gram bitkiden toplam elde edilen 10-DAB III miktarı 35,6 mg, 10 dakikada 43,5 mg, 15 dakikada 51,6 mg ve 30 dakikada 67,4 mg olarak elde edilmiştir.

4.3.2. Matriksin Tanecik Boyutunun Etkisi

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunu etkileyen ve ekstraksiyon verimi üzerine etkili olan en önemli parametrelerden biri çalışılan matriksin tanecik boyutudur. Süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon işeminde, tanecik boyutu küçüldükçe yüzey alanı artacağından, elde edilecek taksan miktarının artacağı düşünülse de çalışma aralığının belirlenmesi için tanecik boyutunun belirlenmesi

gerekmektedir. Ayrıca, tanecik boyutu küçüldükçe kurutulmuş bitkinin nemlenme hızı, dolayısıyla yapışkanlığı artacağından ve CO₂ akış hızını etkileyeceğinden, belli bir boyutun altında ekstraksiyon veriminin azalacağı da belirtilmektedir [50,117]. Büyük boyuttaki tanecikler, sistemde kütle aktarım dirençlerini arttırdığından, ekstraksiyon süresini de arttırmaktadır. Çok küçük tanecik boyutlu (<50 µm) örneklerde ise ekstraksiyon hızı ve etkinliği artmakla birlikte; akış hızını sabit tutma sorunları ile karşılaşmaktadır.

Ekstraksiyon süresince çalışılacak tanecik boyutunu belirlemek amacıyla yapılan deneyler sonucunda saf CO₂ ve CO₂ birlikte % 5-10 oranında metanol ve etanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı deneylerde tanecik boyutunun 10-deasetilbakatin III'ün ekstraksiyon verimi üzerine etkisi araştırılmış ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

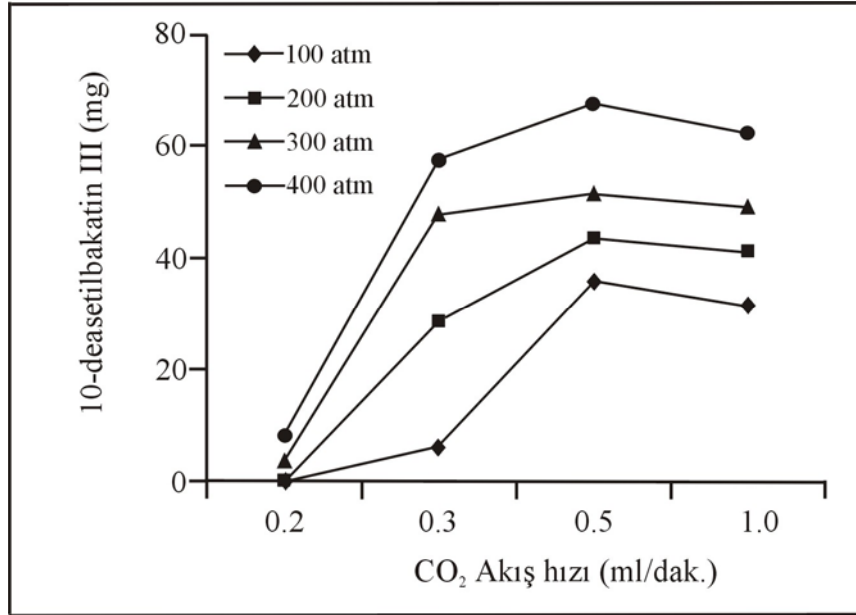


Şekil 4.11. Tanecik boyutunun ekstraksiyon verimi üzerine etkisi

Matrisin tanecik boyutunun ekstraksiyon verimine etkisi ≥ 100 µm, ≥ 250 µm ve ≥ 500 µm tanecik boyutlarında araştırılmış ve tanecik boyutunun azaltılması ile aktarım yüzey alanının arttığı, kütle aktarım dirençlerinin azaldığı ve küçültme esnasında yapıdaki hücrelerin bir kısmının bozulması sonucunda ürünün serbest kaldığı belirlenmiştir [118].

4.3.3. Karbondioksitin Akış Hızının Etkisi

Dinamik ekstraksiyon süresince karbondioksit akış hızı ile ekstraksiyon verimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. 35 °C sıcaklıkta ve 100-400 atm basınç aralığında ve CO₂'nin farklı akış hızlarında gerçekleştirilen deneyler sonucu elde edilen veriler Şekil 4.12'deki grafikte belirtilmektedir. Akış hızının artması ekstraktör içindeki türbülansların artmasına ve böylece dış kütle aktarım kısıtlamalarının azalmasına neden olmaktadır [118].



Şekil 4.12. CO₂ akış hızının ürün verimine etkisi

Şekil 4.12 incelendiği zaman görülmektedir ki CO₂ akış hızı 0.2 ml/dak.'dan 0.5 ml/dak.'ya çıkarılması ile, katı ile akışkan arasındaki film kalınlığını azalttığından elde edilen ürün miktarında bir artış olmaktadır, 400 atm. basınçta CO₂ akış hızının 0.2 ml/dak. iken 1 kg bitkiden, 8.24 mg 10-DAB III elde edilirken akış hızının 0.5 ml/dak. olması durumunda bu değer 67,4 mg olmaktadır. Bununla birlikte CO₂ akış hızı 0.5 ml/dak.'dan 1.0 ml/dak.'ya arttırıldığı zaman ürün veriminde bir azalma meydana gelmektedir. Çözücü akış hızının artması katı ile akışkan arasında film kalınlığını azaltmakta bu durumda verim artmaktadır; ancak aynı etki katı ve akışkan arasında etkileşim süresini kısaltmakta böylece verim

azalmaktadır. Çözücü akış hızının sürece etkisi katı madde yapısı ile yakından ilgilidir [118]. Ürün verimindeki bu azalmanın bir diğer nedeni olarak matriks ile çözücünün yüksek akış hızından dolayı yeterince etkileşememesi ve sağlıklı süpürme yapamaması gösterilebilir.

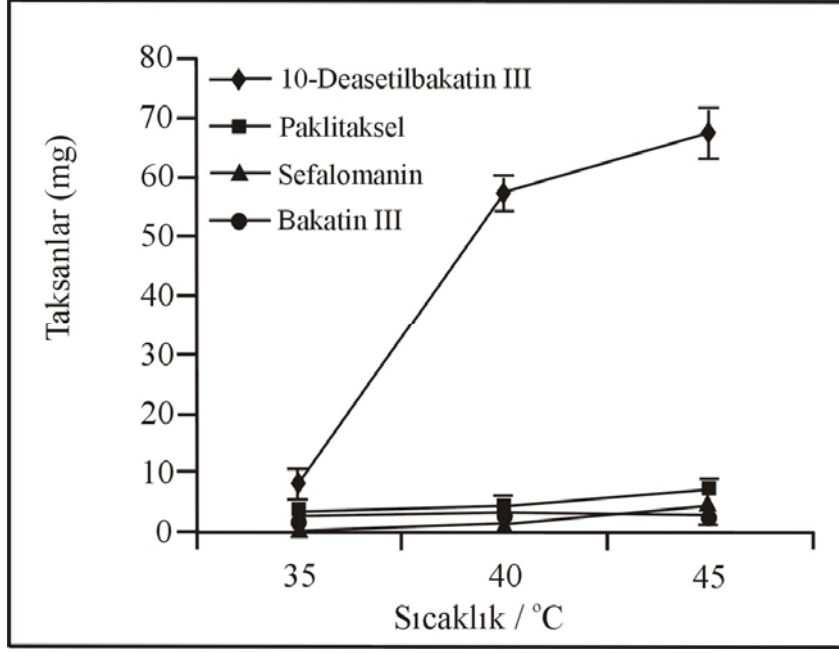
4.3.4 Sıcaklık ve Basıncın Etkisi

Basınç ve sıcaklık, süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon işleminde çözücünün çözme gücü üzerine önemli etkiler yapan değişkenlerdir [50,119]. Bu değişkenler, ekstraksiyon işlemini farklı yönlerden fakat aynı zamanda birbirleri ile iç etkileşimlerde bulunarak etkilemektedirler. Bu nedenle basınç ve sıcaklığın verim üzerine etkilerinin ayrı ayrı ve ardından birlikte incelenmesi amacıyla yapılan ön denemelerde aşağıdaki sonuçlar alınmıştır. Süperkritik bir akışkanın çözme gücü o akışkanın yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Akışkanın yoğunluğun artması ile süperkritik akışkanların çözme güçleri artmakta ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedirler. Difüzyon katsayılarının artması ve viskozitenin azalması ile süperkritik akışkanlar, katı yapıdaki gözeneklerde gazlar gibi kolayca difüze olabilmekte ve çözme güçleri artmaktadır. Süperkritik bölgede yoğunluk, sabit sıcaklıkta basıncın azaltılması ile azalırken, sabit basınçta ise sıcaklığın azalmasıyla artış göstermektedir. Çizelge 4.2’de sıcaklık ve basınçla değişen karbondioksit yoğunluğunu göstermektedir [39,120].

Çizelge 4.2. Sıcaklık ve basınçla değişen karbondioksit yoğunluğu (g/cm^3) [120]

Basınç (bar)	Sıcaklık (K)	Yoğunluk (kg/m^3)	Entalpi (J/mol)	Entropi(J.K/mol)
100	308	655	-9234	-62.9
200	308	863	-10751	-69.7
300	308	953	-11147	-72.6
400	308	1013	-11292	-74.5
100	313	568	-8175	-59.5
200	313	831	-10296	-68.2
300	313	929	-10770	-71.3
400	313	993	-10951	-73.4
100	318	463	-6841	-55.3
200	318	798	-9830	-66.8
300	318	906	-10391	-70.1
400	318	974	-10609	-72.3
100	333	294	-4147	-47.0
200	333	696	-8371	-62.3
300	333	833	-9237	-66.6
400	333	914	-9579	-69.1

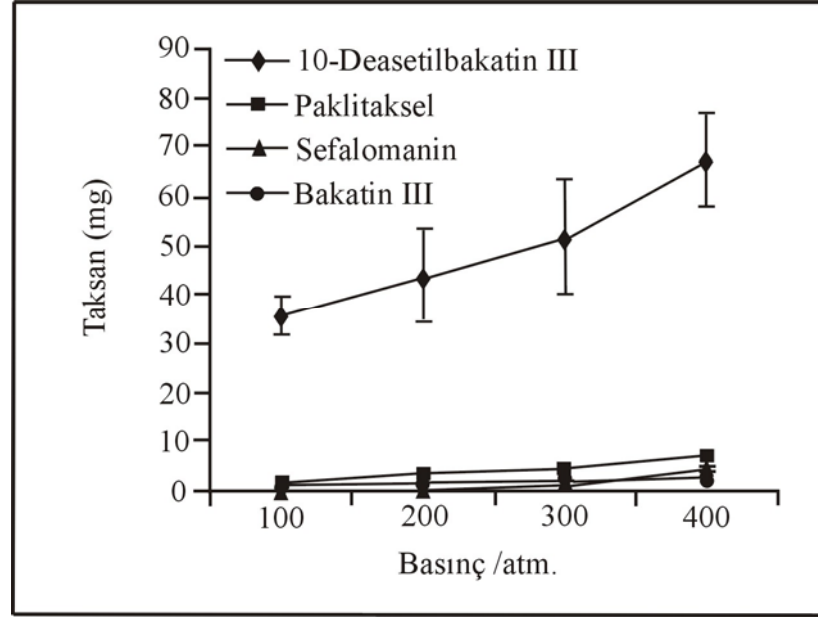
sc-CO₂ ekstraksiyonu ile taksanların elde edilmesine sıcaklık etkisi 400 atm sabit basınçta 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda saf CO₂ kullanılarak araştırılmış ve veriler Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Taksan eldesine sıcaklık etkisi (P: 400 atm)

Şekil 4.13’de belirtildiği gibi sabit basınçta sıcaklığın artırılması ile ekstrakte edilen taksan miktarında artış söz konusu olmaktadır. Süperkritik akışkanlarda belirtilen şartlarda yoğunluk azalırken, diğer yandan difüzyon katsayısı da artış göstermektedir. Yüksek difüzyon katsayısı akışkanlarda hızlı kütle transferi sağlamak ve bileşiklerin ekstraksiyonu ve kromatografik uygulamalarına olanak vermektedir.

sc-CO₂ ekstraksiyonu ile taksanların elde edilmesine sıcaklık etkisi 45 °C sabit sıcaklıkta 100, 200, 300 ve 400 atm basınçlarda saf CO₂ kullanılarak araştırılmış ve veriler Şekil 4.14’da gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Taksan eldesine basınç etkisi (T: 45 °C)

Süperkritik bölgede yoğunluk, sabit sıcaklıkta, basıncın artmasıyla artış göstermekte ve akışkanın çözme gücünü arttırmaktadır. Şekil 4.14’da da belirtildiği gibi sıcaklığın sabit tutulup basıncın artması ile elde edilen taksan miktarında artış sözkonusu olmaktadır. Genel olarak bakıldığında zaman sıcaklık ve basıncın artırılması ile süperkritik akışkanın yoğunluk, difüzyon katsayısı ve viskozite gibi fiziksel özelliklerinin değişmesi sonucu ekstraksiyon sonunda elde edilen ürün miktarında artış gözlenmektedir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en yüksek taksan miktarının elde edildiği basınç değeri 400 atm olarak belirlenmiştir.

Basınç ve sıcaklığın ayrı ayrı incelenmesi amacıyla yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar şu şekilde tartışılabilir: Basıncın artması, sc-CO₂ yoğunluğunun artmasına neden olmakta, bu da ekstraksiyon işlemini iki şekilde etkilemektedir: (1) Süperkritik akışkanın çözme gücü artmaktadır. (2) Yüksek yoğunluklarda difüzyon katsayısının azalması sonucu katı ile akışkan arasındaki iç etkileşimler azalmaktadır [119]. Bu iki ters etki, basıncın verim üzerinde daha az etkili olmasına neden olmaktadır. Yüksek sıcaklık ise sc-CO₂ yoğunluğunu azaltmakta ancak çözünenin buhar basıncını artırdığından taksanların çözünürlüğünü de artırmaktadır. Sıcaklık artışı ile çözünürlükteki bu artışın, basınç etkisiyle oluşan yoğunluk artışının etkisinden daha güçlü bir etki olup olmadığı, kullanılan katı maddenin yapısı ile ilgili olduğu belirtilmektedir [50,121].

Ayrıca yukarıda yapılan açıklamalara ek olarak, basınç ve sıcaklığın birlikte etkileri, şu şekilde de açıklanabilmektedir: Süperkritik akışkanın sıcaklığındaki bir artış, çözücü molekülleri arasındaki uzaklığı artırarak, bu moleküller arasındaki iç etkileşimleri azaltmaktadır. Bu azalma, çözücü ile çözünen madde arasındaki iç etkileşimler üzerinde kuvvetlendirici etkiler yapmakta ve ekstraksiyon hızı artmaktadır [50,122]. Basıncın ekstraksiyon üzerine etkisi ise ters orantılıdır. Basıncıdaki artış, akışkanın yoğunluğunu artırırken, çözücü moleküllerinin birbirleri ile iç etkileşimlerini de artırmaktadır. Bu olay çözücü ile çözünen madde arasındaki iç etkileşimleri azalttığından, ekstraksiyon hızı azalmaktadır.

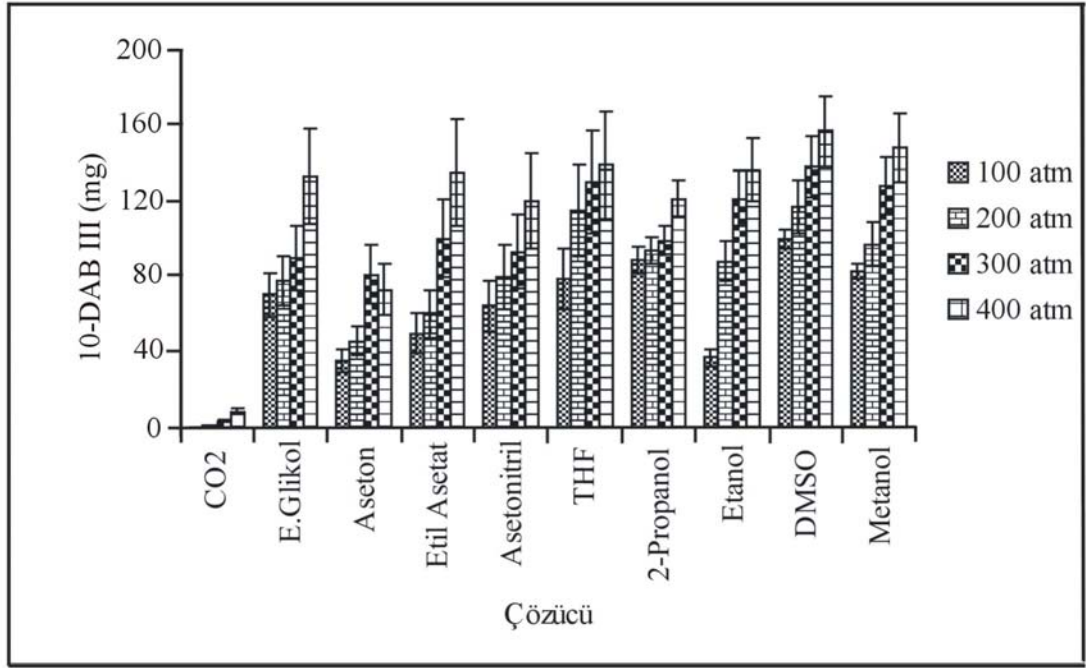
4.3.5 Yardımcı Çözücü Etkisi

Taksanların sc-CO₂ ile ekstraksiyonunda verimi artıran en önemli değişkenlerden biri de sc-CO₂'e katılan ve yardımcı çözücü (entrainer, modifier) olarak tanımlanan çözücülerin kullanılmasıdır. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun (SFE) mekanizmasına, bazı faktörler doğrudan etkilemektedir. Bu faktörler, (1) termodinamik faktörler; ekstraktın SFE içerisindeki çözünürlüğü, (2) kinetik faktörler; yüzeyden analitin yavaş desorpsiyonu ve çözücünün matriks içerisine difüzyonu, (3) fiziksel faktörler; kompleks, ekstrakte edilecek madde matriks etkileşimi. Yukarıda bahsedilen bu faktörler, direkt olarak ekstrakte edilecek maddenin matriksten alınmasına etki eder. *Taxus Baccata L.* ağacının yapraklarından ekstrakte edilmeye çalışılan hedef madde taksanların polar yapıda olması ve apolar özellik gösteren saf karbondioksit ile yeterince etkileşim gösteremeyecek olması hedeflenen maddenin ekstrakte edilmesini zorlaştırmaktadır. Ortamın polaritesinin artırılıp hedeflenen moleküllerin etkili bir biçimde ekstrakte edilebilmesi için yardımcı çözücü kullanılması iki etapta gerçekleştirilmiştir. İlk etapta metanol, etanol, 2-propanol, etil asetat, aseton, tetrahidrofuran (THF), etilenglikol, asetonitril ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi farklı polariteler sahip çözücüler yardımcı çözücü olarak kullanılmıştır. Bu çözücüler, ekstraksiyon esnasında damlatma metodu ile 100 ve 200 µL hacimlerde ekstraksiyon hücrelerine enjekte edilmişlerdir.

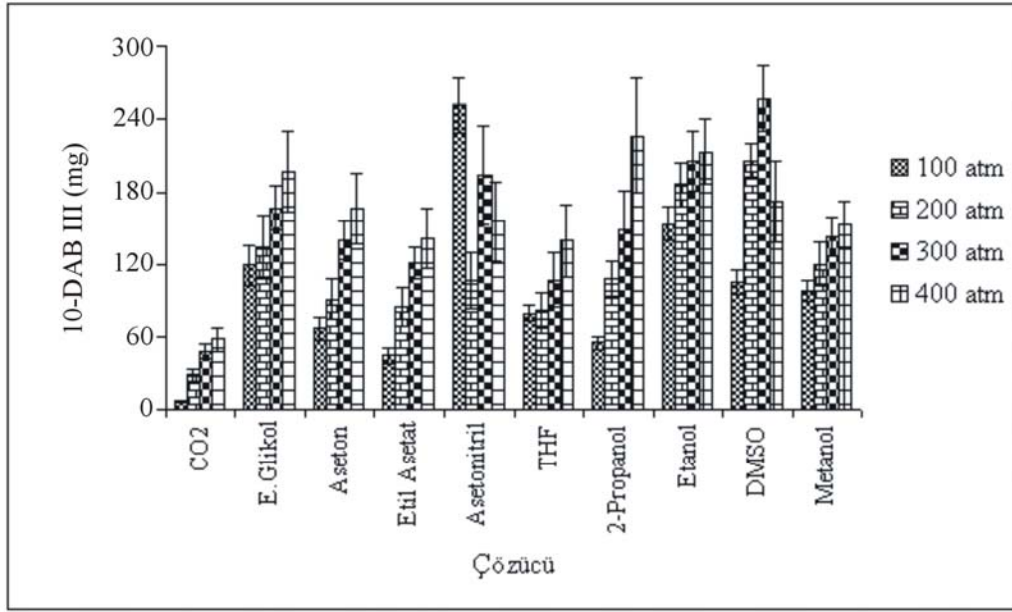
Deneyler 35, 40, 45 °C sıcaklıkta, 100-400 atm basınç aralığında, sadece saf karbondioksit kullanımının yanında, 100-200 µL hacminde yardımcı çözücünün (scCO₂ + yardımcı çözücü) ekstraksiyon hücrelerine proses başlamadan önce

damlatma yöntemi ile enjekte edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen taksanların RP-HPLC kromatografik analiz verileri her bir taksan ve sıcaklık değeri için ayrı ayrı grafiğe geçirilmiştir.

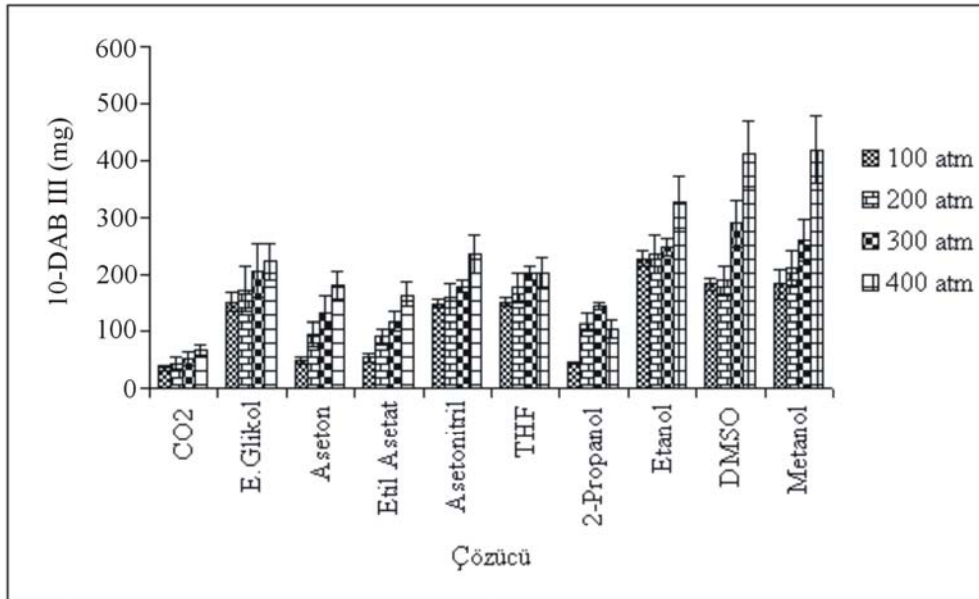
Şekil 4.15-4.17’da sc-CO₂ ekstraksiyonu ve 100 µL yardımcı çözücü kullanılarak farklı sıcaklık ve basınçlarda gerçekleştirilen deneylerin sonucunda elde edilen 10-deasetilbakatin oranını göstermektedir.



Şekil 4.15. sc-CO₂ ortamında 35 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı



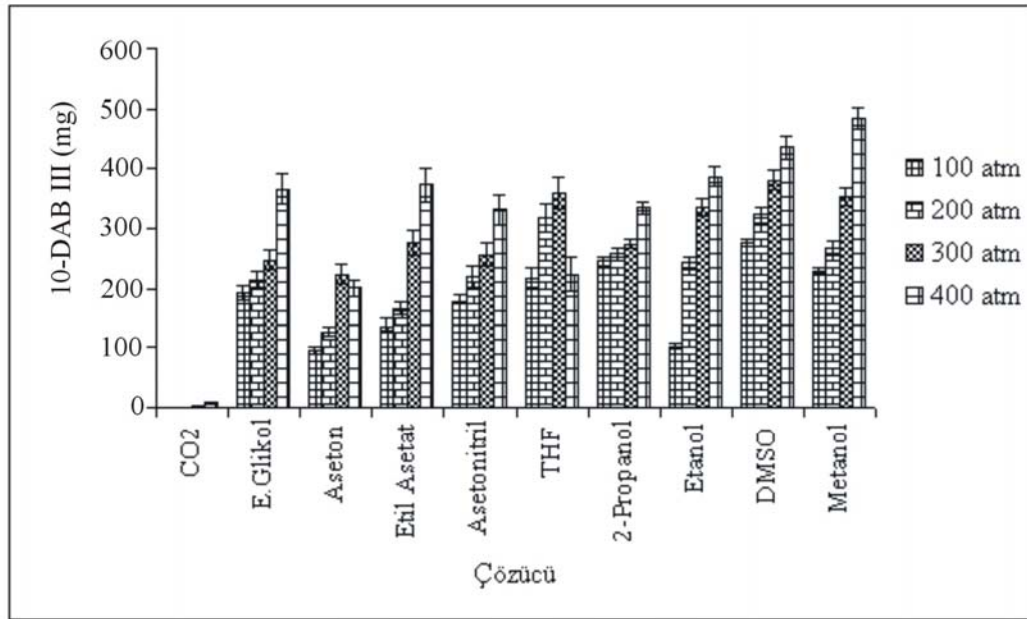
Şekil 4.16. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 100 μL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı



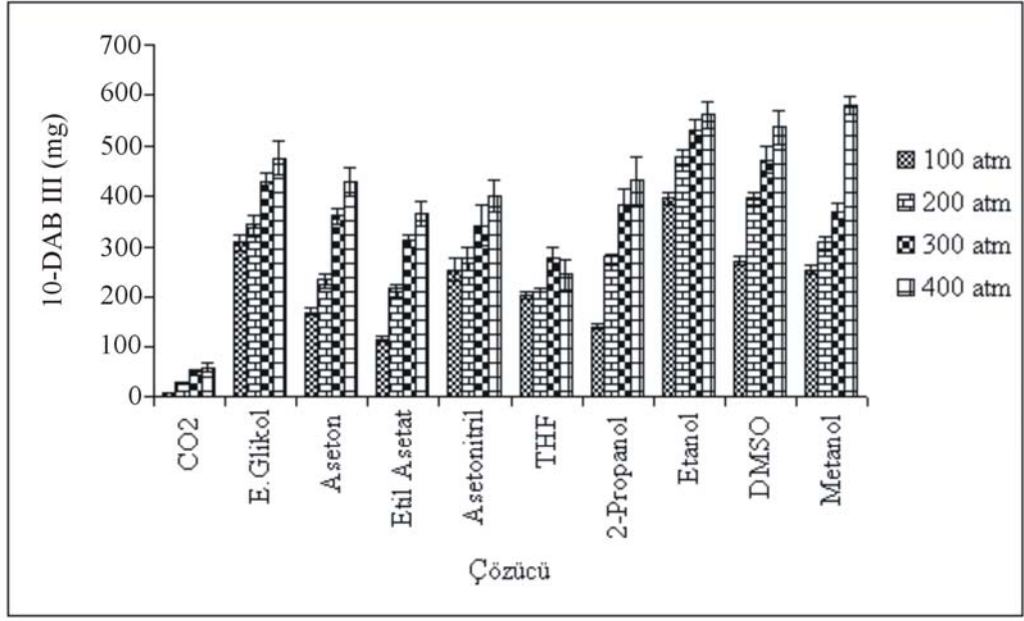
Şekil 4.17. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 100 μL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı

sc-CO₂ ekstraksiyonu esnasında 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucunda elde edilen 10-deasetilbakatin III eldesinde saf karbondioksit kullanımına göre elde edilen ürün miktarına göre dikkat çekici bir artış söz konusu olmaktadır. Kullanılan yardımcı çözücüler arasında düşük sıcaklıkta metanol, dimetilsülfoksit (DMSO), asetonitril, THF, etilen glikol ve etanol en iyi sonucun alındığı çözücüler olmakla birlikte sıcaklığın artırılması ile metanol, etanol ve DMSO'nin ekstraksiyon verimini daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Sadece saf CO₂ kullanılarak 45 °C ve 400 atm. basınçta 1 kg bitkiden maksimum 67,4 mg oranında elde edilen 10-DAB III miktarı, aynı şartlarda 100 µL metanol, etanol ve DMSO kullanımı ile sırasıyla 418 mg, 327 mg ve 411 mg değerine yükselmektedir.

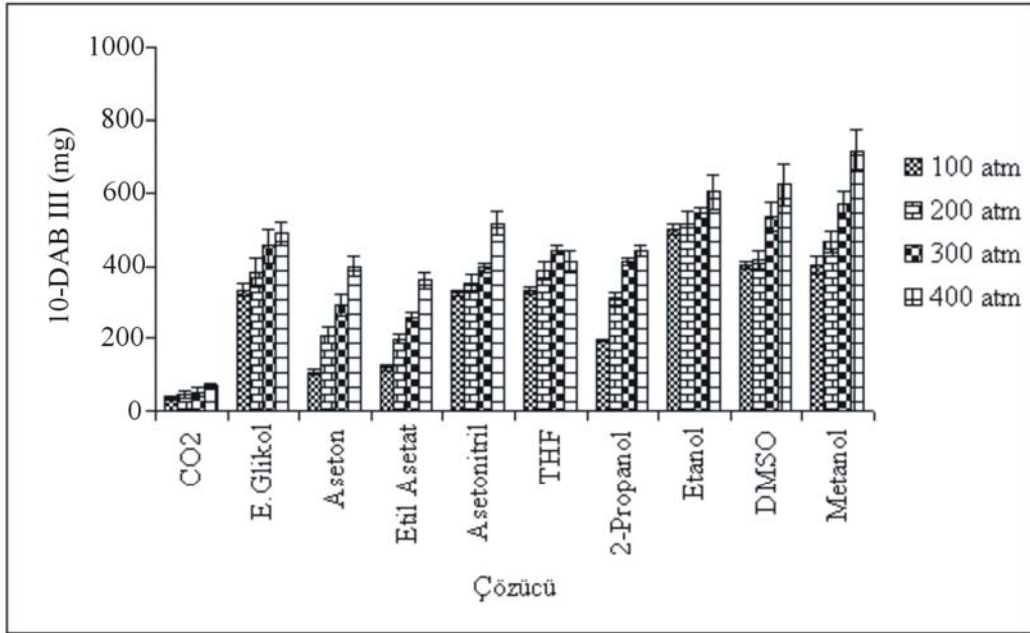
Ekstraksiyonda kullanılan yardımcı çözücü hacminin elde edilen ürün miktarına etkisinin incelenmesi amacıyla kullanılan yardımcı çözücü hacmi 200 µL'ye çıkarılmış, ekstraksiyon deneyleri aynı sıcaklık ve basınç değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 10-DAB III oranları Şekil 4.18-20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. sc-CO₂ ortamında 35 °C'de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı



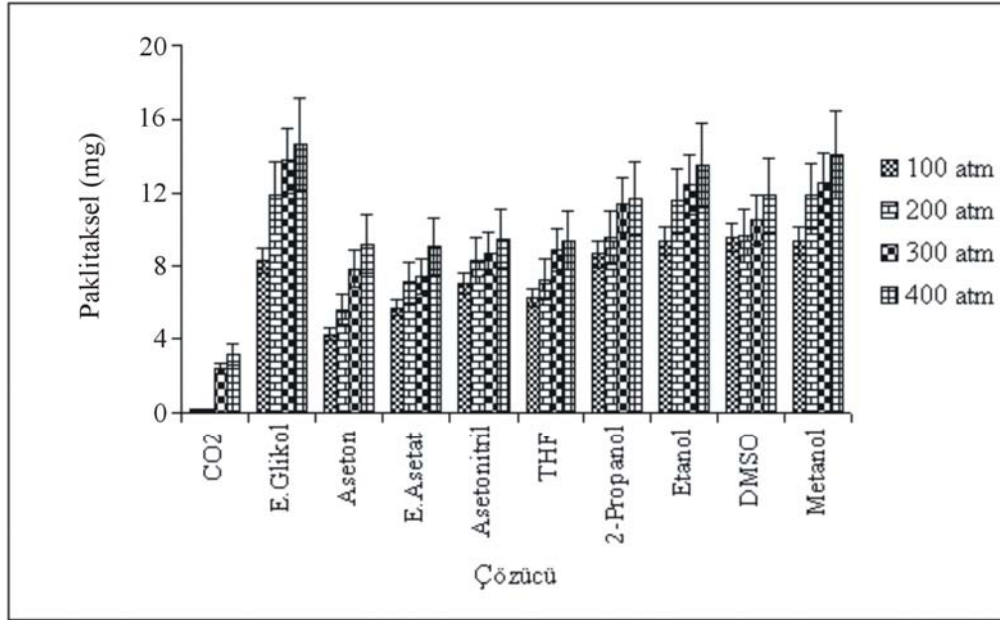
Şekil 4.19. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı



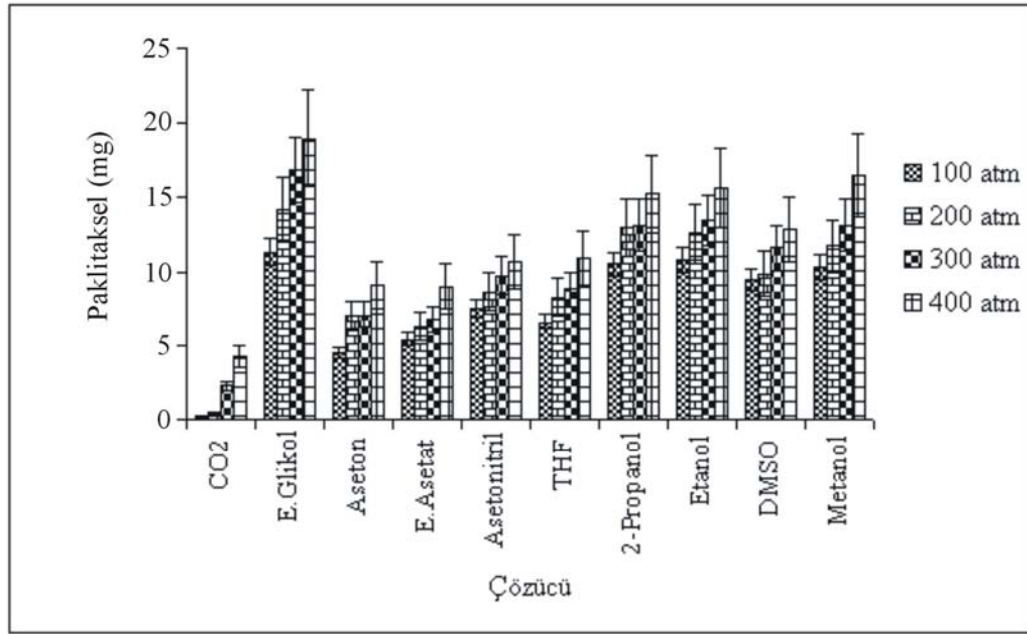
Şekil 4.20. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı

Yardımcı çözücü hacminin artırılması sonucunda çözücünün yoğunluğu ve buna bağlı olarak artan çözünürlük gücü matrisle etkileşiminin artmasına olanak vermekle birlikte sc-CO₂'in polaritesinin de artması sonucu ekstraksiyon verimi artmıştır. 45 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta 200 µL metanol, etanol ve DMSO kullanılması sonucu 1 kg bitkiden elde edilen 10-DAB III miktarları 718 mg, 605 mg ve 626 mg olarak belirlenmiştir.

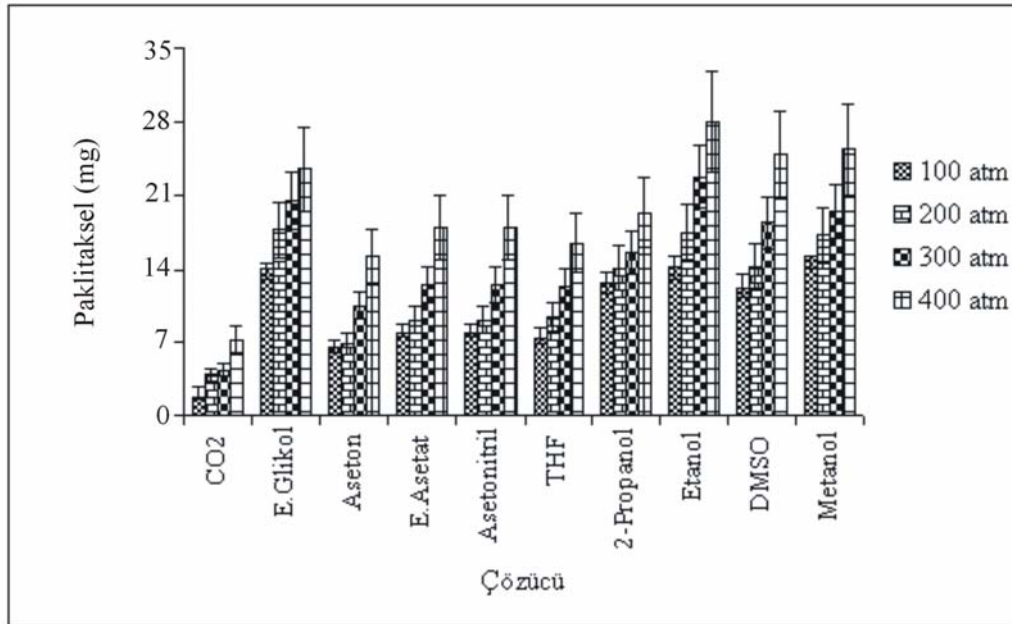
Şekil 4.21-4.23'de sc-CO₂ ekstraksiyonu ve 100 µL yardımcı çözücü kullanılarak farklı sıcaklık ve basınçlarda gerçekleştirilen deneylerin sonucunda elde edilen paklitaksel miktarını göstermektedir.



Şekil 4.21. sc-CO₂ ortamında 35 °C'de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı



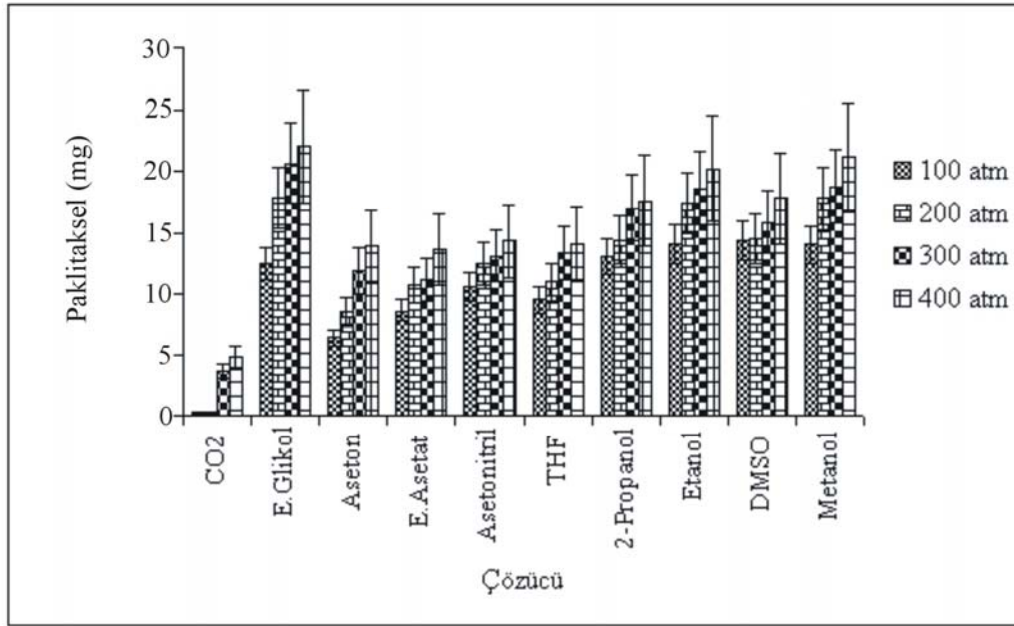
Şekil 4.22. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı



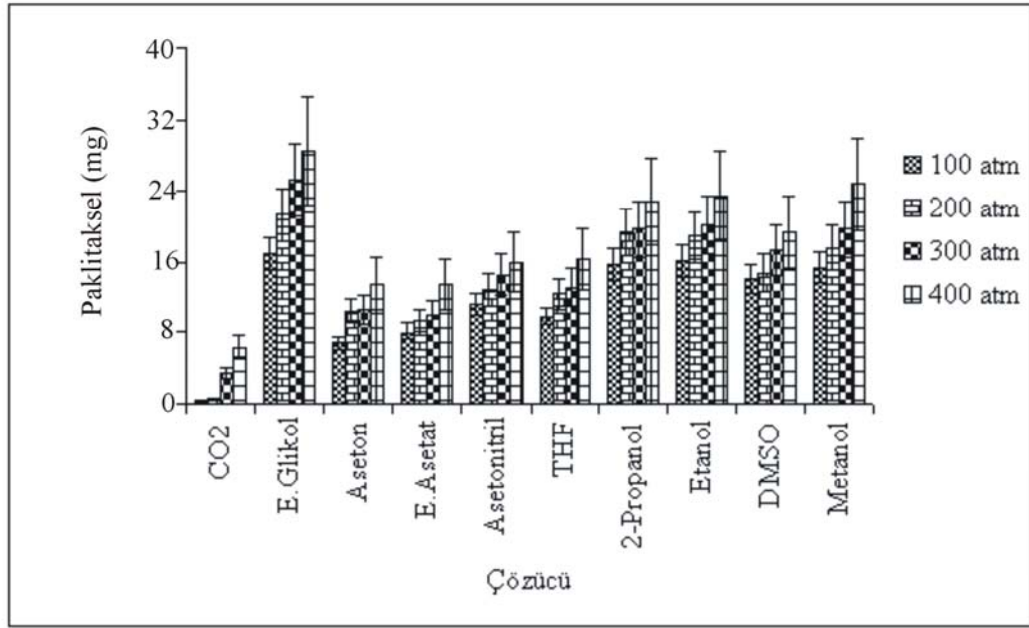
Şekil 4.23. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı

sc-CO₂ ekstraksiyonu esnasında 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucunda paklitakselin eldesinde saf karbondioksit kullanımına göre dikkat çekici bir artış söz konusu olmaktadır. Kullanılan yardımcı çözücüler arasında metanol, DMSO, etilen glikol ve etanol en iyi sonucun alındığı çözücüler olmaktadır. Sadece saf CO₂ kullanılarak 45 °C ve 400 atm. basınçta 1 kg bitkiden maksimum 7,2 mg oranında elde edilen paklitaksel miktarı, aynı şartlarda 100 µL metanol, etanol, etilen glikol ve DMSO kullanımı ile sırasıyla 25,4 mg, 28 mg, 23 mg ve 24,9 mg değerine yükselmektedir.

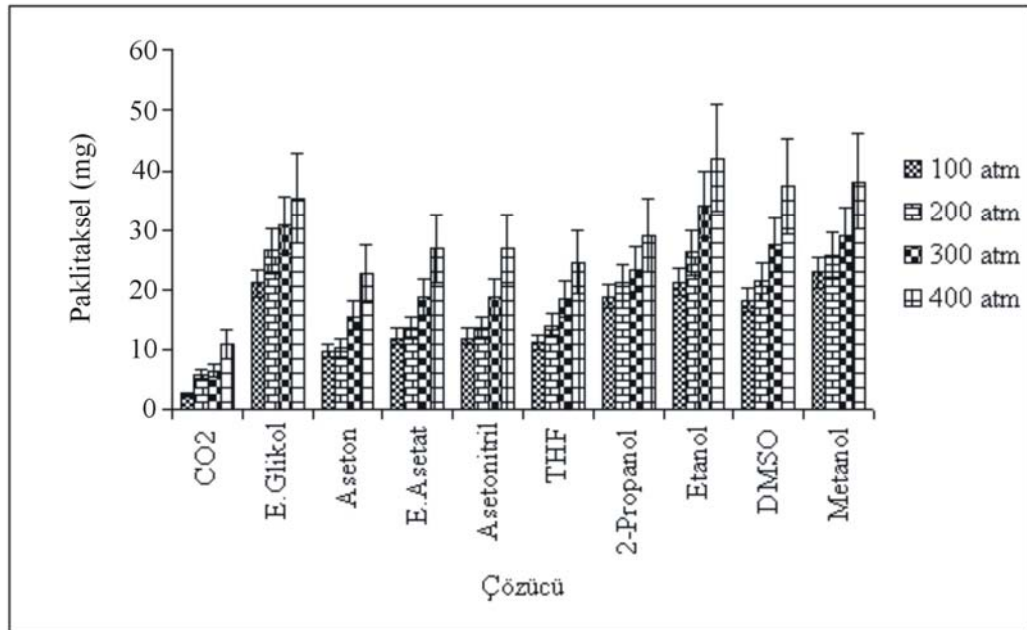
Ekstraksiyonda kullanılan yardımcı çözücü hacminin elde edilen ürün miktarına etkisinin incelenmesi amacıyla kullanılan yardımcı çözücü hacmi 200 µL'ye çıkarılmış, ekstraksiyon deneyleri aynı sıcaklık ve basınç değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen paklitaksel oranları Şekil 4.24-26 grafiklerinde belirtilmiştir.



Şekil 4.24. sc-CO₂ ortamında 35 °C'de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı



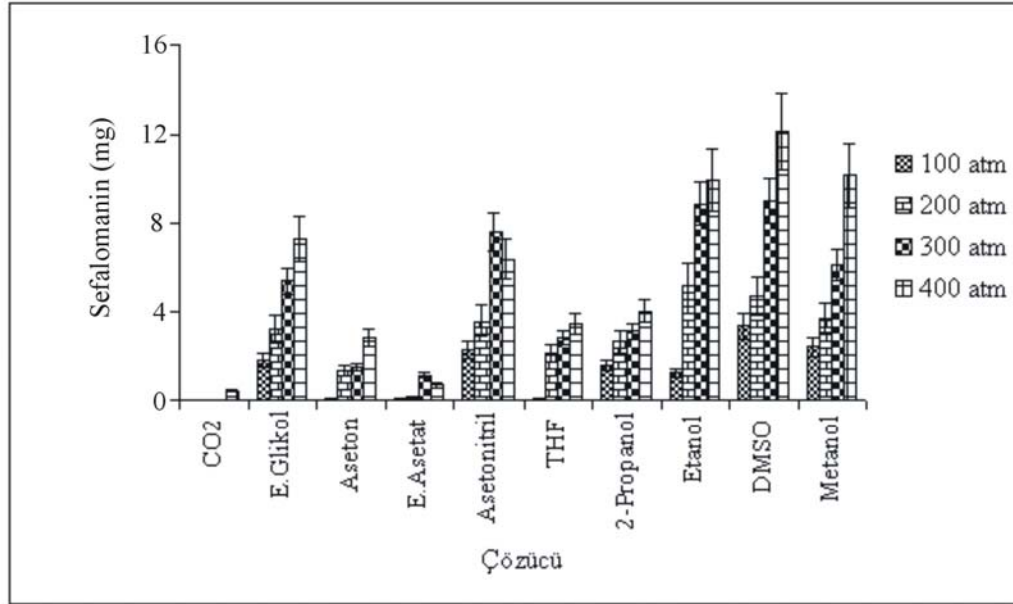
Şekil 4.25. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı



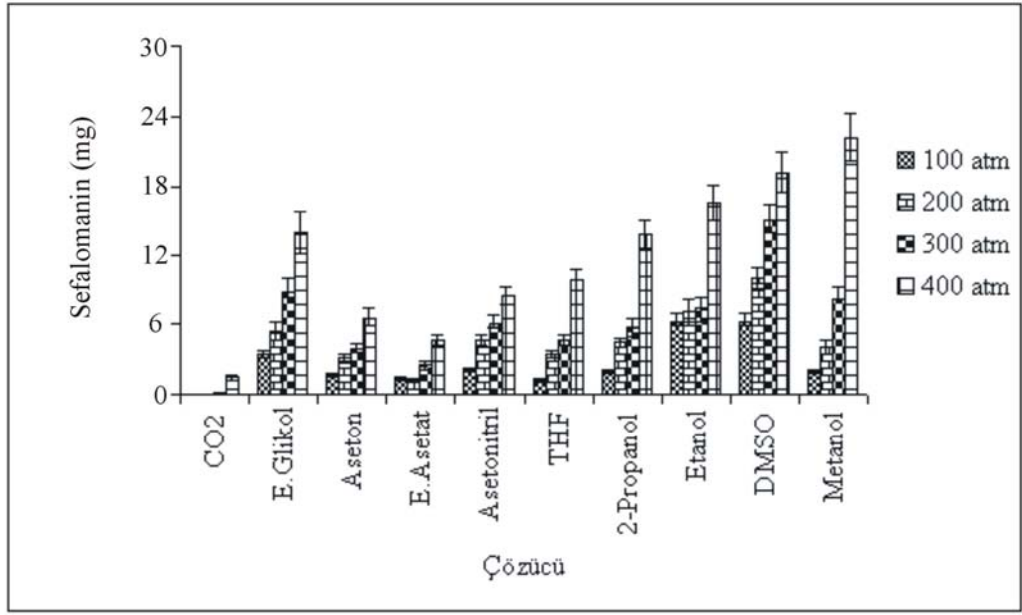
Şekil 4.26. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Paklitaksel miktarı

Yardımcı çözücü hacminin artırılması ile elde edilen paklitaksel miktarında, çözücü yoğunluğu, çözünürlük ve polarite değişmelerinin yarattığı durumdan dolayı artış tespit edilmiştir. 45 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta 200 µL metanol, etanol, etilen glikol ve DMSO kullanılması sonucu 1 kg bitkiden elde edilen paklitaksel miktarları 38,2 mg, 42,1 mg, 35, 4 ve 37 mg olarak tespit edilmiştir.

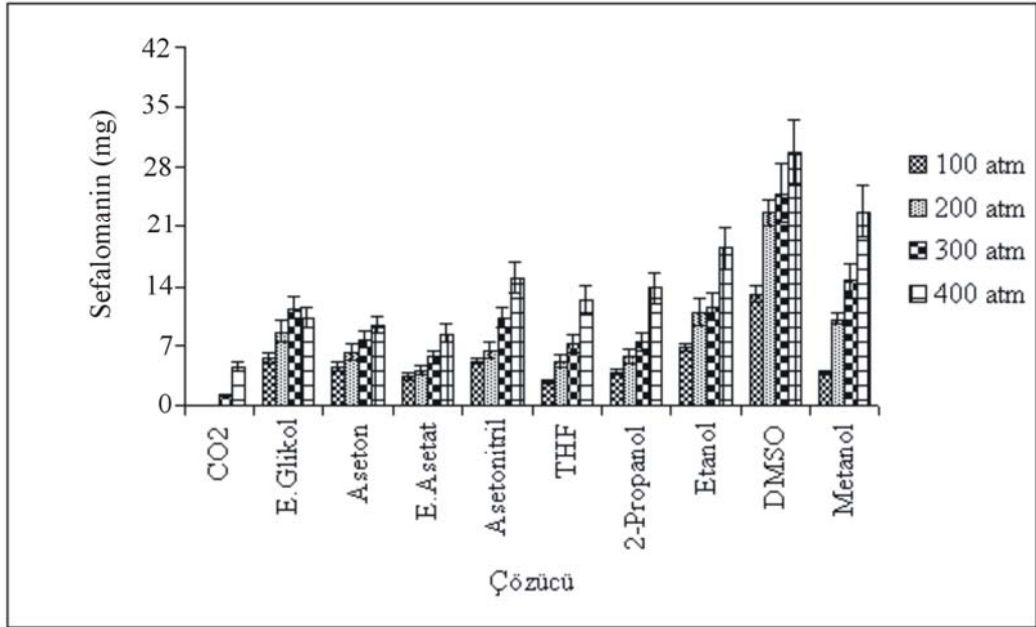
Şekil 4.27-4.29'da sc-CO₂ ekstraksiyonu ve 100 µL yardımcı çözücü kullanılarak farklı sıcaklık ve basınçlarda gerçekleştirilen deneylerin sonucunda elde edilen sefalomanin oranını göstermektedir.



Şekil 4.27. sc-CO₂ ortamında 35 °C'de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı

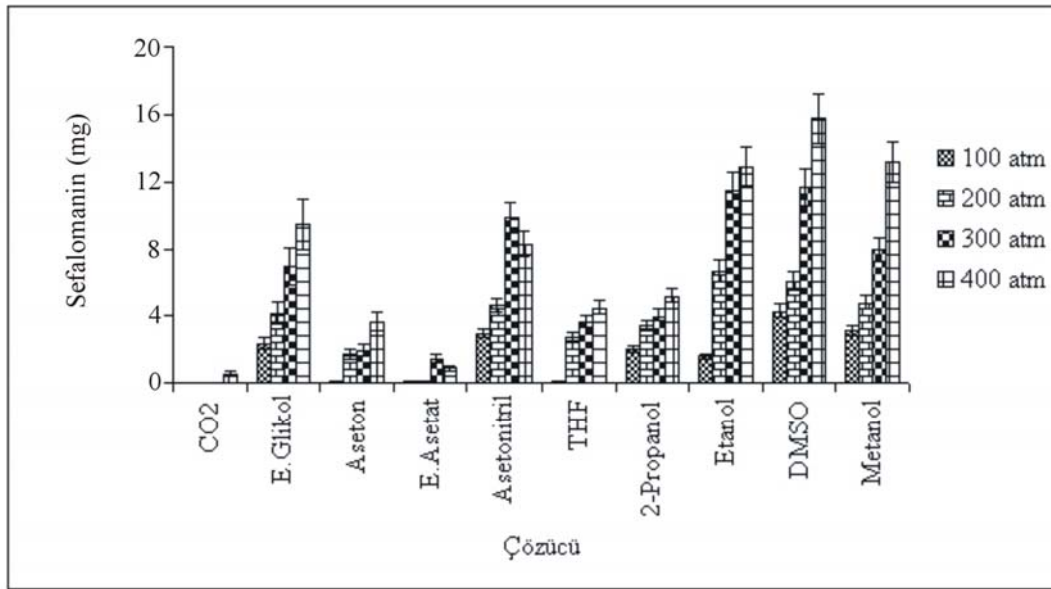


Şekil 4.28. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı

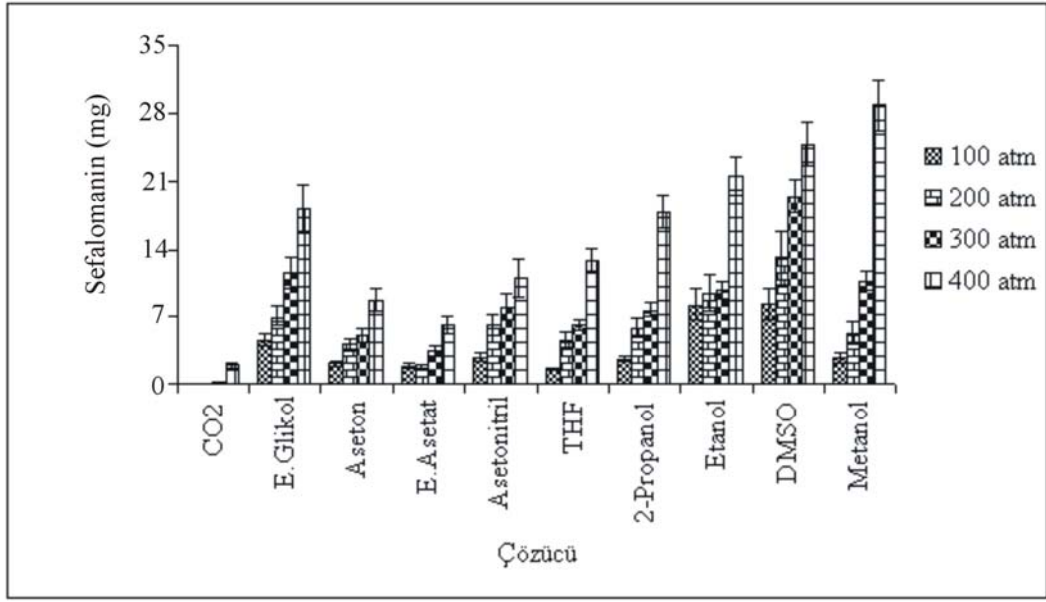


Şekil 4.29. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı

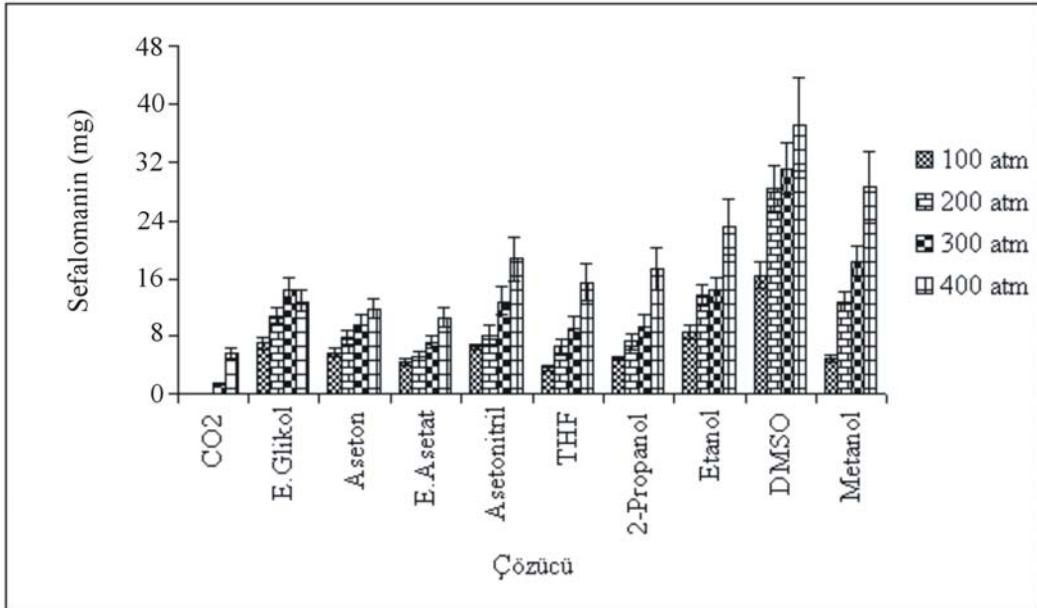
Saf CO₂'in çözücü olarak kullanıldığı deneylerde 100-300 atm. basınç aralıklarında sefalomanin bileşiği elde edilememiştir. Ekstraksiyon esnasında yardımcı çözücü kullanılması ve basıncın artırılması ile birlikte sefalomaninin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 45 °C ve 400 atm basınçta 1 kg bitkiden saf karbondioksit ile 4,4 mg oranında elde edilen sefalomanin 100 µL yardımcı çözücü eklenmesi sonucu maksimum 29 mg oranında DMSO ile elde edilmiştir. Kullanılan yardımcı çözücü hacminin 200 µL olması durumunda elde edilen sefalomanin miktarları Şekil 4.30-32'de belirtilmiştir.



Şekil 4.30. sc-CO₂ ortamında 35 °C'de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı



Şekil 4.31. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı

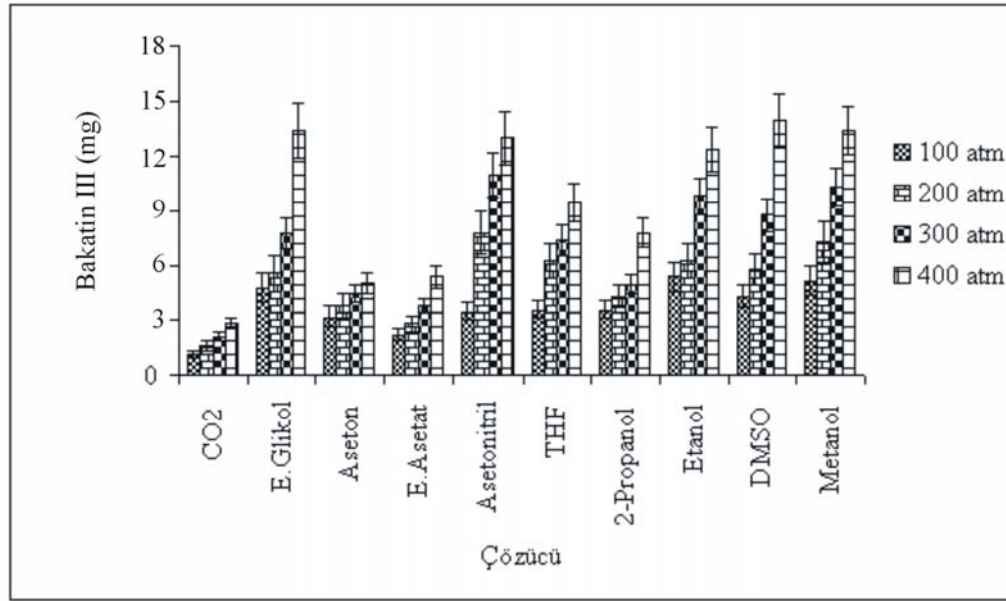


Şekil 4.32. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Sefalomanin miktarı

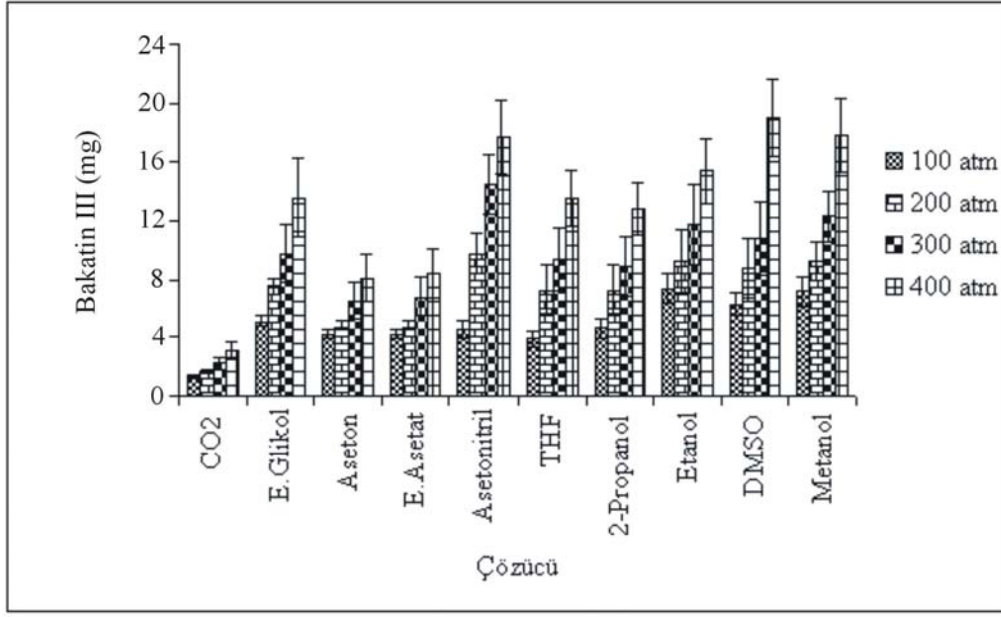
Yardımcı çözücü hacminin artırılması ile elde edilen sefalomanin miktarında önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. 45 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta

200 µL metanol, etanol ve DMSO kullanılması sonucu 1 kg bitkiden elde edilen sefalomanin miktarları sırasıyla 28 mg, 23 mg ve 37 mg olarak tespit edilmiştir.

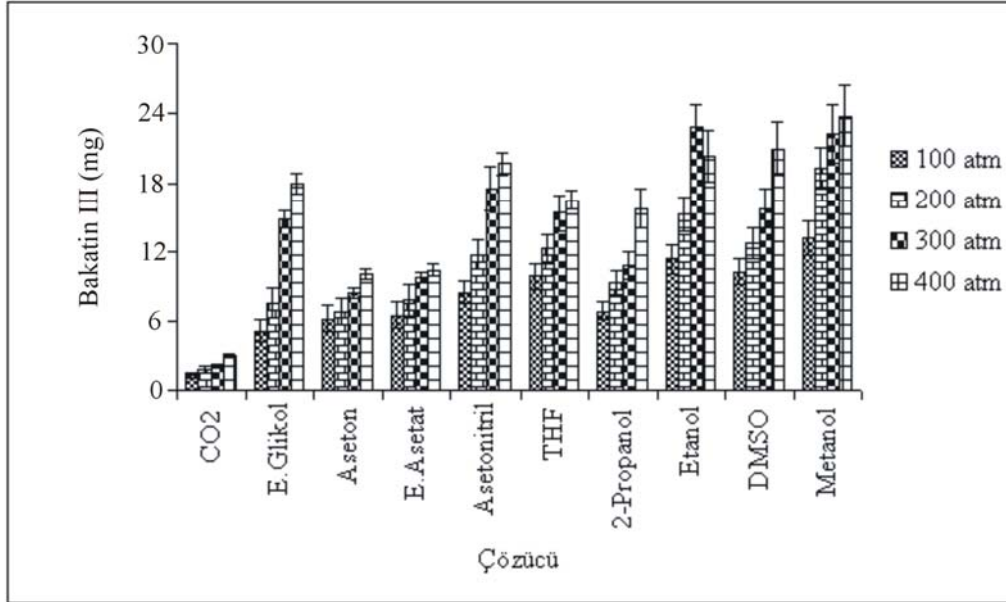
Şekil 4.33-4.35’de sc-CO₂ ekstraksiyonu ve 100 µL yardımcı çözücü kullanılarak farklı sıcaklık ve basınçlarda gerçekleştirilen deneylerin sonucunda elde edilen bakatin III oranını göstermektedir.



Şekil 4.33. sc-CO₂ ortamında 35 °C’de ve 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı

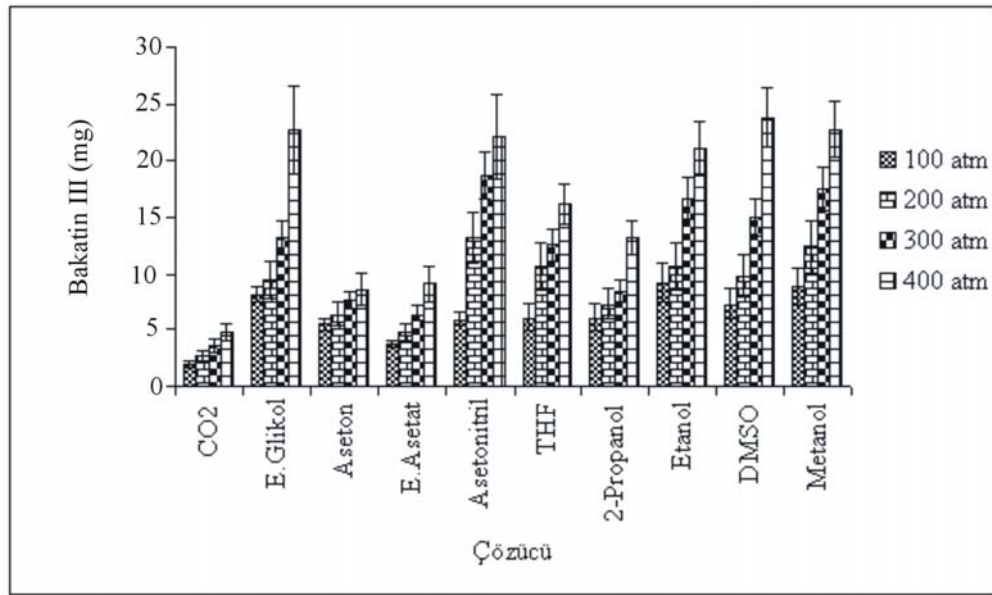


Şekil 4.34. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 100 μL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı

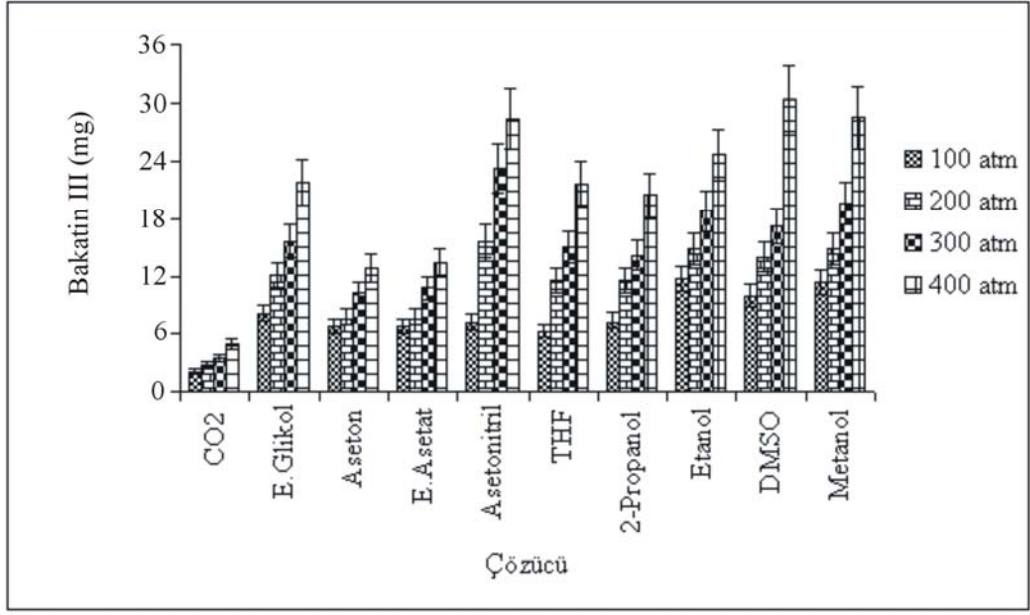


Şekil 4.35. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 100 μL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı

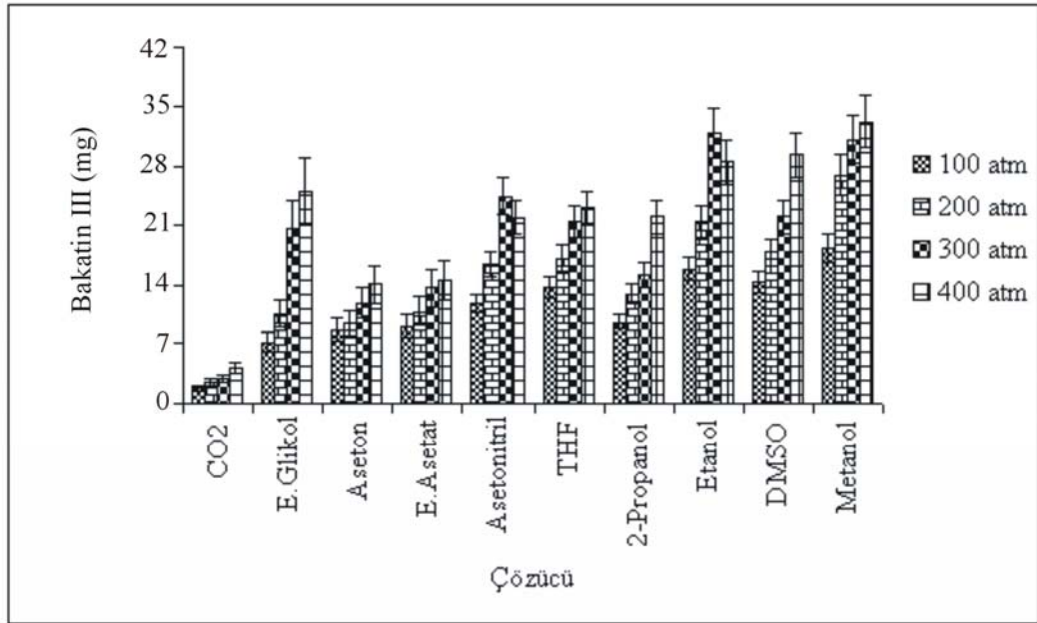
sc-CO₂ ekstraksiyonu esnasında 100 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucunda Bakatin III'ün eldesinde diğer taksanlarda olduğu gibi saf karbondioksit kullanımına göre bir artış sözkonusu olmaktadır. Kullanılan yardımcı çözücüler arasında değişen sıcaklık değerlerine göre elde edilen bakatin III oranında farklılıklar olmaktadır. Genel olarak bakıldığı zaman 10-DAB III, Paklitaksel ve Sefalomanin eldesinde en iyi yardımcı çözücü özelliği gösteren metanol, etanol ve DMSO'nun bu bileşiğin eldesinde de aynı etkiyi gösterdiği anlaşılmaktadır. Sadece saf CO₂ kullanılarak 45 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta, 1 kg bitkiden 3 mg oranında elde edilen bileşik; metanol, etanol ve DMSO kullanılması ile sırasıyla 23 mg, 20,4 mg ve 21 mg oranlarında elde edilmişlerdir. Kullanılan yardımcı çözücü hacminin 200 µL olması durumunda elde edilen veriler Şekil 4.36-38'da belirtilmiştir.



Şekil 4.36. sc-CO₂ ortamında 35 °C'de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı



Şekil 4.37. sc-CO₂ ortamında 40 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı



Şekil 4.38. sc-CO₂ ortamında 45 °C’de ve 200 µL yardımcı çözücü kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı

Yardımcı çözücü hacminin artırılması ile elde edilen bakatin III miktarında artış gözlenmiştir. 45 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta 200 µL metanol, etanol ve DMSO kullanılması sonucu 1 kg bitkiden elde edilen bakatin III miktarları 33 mg, 28 mg ve 29 mg olarak bulunmuştur.

sc-CO₂ ortamında damlatma yöntemi ile ekstraksiyonda yardımcı çözücü olarak kullanılan çözücülerin ekstraksiyon verimine etkisi göz önüne alındığında metanol, DMSO, etanol, etilen glikol, asetonitril, THF, 2-propanol, aseton ve etil asetat sırasında çözücülerin pozitif etki gösterdikleri belirlenmiştir. DMSO ve etilen glikolün ekstraksiyon verimine etkilerinin yüksek olmasına rağmen bu çözücülerin yüksek kaynama noktası ve viskoziteye sahip olmaları ekstraktan uzaklaştırılmalarını güçleştirmekte ve ekstraksiyonda kullanılmalarını kısıtlamaktadır. Kullanılan çözücüler arasında yüksek polariteye sahip olmaları, ekstraktan uzaklaştırma kolaylığı, ekstraksiyon verimine etkileri, karbondioksit ile homojen karışım oluşturabilme ve yapılarındaki H bağlarından dolayı matrisle etkileşim oranlarının artmasından dolayı metanol ve etanol en uygun çözücüler olarak tespit edilmiştir.

4.3.6. Süperkritik-Subkritik Karbondioksit ortamında yardımcı çözücü (modifier) kullanılarak yapılan deneyler

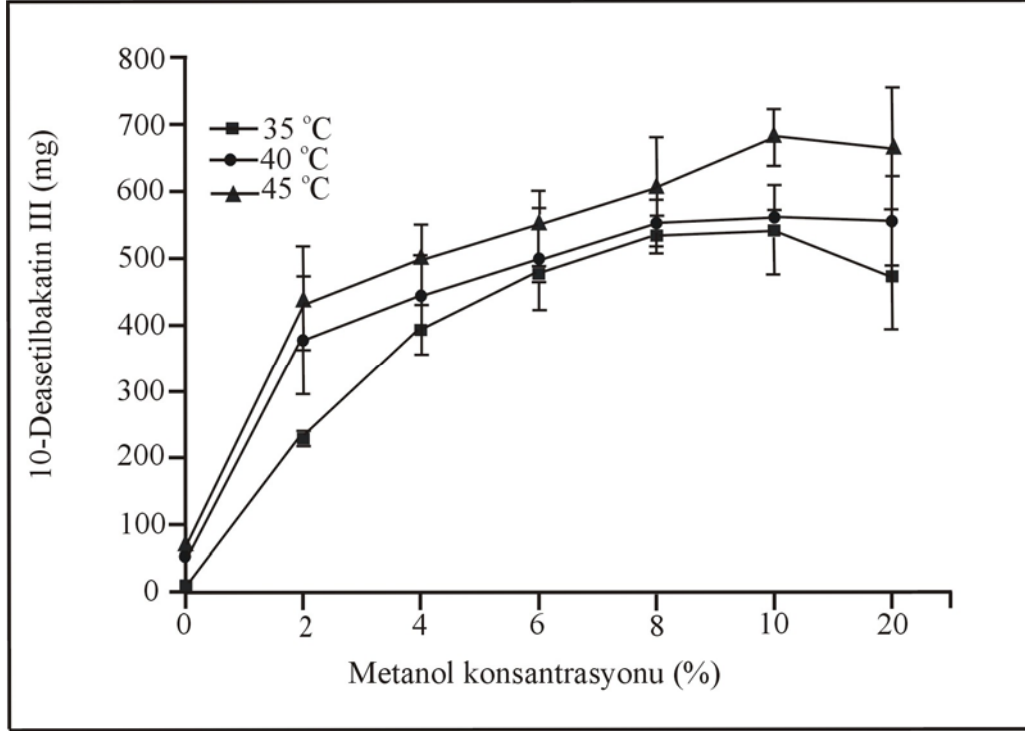
Süperkritik-subkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyonun bu aşamasında metanol ve etanol yardımcı çözücü olarak kullanılmış ve ikinci bir yüksek basınç pompası ile ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 20 oranlarında karbondioksit ile karıştırılarak bitkinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Deneyler 30 dakika statik ve 30 dakika dinamik ekstraksiyon sürelerinde, 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda, 400 atm basınçta gerçekleştirilmiştir. Süperkritik koşullarda karbondioksite yardımcı çözücü eklenmesi karbondioksitin kritik sıcaklık ve kritik basınç değerlerini değiştirmektedir. Ağırlıkça %5 metanol ve %5 etanolün karbondioksit ile karıştırılması durumunda 31 °C olan karbondioksitin kritik sıcaklığı metanol ve etanol eklenmesiyle sırasıyla 41,5 °C ve 42,5 °C olmaktadır [123]. Kullanılan yardımcı çözücü derişimine göre değişen kritik sıcaklık değerleri SF Solver 2000 programı ile hesaplanmış ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Yapılan deneylerde hedeflenen bileşiğin yapısının bozulmasını engellemek amacıyla maksimum sıcaklık olarak 45 °C belirlenmiştir. Belirlenen bu sıcaklık şartlarında karbondioksitin kritik şartlarının korunması ve maksimum sıcaklığın üzerine

çıkılmaması için kullanılması gereken maksimum metanol ve etanol oranı ağırlıkça %6'dır. Yardımcı çözücü hacminin belirtilen sıcaklık aralıklarında (35-45 °C) ağırlıkça %6'nın üstünde olması çalışılan ortamı süperkritik bölgeden subkritik bölgeye kaydırmaktadır [124].

Çizelge 4.3. Metanol ve Etanolün % ağırlığa göre değişen kritik sıcaklık ve basınç değerleri [130]

Metanol ve Etanol Konsantrasyonu (% Ağırlık)	Tc (°C) CO ₂ + MeOH	Pc (MPa) CO ₂ + MeOH	Tc (°C) CO ₂ +EtOH	Pc (MPa) CO ₂ + EtOH
0	31.3	7.3	31.3	7.3
3	35.8	7.9	37.8	8.1
5	41.3	7.4	42.5	7.3
10	51.8	7.4	53.2	7.2
15	61.8	7.6	63.3	7.2
20	72.7	7.5	76.1	7.1
100	239.4	8.1	243.3	6.1

Yapılan çalışmada ağırlıkça metanol ve etanol miktarı % 6'ya kadar olan kısımlar süperkritik karbondioksit ortamında ekstraksiyonu, ağırlıkça yardımcı çözücü miktarı %8- %20 oranları arasında kalan bölge subkritik karbondioksit (Near critical region) ortamında ekstraksiyonu belirtmektedir. Yardımcı çözücü oranlarının maksimum % 20'de tutulmasının sebebi karbondioksitin metanol ile maksimum %20 oranında homojen karışım oluşturmasıdır [125]. Metanolün yardımcı çözücü (co-solvent) olarak kullanıldığı süperkritik ve subkritik karbondioksit ekstraksiyon deneylerinin sonucu Şekil 4.39'de belirtilmiştir. Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyon deneylerinde 35 °C ve 400 atm. basınçta ağırlıkça % 2 metanol kullanılması durumunda ürün kazanımı 1 kg bitkiden 220 mg değerinde iken bu değer 45 °C sıcaklıkta ve 400 atm. basınçta ağırlıkça %6 metanol kullanımı ile birlikte 550 mg değerine yükselmiştir.

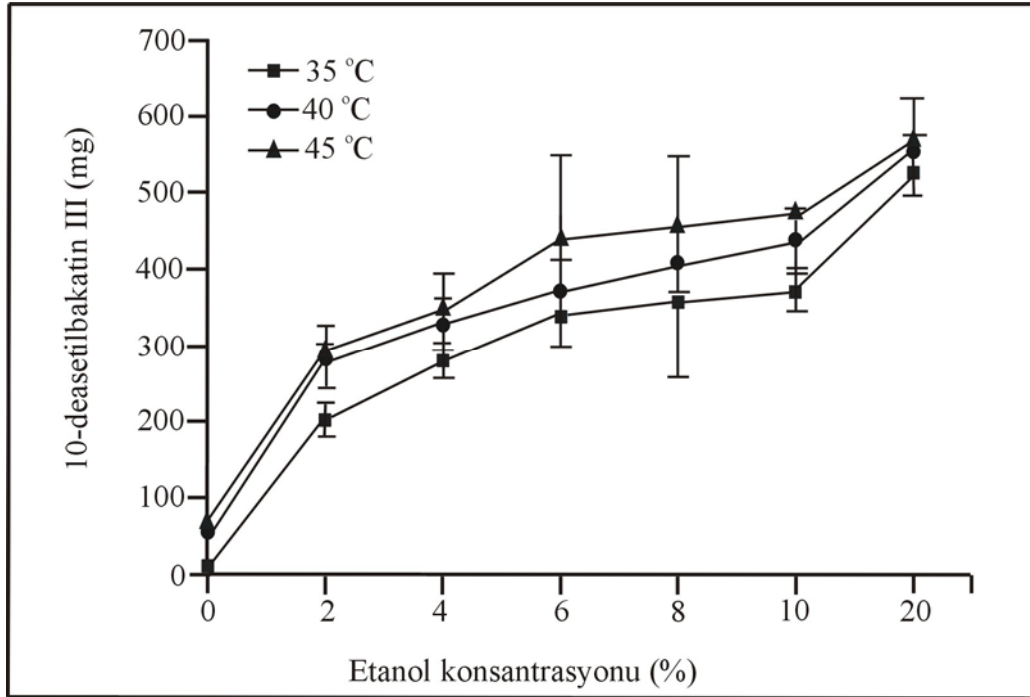


Şekil 4.39. sc-CO₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı

Subkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyon deneyleri sonucunda karbondioksit ile karıştırılan metanol yüzdesi arttıkça elde edilen ürün yüzdesinde artış sağlanmakta beraber bu değer %20-80 metanol-CO₂ kullanımında düşüş göstermektedir.(Şekil 4.39) Ağırlıkça % 8 metanol kullanımı ile birlikte 1 kg bitkiden elde edilen ürün kazanımı 35 °C ve 400 atm basınçta 530 mg iken, bu değer 45 °C ve 400 atm. basınçta ağırlıkça % 10 metanol kullanarak 681 mg değerine yükselmiştir fakat aynı şartlarda % 20 metanol kullanımı ile birlikte bu değer 660 mg değerine düşmüştür.

Metanol katkısı, sc-CO₂’in polaritesini artırarak, çözme gücünü arttırmış ve ekstrakt veriminde metanolün olumlu yönde etkisi gözlenmiş, en yüksek verimler %8-%20 metanol katkı değerlerinde elde edilmiştir. Bu değerlerde sistem “Yakın Kritik altı (NCL)” bölgededir ve bazı süperkritik CO₂ ekstraksiyon uygulamalarında bu bölgenin süperkritik akışkan ekstraksiyonu için belirtilen bölgeye göre ekstraksiyon verimliliğinin yüksek olduğu bildirilmektedir [126].

Etanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri sonucu Şekil 4.40'de belirtilmiştir. Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyon deneylerinde 35 °C ve 400 atm. basınçta ağırlıkça % 2 etanol kullanılması durumunda ürün kazanımı 1 kg bitkiden 200 mg değerinde iken bu değer 45 °C sıcaklıkta ve 400 atm. basınçta ağırlıkça %6 etanol kullanımı ile birlikte 440 mg değerine yükselmiştir.

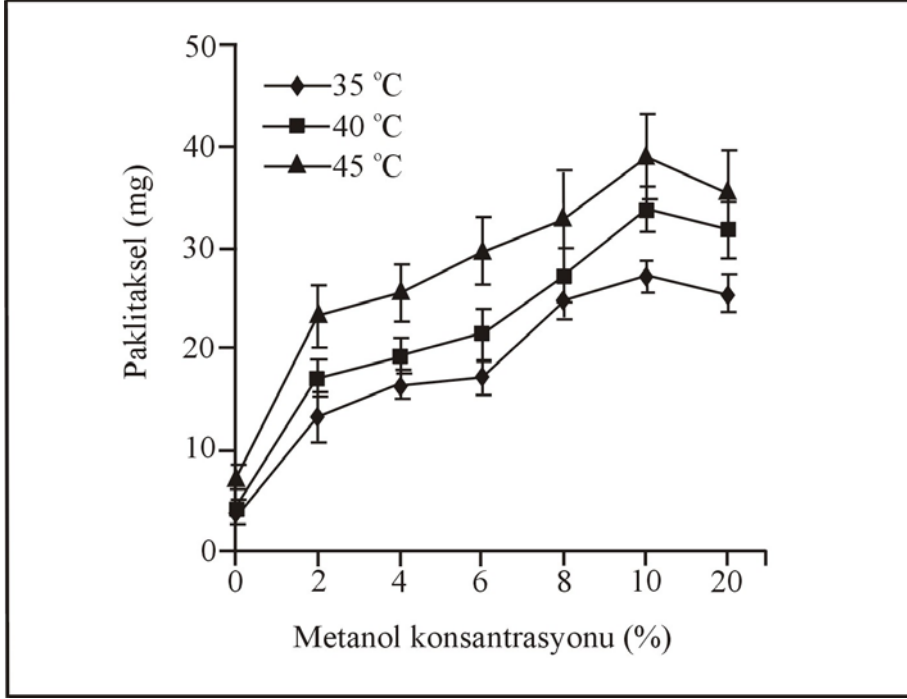


Şekil 4.40. sc-CO₂ ortamında 400 atm'de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen 10-DAB III miktarı

Subkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyon deneyleri sonucunda karbondioksit ile karıştırılan etanol yüzdesi arttıkça elde edilen ürün yüzdesinde artış sağlanmaktadır. Ağırlıkça % 8 etanol kullanımı ile birlikte 1 kg bitkiden elde edilen ürün kazanımı 35 °C ve 400 atm basınçta 350 mg iken bu değer 45 °C ve 400 atm. basınçta % 20 etanol kullanarak 560 değerine yükselmiştir.

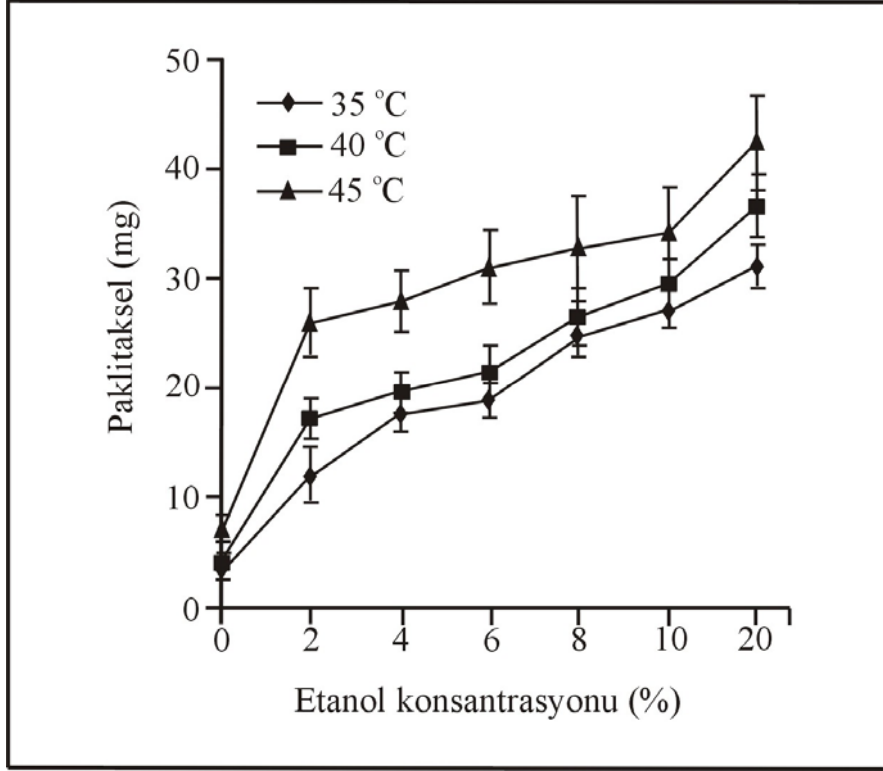
Metanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen paklitaksel miktarı Şekil 4.41'de belirtilmiştir. 35 °C sıcaklık

ve 400 atm. basınçta % 2 metanol kullanımı sonucu sonucunda 1 kg bitkiden elde edilen paklitaksel miktarı 13,2 mg oranında iken, 45 °C sıcaklıkta % 20 metanol kullanımı sonucunda bu değer 35,3 mg değerine yükselmiştir.



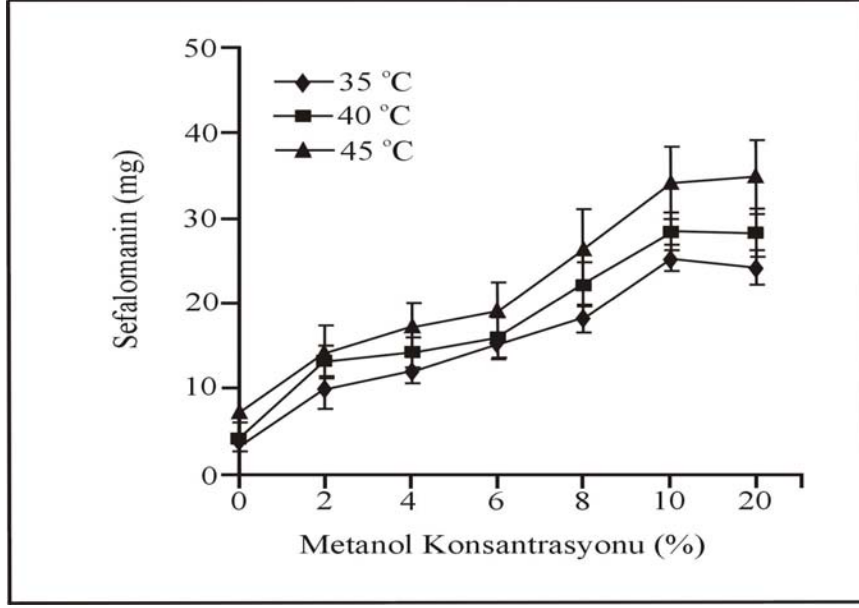
Şekil. 4.41. sc-CO₂ ortamında 400 atm'de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen paklitaksel miktarı

Etanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen paklitaksel miktarı Şekil 4.42'de belirtilmiştir. 35 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta % 2 etanol kullanımı sonucu sonucunda 1 kg bitkiden elde edilen paklitaksel miktarı 12,1 mg oranında iken, 45 °C sıcaklıkta % 20 etanol kullanımı sonucunda bu değer 42,3 mg değerine yükselmiştir.



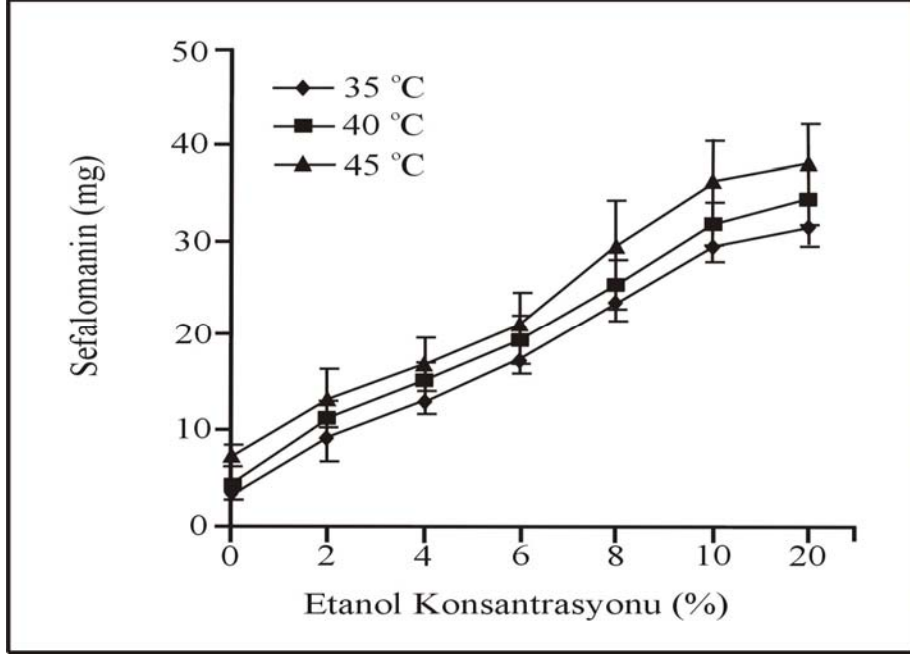
Şekil. 4.42. sc-CO₂ ortamında 400 atm'de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen paklitaksel miktarı

Metanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen sefalomanin miktarı Şekil 4.43'de belirtilmiştir. 35 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta % 2 metanol kullanımı sonucu sonucunda 1 kg bitkiden elde edilen sefalomanin miktarı 10,1 mg oranında iken, 45 °C sıcaklıkta % 20 metanol kullanımı sonucunda bu değer 34,9 mg değerine yükselmiştir.



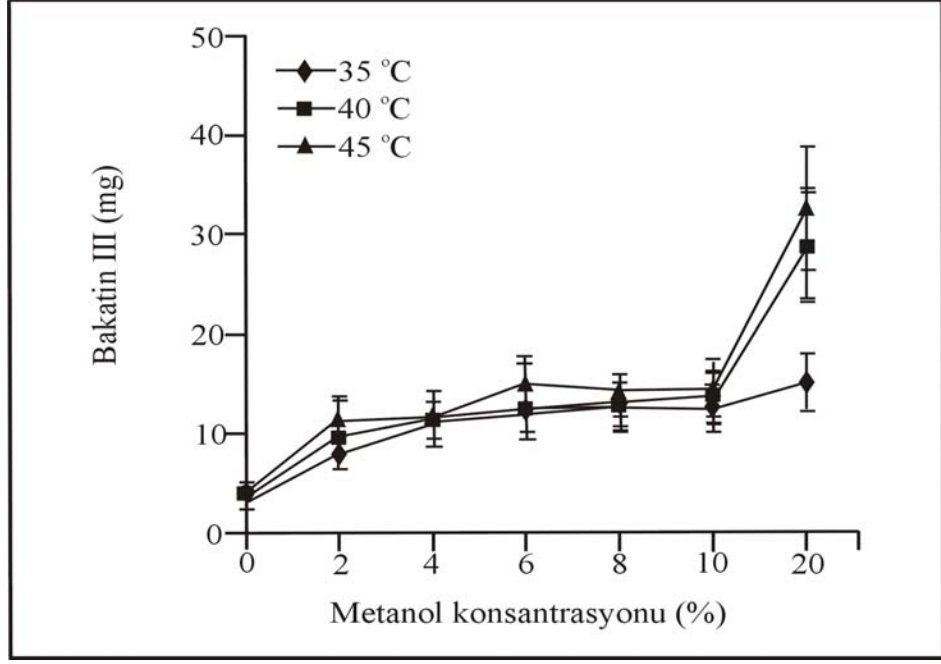
Şekil. 4.43. sc-CO₂ ortamında 400 atm'de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen sefalomanin miktarı

Etanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen sefalomanin miktarı Şekil 4.44'de belirtilmiştir. 35 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta % 2 etanol kullanımı sonucu sonucunda 1 kg bitkiden elde edilen sefalomanin miktarı 9,1 mg oranında iken, 45 °C sıcaklıkta % 20 etanol kullanımı sonucunda bu değer 37,9 mg değerine yükselmiştir.



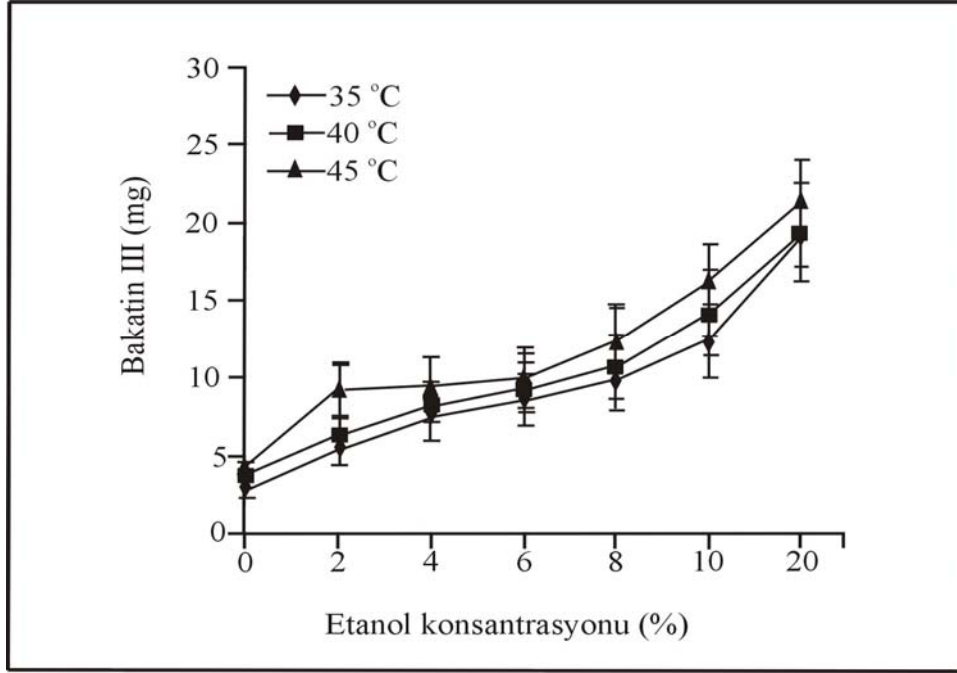
Şekil. 4.44. sc-CO₂ ortamında 400 atm'de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen sefalomanin miktarı

Metanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen Bakatin III miktarı Şekil 4.45'de belirtilmiştir. 35 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta % 2 metanol kullanımı sonucu sonucunda 1 kg bitkiden elde edilen Bakatin III miktarı 7,8 mg oranında iken, 45 °C sıcaklıkta % 20 metanol kullanımı sonucunda bu değer 32,6 mg değerine yükselmiştir.



Şekil 4.45. sc-CO₂ ortamında 400 atm'de farklı sıcaklıklarda metanol kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı

Etanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen Bakatin III miktarı Şekil 4.46'da belirtilmiştir. 35 °C sıcaklık ve 400 atm. basınçta % 2 etanol kullanımı sonucu sonucunda 1 kg bitkiden elde edilen Bakatin III miktarı 5,4 mg oranında iken, 45 °C sıcaklıkta % 20 etanol kullanımı sonucunda bu değer 21,9 mg değerine yükselmiştir.



Şekil 4.46. sc-CO₂ ortamında 400 atm’de farklı sıcaklıklarda etanol kullanımı sonucu elde edilen Bakatin III miktarı

Taksanların çözünürlüğü, yardımcı çözücünün buhar basıncı ile süperkritik akışkanın yoğunluğu arasındaki karmaşık bir ilişkiye bağlıdır. Bu ilişki sözü edilen üç değişken (basınç, sıcaklık ve yardımcı çözücü yüzdesi) tarafından kontrol edilmektedir. Belli bir basıncın altında, akışkan yoğunluğu azaldığı için akışkanın çözme gücü azalmakta, bu basınç değerinin üstünde ise, sıcaklıktaki bir artış, çözünen maddenin buhar basıncını artırdığından ekstraksiyon etkinliğini artırmaktadır. Bu nokta “dönüm (crossover) noktası” olarak adlandırılır ve çözünen madde ile akışkanın özelliklerine ve iç etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir [50,127,128].

Taksanların elde edilmesinde süperkritik akışkanların sıvılardan daha düşük viskozite ve daha yüksek difüzyon hızına sahip olması, yüksek ayırma verimliliğine sahip olduklarını gösterir. Süperkritik akışkanların bu özellikleri sıvı ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, bir katının veya sıvının ekstraksiyonunda kütle aktarım hızını artırıcı bir rol oynar. Aynı zamanda süperkritik akışkanların yüzey geriliminin sıfır olması, mikrogözenekli yapılar içine kolaylıkla difüze olabilmelerini sağlar [47].

4.4. *Taxus baccata* L.'nin Ekstraksiyonunda Kullanılan Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması

Taxus baccata L.'nin iğne yapraklarından taksanların ekstrakte edilmesi için kullanılan ekstraksiyon metotları ve bu metotlar sonucu elde edilen maksimum taksan miktarları Şekil 4.47'de belirtilmiştir. Taksanların elde edilmesinde Soxhlet ekstraksiyonunda etanolün çözücü olarak kullanıldığı, ultrasonik ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda ise metanolün çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyonlar sonucunda en iyi ekstraksiyon verimleri elde edilmiştir. *Taxus baccata* L.'den elde edilen taksan miktarlarına göre ekstraksiyon metotları karşılaştırıldığı zaman sırasıyla süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyon şeklinde ekstraksiyon verimlerinin arttığı gözlenmiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyon metotlarının ekstraksiyon sürelerinin kısa olması, minimum düzeyde çözücü harcanması ve ekstraksiyon sıcaklığının taksanların degrade olmasına olanak vermeyecek seviyede tutulması, bu metotları taksanların elde edilmesinde Soxhlet ekstraksiyonuna göre daha avantajlı bir konuma getirmektedir. Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen deneylerin yüksek verimle sonuçlanması, süperkritik akışkanların yoğunluğu dolayısıyla çözme gücü basınç ve sıcaklıkla ayarlanabilmesinden kaynaklanır. Çözme gücünün ayarlanabilir olması nedeniyle farklı basınç ve sıcaklıklarda çalışıldığında belli bir maddeye karşı seçilicilik artar ve çözünen maddelerin fraksiyonel olarak ayrılması sağlanır. İşlem sonunda sistemin basıncının düşürülmesiyle sc-CO₂ üründen tamamen ayrılır ve çözücü kalıntısı bırakmaz. Bu nedenle ürünün derişiklendirilmesi için ek bir işleme gerek duyulmaz. Böylece süreç basamakları azaltılmış olur [57,117,129,130].

		<u>Taksanlar (mg)</u>				
		<u>10-DAB III</u>	<u>Paklitaksel</u>	<u>Sefalomanin</u>	<u>Bakatin III</u>	
Ekstraksiyon Metotları	Soxhlet Ekstraksiyonu	Metanol	396	26	17	26
		Etanol	555	32	15	28
		Petrol Eteri	113	14	8	7
	Ultrasonik Ekstraksiyon	Metanol	111	12,3	13,2	13,1
		Etanol	102	9,3	9,4	12,4
	Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu	Metanol	718	38,2	28,6	33,3
		DMSO	626	37,3	37,2	29,4
		Etilen Glikol	490	35,3	12,2	25
		Etanol	605	42,1	23,1	28,5

Şekil 4.47. *Taxus baccata* L.'nin ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması ve elde edilen maksimum taksan miktarları

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Halen yumurtalık ve göğüs kanserinin tedavisinde kullanılan paklitaksel (Taksol A) , paklitaksele göre daha düşük antikanser etkiye sahip olan sefalomanin (Taksol B) ve paklitakselin yarı sentetik olarak sentezlenmesinde kullanılan 10-Deasetilbakatin III ve Bakatin III'ün, *Taxus Baccata* L. ağacının yapraklarından süperkritik karbondioksit ortamında ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma *Taxus Baccata* L. ağacının Türkiye'de yetişen türünü kapsamaktadır. Soxhlet ekstraksiyonu ile gerçekleştirilen deneylerde maksimum verim çözücü olarak etanolün kullanıldığı deneylerde elde edilmiştir. Etanol kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda 1 kg yapraktan maksimum 555 mg 10-DAB III, 32 mg paklitaksel, 15 mg sefalomanin ve 28 mg bakatin III elde edilmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon metodunun kullanıldığı deneylerde maksimum taksan miktarı 60 dakikalık ekstraksiyon süresi sonunda çözücü olarak metanolün kullanıldığı deneylerde elde edilmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon sonucunda 1 kg yapraktan maksimum 111 mg 10-DAB III, 12.3 mg paklitaksel, 13.2 mg sefalomanin ve 13.1 mg bakatin III elde edilmiştir.

Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen deneylerde matriksin tanecik boyutu, sıcaklık, basınç ve ortamın polaritesini artırmak için kullanılan yardımcı çözücülerin reaksiyon verimine önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. sc-CO₂ deneylerinde kullanılan tanecik büyüklüğünün azaltılması ile aktarım yüzey alanının arttığı, kütle aktarım dirençlerinin azaldığı ve küçültme esnasında yapıdaki hücrelerin bir kısmının bozulması sonucunda ekstraksiyon veriminin arttığı tespit edilmiştir. Basınç ve sıcaklık, süperkritik CO₂ ile ekstraksiyon işleminde çözücünün çözme gücü üzerine önemli etkiler yapmaktadır. Sıcaklık ve basıncın artırılması ile süperkritik akışkanın yoğunluk, difüzyon katsayısı ve viskozite gibi fiziksel özelliklerinin değişmesi nedeniyle, bu parametrelerin ekstraksiyon verimi üzerinde etkili oldukları gözlenmiştir. sc-CO₂ ortamında gerçekleştirilen deneylerde 45 °C ve 400 atm basınçta maksimum ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Karbondioksitin polaritesini artırmak amacıyla kullanılan dokuz farklı yardımcı çözücünden metanol, etanol, etilen glikol ve dimetil sülfoksitin diğer yardımcı çözücülere kıyasla ekstraksiyon verimini arttıran en iyi yardımcı çözücüler olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte etilen glikol ve dimetil sülfoksitin yüksek kaynama noktası ve

yüksek viskoziteye sahip olmaları bu çözücülerin ekstraktan ayrılmasını güçleştirmesi nedeniyle ekstraksiyon deneyleri için uygun olmadığına karar verilmiştir.

Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen deneylerde damlatma metodu ile 200 µL metanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı deneylerde 10-deasetilbakatin III miktarı sıvı kromatografisi analizleri sonucu 1 kg yapraktan maksimum 718 mg ve % 10 metanol kullanılarak yapılan deneylerde 681 mg olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile 1 kg yapraktan 42,1 mg paklitaksel, 37,2 mg sefalomanin ve 33,3 mg bakatin III maksimum miktarlarda elde edilmiştir.

Yapılan ekstraksiyon deneyleri sonucunda, yardımcı çözücünün ekstraksiyon hücresine direkt enjekte edilmesinin ekstraksiyon verimi üzerine daha olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir.

Süperkritik akışkanların düşük yüzey gerilimine ve viskoziteye sahip olması bu akışkanların katı matrikslere daha kolayca difüzyonunu sağlayarak kütle aktarımını arttırması ve hızlandırması bağlı olarak, süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyon deneylerinde 30 dakika statik ve 30 dakika dinamik ekstraksiyon süresi sonucunda taksanların alınabileceği belirlenmiştir.

Modifier kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde, subkritik karbondioksit ve süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen deneyler kıyaslandığı zaman subkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen deneylerin ekstraksiyon verimlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Taxus baccata L.'den elde edilen taksan miktarlarına göre ekstraksiyon metotları karşılaştırıldığı zaman sırasıyla süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyon şeklinde ekstraksiyon verimlerinin arttığı gözlenmiştir.

Taksanların elde edilmesinde ekstraksiyon verimini arttırmak için yapılacak ileriye yönelik çalışmalarda, ultrasonik ekstraksiyon metodu kullanıldığında, bitki ile etkileşen çözücü miktarı ve ekstraksiyon süresinin arttırılması, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda ise basıncın arttırılması ile artan çözücü yoğunluğu ve buna bağlı olarak artan matriks-çözücü etkileşmesi ile bitkiden ekstrakte edilen taksan miktarı arttırılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Kaya, G. “ Tıbbi Bitki rezervi olarak orman kaynaklarının gelecek değerinin belirlenmesinde kullanılan P&P modelinin irdelenmesi” ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi, **8 (9):**23-32, (2006)
- [2] Topcu, G. “Biyoaktif organik bileşiklerin doğadan keşfi” XXI. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos, Malatya, (2007)
- [3] Grabley S, Thiericke R (Eds). Drug Discovery from Nature, Springer, Berlin, 347 s. (2000)
- [4] Erişim: <http://en.wikipedia.org/wiki/Taxol> [22 Nisan 2009]
- [5] Solomons G, Fryhle C. Organic Chemistry Eight Edition. John Willey& Sons, Inc. 1258 s. (2006)
- [6] Erişim: <http://www.kanser.org> [18 Mart 2009]
- [7] Yuan, H. “Studies on the chemistry of Paclitaxel” PhD Thesis Submitted to the Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 167 s. (1998)
- [8] Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M. “Natural products in drug discovery and development” J.Nat.Prod.,**60:52**, (1997)
- [9] Eyre, D.H., Harrison, J.W., Scrowston, R.M., Lythgoe, B., Proc.Chem.Soc., 271, (1963)
- [10] Kurono, M., Nakadaira, Y., Onuma, S., Sasaki, K., Nakanishi, K., Tetrahedron Lett., 2153, (1963).
- [11] Ueda, K., Uyeo, S., Yamamayo, Y., Maki, Y., Tetrahedron Lett. 2167, (1963).
- [12] a) Chan, W.R., Hassal, T.G., Hornby, G.M., Oxford, A.W., Sabel, W., Bjammer, K., Ferguson, G., Monteath, R.J., J.Chem.Soc., Chem.Comm., 923, (1966).
b) Della Casa de Marcano, D.P., Hassal, T.G., J.Chem.Soc., Chem.Comm., 1282, (1969).
c) Della Casa de Marcano, D.P., Hassal, T.G., J.Chem.Soc., Chem.Comm., 216, (1970)

- [13] Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., Mc Phail A.T., “Plant Antitumor gents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus Brevifolia*, J.Am.Chem.Soc, **93**:2325.(1971)
- [14] Borman, S. “Chemical-Engineering-Ready for Space” Chem.Eng. News, **69**:11, (1991)
- [15] Fuchs, D.A., Johnson, R.K., Cancer Treat. Repts, **62**: 1219,(1978)
- [16] Schiff, P., Fant, J., Horwitz, S.B., Nature, **22**: 665, (1979)
- [17] Rose, W.C., Crosswell, A.R., Cassaza, A.M, Proc. Am. Assoc. Cancer. Res., **33**: 518, (1992)
- [18] Mc Guire, W.P., Rowinsky, E.K., Rosenheim, N.B., Grumbine, F.C., Ettinger, D.S., Armstrong, D.K., Donehower, R.C. “Taxol- a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms” Ann.Intern.Med.,**111**: 273, (1989)
- [19] Holmes, F.A., Walters, R.S., Thierault, R.L., Forman, A.D., Newton, L.K., Raber,M.N., Buzdar, A.U., Frye, D.K., Hortobagyi, G.N. “Phase II-Trial of Taxol, an active-drug in the treatment of metastatic breast-cancer” J.Natl.Cancer.Inst, **83(24)**:1797-1805,(1991)
- [20] Murphy, W.K., Fossela, F.V., Winn, R.J. “Phase II-study of Taxol in patients with untreated advanced non-small-cell lung-cancer” J. Natl. Cancer. Inst, **85(5)**:384-388,(1993)
- [21] Holton, R.A., Biegiger, R.J., Boatman, P.D., “Semisynthesis of Taxol and Taxotere. In Taxol: Science and Applications, Suffness,M. Ed; CRC Pres: Boca Rolton, FL,(1994)
- [22] Suffness, M., In.Ann. Repts.Med.Chem. Bristol, J.A.,Ed; Academic Pres; San Diego, CA, 305, (1993)
- [23] Holton, R.A., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F., Biegiger, R.J., Boatman, P.D., Shindo, M., Smith, C.C., Kim,S., Nadizadeh, H., Suzuki,Y., Tao, C., Ju, P., Tang, S., Zhang,P., Murthi, K.K., Gentile, L.N., Liu, J.H., “First Total Synthesis of Taxol.1. Functionalization of the B-Ring. Journal of the American Chemical Society. **116(4)**: 1597-1598, (1994)

- [24] Nicolaou, K.C., Yang, Z., Liu, J.J., Ueno, H., Nantermet, P.G., Guy, R.K., Claiborne, C.F., Renaud, J., Couladouros, E.A., Paulvanan, K., Sorensen, E.J. “Total Synthesis of Taxol, Nature, **367(6464):** 630-634(1994)
- [25] Erişim: <http://www.wikipedia.com/docetaxel> [22 Nisan 2009]
- [26] Guénard, D., Gueritte-Voegelein, F., Potier, P., “Taxol and Taxotere: Discovery, Chemistry, and Structure-Activity Relationship, Acc.Chem.Res, **26:**160,(1993)
- [27] Erişim: <http://www.en.wikipedia.org/wiki/Taxotere> [22 Nisan 2009]
- [28] Erişim: <http://www.Bahcesel.com> [18 Mart 2009]
- [29] Erişim: <http://www.DogalTEDAVI.net> [18 Mart 2009]
- [30] Erişim: <http://www.ogm.gov.tr> [18 Mart 2009]
- [31] Baloğlu, E., Kingston, D.G.I., “The Taxane Diterpenoids” J.Nat.Prod, **62:** 1448-1472, (1999)
- [32] Baloğlu,E., “A new Synthesis of Taxol from Baccatin III” Master Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 69 s.(1998)
- [33] Erişim: <http://www.kimyaevi.org> [12 Nisan 2009]
- [34] Krukoniş,V., In European Pharmaceutical Contractor, EPC, May, London, (1998)
- [35] Gizir A.M., PhD Thesis Submitted to the School of Chemistry, Leeds University, Leeds, 139 s. (1998)
- [36] Erişim: <http://www.nottingham.ac.uk> [19 Mart 2009]
- [37] Erişim: <http://www.kobelco.co.jp> [2 Mayıs 2009]
- [38] Kayan, B., Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen-bilimleri Enstitüsü, Temmuz, 89 s.(2004)
- [39] Mukhopadhyay,M., “Natural Extract Using Supercritical carbon dioxide, CRC Pres, LLC, Boca Raton, Florida, USA, (2000)
- [40] Castro,M.D.L., Valcàrcel, M., Tena, M.T. “ Analytical Supercritical Fluid Extraction” Springer-Verlag-Cordoba, May, (1994)
- [41] McHugh, M.A., Krukoniş, V.J., “Supercritical Fluid Extraction”, Butterworths,Boston/USA, (1986)
- [42] Dinçer, S., Akgün, N., Akgün, M., Akgerman, A., “An Overview of Supercritical Fluid Extraction”, Proc., World Conference and Exhibition on

- Oilseed and Edible Oils Processing: Emerging Technologies, Current Practices, Quality Control, Technology Transfer and Environmental Issues, 235-242, Illinois, USA, (1998)
- [43] Aktas, Z., Olcay A., “Supercritical Toluene Extraction of a Reduced Turkish Lignite”, *Fuel Processing Technology*, **48(1)**:61-72, (1996)
- [44] Sunol, A.K., Beyer, G.H., “Mechanism of Supercritical Extraction of Coal”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **29(5)**:842-849, (1990)
- [45] Lepilleur, C., Beckman, E.J., Schonemann, H., Krukoniš V.J., “Effect of Molecular Architecture on the Phase Behavior of Fluoroether-Functional Graft Copolymers in Supercritical CO₂”, *Fluid Phase Equilibria*, **134**: 285-305, (1997)
- [46] Cansel, F., Aymonier, C., Loppinet-Serani, A., “Review on Materials Science and Supercritical Fluids”, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **7**: 331–340, (2003)
- [47] Dinçer, S., Acaralı, N.B., Uzun, İ.N., Deniz, D. “ A Second Option in Special Separation Operations; Supercritical Fluid Processes, *Journal of Engineering and Natural Science, Sigma*, **25(2)**: 106-128, (2007)
- [48] Miller, D.J., Hawthorne, S.B., Gizir, A.M., Clifford, A.A. “[Solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcritical water from 298 K to 498 K](#)” *Jornal of Chemical and Engineering Data*, **43(6)**: 1043-1047,(1998)
- [49] Dean J.R., Khunder,S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **15**: 875, (1997)
- [50] Çalımlı,A., “Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi” BAP Sonuç Raporu, Ankara Üniversitesi, (2003)
- [51] Moyler, D.A., Extraction of flavours and fragrances, in extraction of Natural Products Using Near-Critical solvents, King, M.B., and Bott, T.R., Ed; Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman& Hall, Glasgow, (1993)
- [52] Rizvi, S. S. H., Yu, Z. R., Bhaskar, A. R., and Raj, C. B. C., “Fundamentals of processing with supercritical fluids”, in *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*, Blackie Academic Professional, an imprint of Chapman & Hall, Glasgow, 1,(1994)

- [53] Wang,L., Weller, C.L., “Recent advanced in extraction of nutraceuticals from plants” Trends in Food Science & Technology, **17**: 300-312, (2006)
- [54] Erişim: <http://www.tr.wikipedia.org/soxhlet> [18 Mart 2009]
- [55] Halliday,D., Resnick,R., Fiziğın Temelleri-1 (Çeviren Prof.Dr. Cengiz Yalçın) 3.Basım,368-369, (1992)
- [56] Erte, E., “Siyah üzümde (*Vitis vinifera L.*) bulunan Resveratol’ün üretim veriminin arttırılmasına ses ötesi dalgaların etkisi.Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Ankara, (2007)
- [57] Kılıç, A., “Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri” Bartın Orman Fakültesi Dergisi, **10(13)**: 37-45, (2008)
- [58] Kaufmann, B., Christen, P., “Recent Extraction Techniques For natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurized Solvent Extraction, Phytochemical Analysis, **13**: 105-113, (2002)
- [59] Beejmohun,J., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek,L., Christen,P., Kovensky,J., Fliniaux,M., Mesnard,F., “Microwave-Assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed, Phytochemical Analysis,**18**: 275-282,(2007)
- [60] Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. “ Accelerated solvent extraction: A technology for sample preparation.” Analytical Chemistry, **68**: 1033-1039, (1996)
- [61] Galip, F., “Bögürtlen Meyvesinin Karbondioksit ile Süperkritik Ekstraksiyonundan Doğal Boyar Madde Eldesi ve Uygulanabilirliğı” Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2007)
- [62] Koga,Y., Iwai, Y, Hata, Y., Yamamoto, M., Arai,Y. “ Influence of Cosolvent on Solubilities of Fatty Acid and Higher Alcohols in Supercritical Carbon dioxide”, Fluid Phase Equilib, **125**:115, (1996)
- [63] Walsh, J.M., Ikonomou,G.D., Donohue,M.D. “Supercritical Phase behavior: the entrainer effect, Fluid Phase Equilib, **33**: 295, (1987)
- [64] Temelli, F., Üstündağ, G.Ö. “ Solubility behavior of tenary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects” Journal of Supercritical Fluids, **36**: 1-15, (2005)

- [65] Foster, N.R., Singh, H., Yun, Y.S.L., Tomasko, D.L., Macnaughton, S.J. “ Polar and nonpolar cosolvent effects on the solubility of cholesterol in supercritical fluids” *Ind. Eng. Chem.Res.***32**: 2849, (1993)
- [66] Singh, H., Yun, Y.S.L., Macnaughton, S.J., Tomasko, D.L., Foster, N.R. “ Solubility of cholesterol in supercritical ethane and binary gas mixtures containing ethane”, *Ind.Eng. Chem.Res.***32**: 2841(1993)
- [67] Saquing, C.D., Lucien, F.P., Foster, N.R. “ Steric effects and preferential interactions in supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **37**: 4190, (1998)
- [68] Reichardt, C. “ Solvent and solvent effects in Organic Chemistry” VCH Publishers, New York, (1998)
- [69] Kamlet, M.J., Taft, R.W. “ The solvatochromic comparison method. I.The β -scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities” *J.Am.Chem.Soc.* **98**: 377,(1976)
- [70] Kamlet, M.J., Abboud, J.L., Taft, R.W. “The solvatochromic comparison method.6. The π^* scale of solvent polarities” *J.Am.Chem.Soc.*, **99**: 6027, (1977)
- [71] Jeffrey, G.A. “An Introduction to Hydrogen Bonding” Oxford University Pres, Inc., New York, (1997)
- [72] Hoffmann, M.M., Conradi, M.S. “Are there hydrogen bonds in supercritical methanol and ethanol?” *J.Phys.Chem.B*, **102**: 263, (1998)
- [73] Lalanne, P., Tassaing,T., Danten,Y., Besnard,M. “ Raman and infrared studies of hydrogen-bonding in supercritical ethanol” *J.Mol.Liq.* **98-99**: 210, (2002)
- [74] Fulton, J.L., Yee, G.G., Smith, R.D. “ Hydrogen Bonding of methyl alcohol-*d* in supercritical carbon dioxide and supercritical ethane solutions, *J.Am.Chem.Soc.***113**: 8327, (1991)
- [75] Denis, J.N., Greene,A.E., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F.,Mangatal,L., Potier,P., “A Highly efficient,pratical approach to Taxol”, *J.Am.Chem.Soc.*, **110**: 5917, (1988)

- [76] Talebi, M., Ghassempour, A., Talebpour, Z., Rassouli, A., Dolatyari, L. "Optimization of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata* L. by the use of microwave energy" *J. Sep. Sci.*, **27**: 1130-1136, (2004)
- [77] Mroczek, T., Glowniak, K. "Solid-phase extraction and simplified high-performance liquid chromatography determination of 10-deacetylbaccatin III and related taxoid in yew species" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **26**: 89-102, (2001)
- [78] Kukuchi, Y., Kawamura, F. "Liquid carbon dioxide extraction of Taxol and its related compounds from the needles of *Taxus cuspidata*" *Holz als Roh-und Werkstoff*, **57**:12,(1999)
- [79] Vandana, V., Teja, A.S, Zalkow, L.H. "Supercritical Extraction and HPLC Analysis of Taxol from *Taxus brevifolia* using Nitrous oxide and Nitrous Oxide+Ethanol Mixtures", *Fluid Phase Equilibria*, **116**: 162-169, (1996)
- [80] Glowniak, K., Mroczek, T. "Investigations on Preparative Thin-Layer Chromatographic Separation of taxoids from *Taxus baccata* L.", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*, **22(16)**: 2483-2502, (1999)
- [81] Kawamura, F., Kukuchi, Y., Ohira, T., Ytagai, M. "Accelerated Solvent Extraction of Paclitaxel and Related Compounds from the bark of *Taxus cuspidata*", *J. Nat. Prod.*, **62**: 244-247, (1999)
- [82] Nguyen, Y., Eshraghi, J., Gonyea, G., Ream, R., Smith, R. "Studies on factors influencing stability and recovery of paclitaxel from suspension media and cultures of *Taxus cuspidata* cv. *Densiflora* by high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography A*, **911**: 55-61, (2001)
- [83] Chun, M.K., Shin, H.W., Lee, H. "Supercritical fluid extraction of paclitaxel and baccatin III from needles of *Taxus Cuspidata*", *J. Supercr. Fluids*, **9**, 19 (1996)
- [84] Vandana, V., Teja, A.S. "The solubility of Paclitaxel in supercritical CO₂ and N₂O", *Fluid Phase Equilibria*, **135**: 83-87, (1997)
- [85] Saicic, R.N., Matovic, R., Cekovic, Z. "Semisynthesis of Taxol and improved procedure for the isolation of 10-deacetylbaccatin III" *J. Serb. Chem. Soc.*, **64(9)**: 497-503, (1999)

- [86] Suffness, M., Wall, M.E. “ In Taxol: Science and Applications” Suffness,M.,Ed; CRC Pres: Boca Raton,FL,(1995)
- [87] Patel, R.N.,Banerjee, A., Nanduri, V., “Enzymatic acetylation of 10-deacetylbaccatin III to baccatin III by C-10 deacetylase from *Nocardioideus luteus* SC 13913” *Enzyme and Microbial Technology*, **27**: 371-375, (2000)
- [88] Mattina, M.J.I., Berger, W.A.I., Denson, C.L. “Microwave-Assisted Extraction of Taxanes from *Taxus* Biomass” *J.Agric.Food.Chem*, **45**: 4691-4696,(1997)
- [89] Witherup, K.M., Look, S.A., Stasko, W., Ghiorzi, T.J., Muschix, G.M., Cragg, M.G. “*Taxus* Spp.Needles contain amounts of Taxol Comparable to the Bark of *Taxus brevifolia*: Analysis and Isolation” *Journal of Natural Products*, **53(5)**: 1249-1255, (1990)
- [90] Theodoridis, G., Haasnoot,W., Cazemier,G., Schilt,R., Jaziri,M., Diallo,B., Ppadoyannis, I.N., Jong de,G.J. “ Immunoaffinity chromatography for the sample pretreatment of *Taxus* plant and cell extracts prior to analysis of taxanes by high-performance liquid chromatography” *Journal of Chromatography A*, **948**: 177-185, (2002)
- [91] Theodoridis, G., Jong de,G.J., Laskaris, G., Verpoorte, R. “Application of SPE for the HPLC Analysis of Taxanes from cell cultures” *Chromatographia*, **47(1-2)**: 25-34,(1998)
- [92] Heaton, D.M., Bartle, K.D., Rayner ,C.M., Clifford,A.A. “Application of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography to production of taxanes as anti-cancer drugs”, *Journal of High Resolution Chromatography*,**16**: 666-670, (1993)
- [93] Cao,X., Tian,Y., Zhang, Y.T., Ho,Y. “Separation and purification of 10-deacetylbaccatin III by high-speed counter-current chromatography” *Journal of Chromatography A*, **813**: 397-401,(1998)
- [94] Suleiman,D., Estévez,A.L., Pulido,J.C., Garcia, J.E., Mojica,C. “Solubility of Anti-Inflammatory, Anti-Cancer, and Anti-HIV drugs in supercritical CO₂” *J.Chem.Eng.Data*, **50**:1234-1241, (2005)

- [95] Bollero, M., Loi, M.C., van Rozendaal, E.L.M., van Beek, T.A., van de Haar, C., Poli, F., Appendino, G. “ Analysis of pharmaceutically relevant taxoids in wild yew trees from sardinia” *Fitoterapia*, **74**: 34-39, (2003)
- [96] Wianowska, D., Hajnos, M., Dawidowicz, A.L., Oniszczyk, A., Weksmundzka, H., Glowniak, K. “ Extracion Methods of 10-deacetylbaaccatin III, Paclitaxel and Cephalomanine from *Taxus baccata* L. Twings: A Comarison” *Journal of Liquid Chrom& Rel. Tech.*, **32**: 589-601, (2009)
- [97] Pinol, M.T., Alfermann, A.W., Palazon, J., Cusido, R.M., Garden, H., Osorio, A.N. “ Taxol and baaccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* i an airlift bioreactor” *J. Plant Physiol.* **159**: 97-102, (2002)
- [98] Khosroushahi, A.Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R., Omidi, Y. “ Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*” *Cell Biology International*, **30**: 262-269, (2006)
- [99] Hook, I., Poupat, C., Ahond, A., Guénard, D., Guéritte, F., Adeline, M.T., Wang, X.P., Dempsey, D., Breuillet, S., Potier, P. “ Seasonal variation of neutral and basic taxoids contents in shoots of European Yew (*Taxus baccata*)” *Phytochemistry*, **52**: 1041-1045, (1999)
- [100] Nalensik, C.A., Hansen, B.N., Hsu, T.J. “ Solubility of pure Taxol in supercritical carbon dioxide” *Fluid Phase Equilibria*, **146**: 315-323, (1998)
- [101] Vesela, D., Saman, D., Valterova, I., Vanek, T. “ Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L.” *Phytochemical Analysis*, **10**: 319-321, (1999)
- [102] Nakajima, N., Mikuni, K., Masuoka, N., Ishihara, K., Hamada, H. “ Enhancement of water-solubility and bioactivity of Paclitaxel using modified cyclodextrins” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102(4)**: 369-371, (2006)
- [103] Ketchum, R.E.B., Luong, J.V., Gibson, D.M. “ Efficient extraction of paclitaxel and related taxoids from leaf tissue of Taxol using a potable

- solvent system” Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **22(11)**:1715-1732, (1999)
- [104] Lou H., Zhang, L., Gu, GB., Efferth, T., Liu, W., Zu, Y.G., Sun, R., Fu, Y.J. “Simultaneous determination of main taxoids in *Taxus* needles extracts by solid-phase extraction high-performance liquid chromatography with pentafluorophenyl column” Biomedical Chromatography, **23**: 63-70, (2003)
- [105] Jennings, D. W., Howard, M. D., Zalkow, L. H., and Teja, A. S. “Supercritical extraction of taxol from the bark of *Taxus brevifolia*” Spec. Symp. Issue J. Supercritical Fluids, **5(1)**:1, March, (1992)
- [106] Erişim: <http://www.kimyasal.net> [2 Nisan 2009]
- [107] Erdemoğlu, N. “ Türkiye’de Yetişen *Taxus Baccata* L. Bitkisinin Taxan Türevi Bileşikleri Üzerinde Araştırmalar”. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, 92-93. (1999)
- [108] Yılmaz, N. “Uludağ’da yetişen *Taxus baccata*’nın (porsuk ağacı) baccatin III açısından kimyasal bileşiminin incelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, (2002)
- [109] Biberöğlu, G. “ Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanılması” T.Klin.Tıp Bilimleri, **23**: 491-498, (2003)
- [110] Gündüz T. In Instrumental Analiz. Kütle spektrometresi. 255-275.(1988)
- [111] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. “Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules” Science, **6**: 64-71. (1989)
- [112] Sannes-Lowery KA, Hofstadler SA. “Characterization of multipole storage assisted dissociation: implications for electrospray ionization mass spectrometry characterization of biomolecules” J Am Soc Mass spectrom; **11**: 1-9,(2000)
- [113] Granot, O., Amirav, A. “ LC-MS with electron ionization of cold molecules in supersonic molecular beams” International Journal of Mass Spectrometry, **244**: 15-28, (2005)

- [114] Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. In principles of instrumental analysis. Molecular mass spectrometry. Philadelphia: Saunders College Publishing,; 498-534. (1998)
- [115] Beike, J., Karger, B., Meiners, T., Brinkmann, B., Köhler, H. “ LC-MS determination of *Taxus* alkaloids in biological specimens” Int.J. Legal.Med, **117**: 335-339, (2003)
- [116] Volk, K.J., Hill, S.E., Kerns, E.H., Lee, M.S. “Profiling degradants of paclitaxel using liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry substructural techniques”, J.of Chromatography B, **696**: 99-115, (1997)
- [117] Lang, Q., Wai, C.M., “Supercritical Fluid Extraction in Herbal and Natural Product Studies-A Practical Review”, Talanta, **53**: 771–782, (2001).
- [118] Çalımlı, A. “Susam yağının süperkritik akışkanlar ile ekstraksiyonu ve matematik modelleme” BAP Sonuç Raporu, Ankara Üniversitesi, (2007)
- [119] Careri M., Furlattini L., Mangia A., Musci M., Anklam E., Theobald A., Von Holst C. “Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in spirulina pacifica algae: a chemometric approach.” J. Chromatography A, **912 (1)**: 61-71,(2001).
- [120] Erişim: <http://www.criticalprocesses.com> [22 Nisan 2009]
- [121] Vega P. J., Balaban M. O., Sims C. A., O’keefe S. F. and Cornell J. A. “Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM.” J. Food Science, **61 (4)**: 757-765,(1996)
- [122] Barth M.M., Zhou C., Kute K.M. and Rosenthal G.A. “Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue.” J. Agric. Food Chem., **43**: 2876-2878,(1995)
- [123] Gurdial, G.S., Foster, N.R., Jimmy Yun, S.L., Tilly, K.D. “Phase behavior of supercritical fluid-entrainer systems” Fundamentals and Applications, ACS Symposium Series, Kiran,E., Brennecke,J.F.,Ed; Washington, DC, , pp. 34–39, (1993)
- [124] Adil,I.H., Cetin,H.İ., Yener,M.E., Bayındırlı, A. “Subcritical (carbon dioxide plus ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach

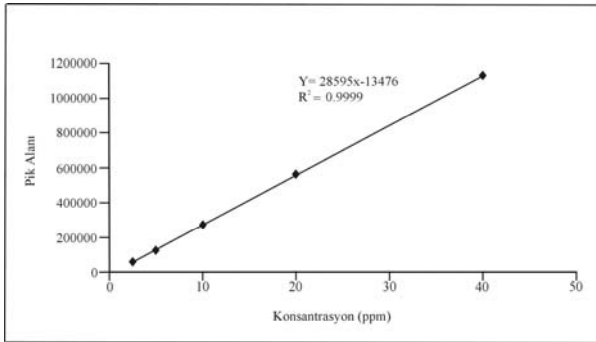
- pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts”
J.Supercrit.Fluids, **43**: 55, (2007)
- [125] Bicchi, C., Rubiolo, P., Frattini, C., Sandra, P., David, F. “Off-line supercritical fluid extraction and capillary gas chromatography of pyrrolizidine alkaloids in senecio species”, *J.Nat.Prod.*, **54**: 941, (1991)
- [126] McHugh M. A. and Krukonis V. J. “Supercritical fluid extraction principles and practice”, 2nd Ed., McGraw Hill, Butterworth-Heinemann, Boston Mass. (1994).
- [127] Turner, C., King, J.W. and Mathiasson, L., “Supercritical fluid extraction chromatography for fat-soluble vitamin analysis”, *J. of Chromatography A*, **936**: 215-237.(2001)
- [128] Spanos G.A., H. Chen, S.T. Schwartz, , “ Supercritical CO₂ extraction of β-carotene from sweet potatoes”, *J. Food Sci.*, **58(4)**: 817-820.(1993)
- [129] Akgün, M., Akgün, N.A., Dinçer, S., “Extraction and Modelling of Lavender Flower Essential Oil Using Supercritical Carbon Dioxide”, *Ind.Eng.Chem.Res.*, **39**: 473-477, (2000).
- [130] Raynie, D.E., “Modern Extraction Techniques”, *Anal.Chem.*, **76**: 4659-4664, (2004).

ÖZGEÇMİŞ

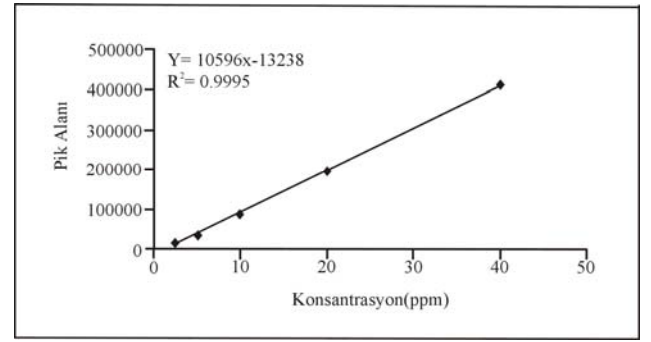
1977 yılında Malatya’da doğdum. İlkokulu Atatürk İlköğretim okulunda, ortaokulu, Atatürk ortaokulunda ve lise öğrenimimi Malatya Lisesi’nde tamamladım. 1996 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ne girerek 2001 yılında mezun oldum. Aynı yıl Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. 2004 yılında “Nitroaromatik Bileşiklerin Subkritik Su Oksidasyonu” adlı yüksek lisans tezimi tamamlayarak aynı yıl doktora çalışmama başladım. 2002’den beri, Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

EKLER

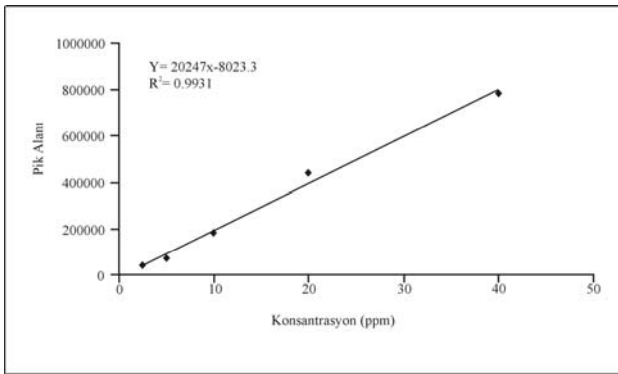
EK 1.



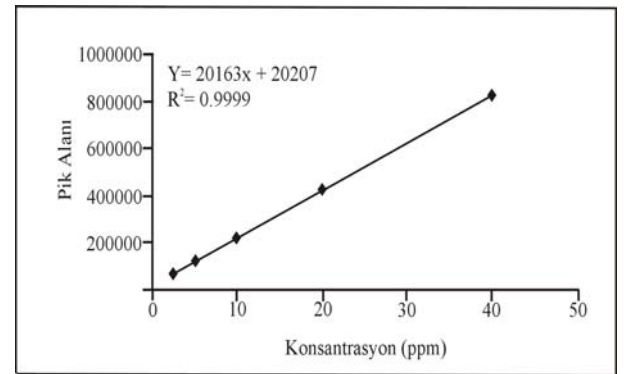
10-deasetilbakatin III



Bakatin III



Paklitaksel



Sefalomanin

$$\begin{array}{l} 1 \text{ L} \quad \quad A \text{ mg} \\ 0.3 \text{ mL} \quad B \text{ mg} \\ \hline \end{array}$$

$$B = \frac{0.3 \text{ mL} \times A \text{ mg}}{1 \text{ L}}$$

$$\begin{array}{l} 0.3 \text{ g} \quad \quad B \text{ mg} \\ 1000 \text{ g} \quad \quad C \text{ mg} \\ \hline \end{array}$$

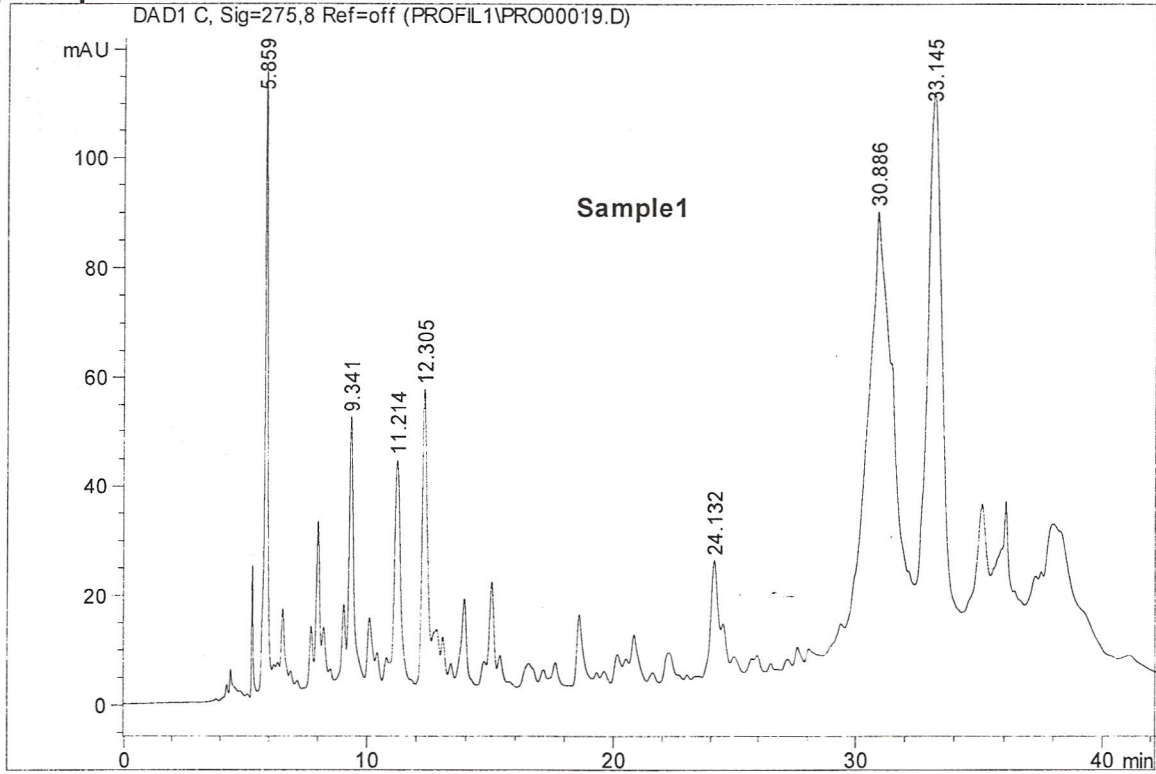
$$C = \frac{1000 \text{ g} \times B \text{ mg}}{0.3 \text{ g}}$$

A : HPLC analizi sonucu elde edilen miktar (mg)

B : Çalışılan numunede bulunan madde miktar (mg)

C : 1 kg numunede bulunan madde miktarı (mg)

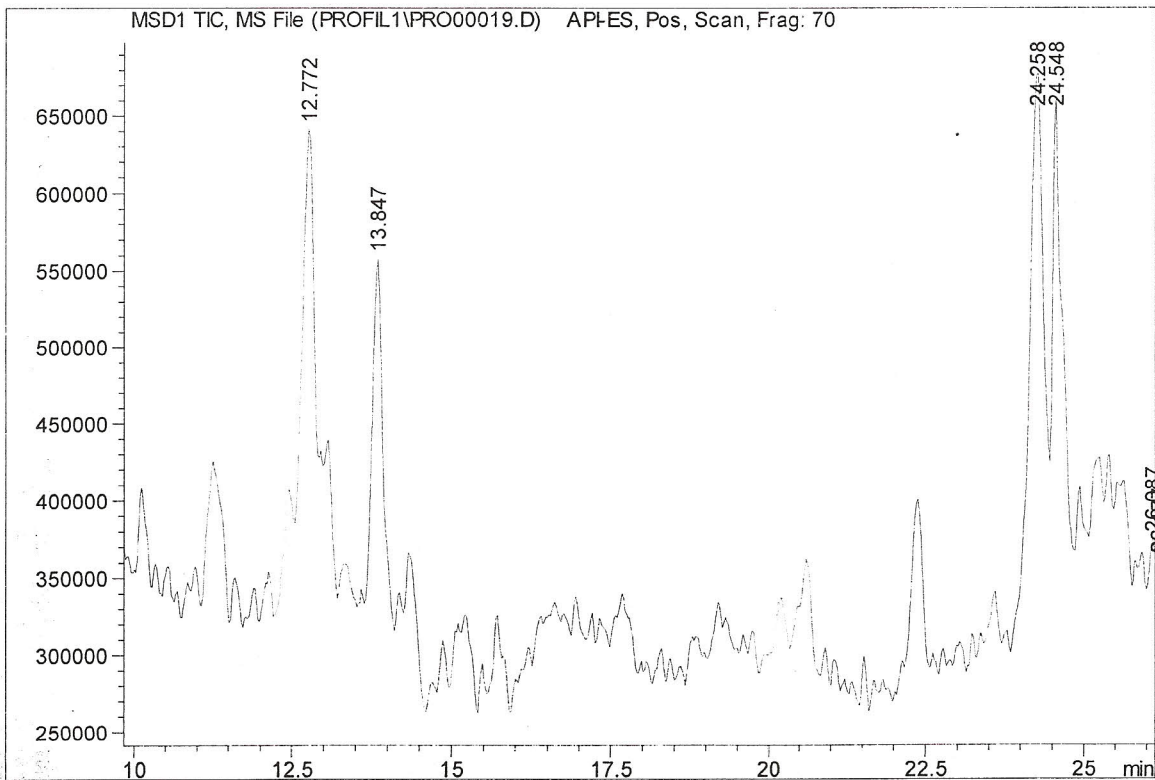
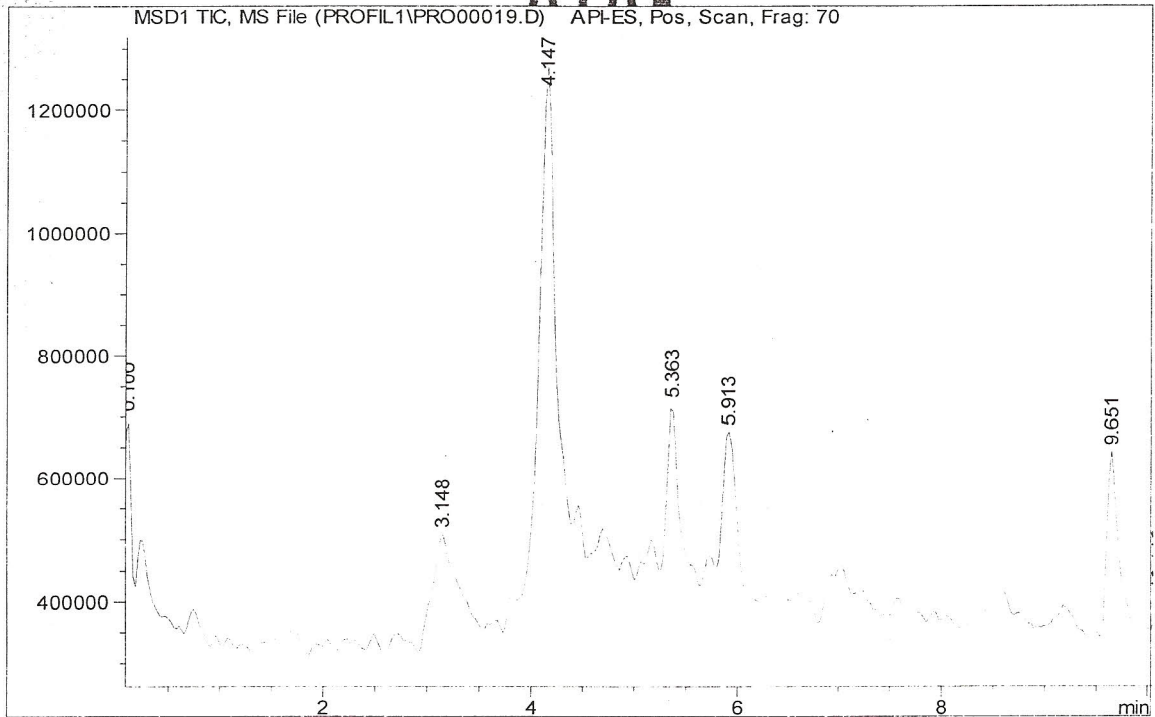
Sample 1:





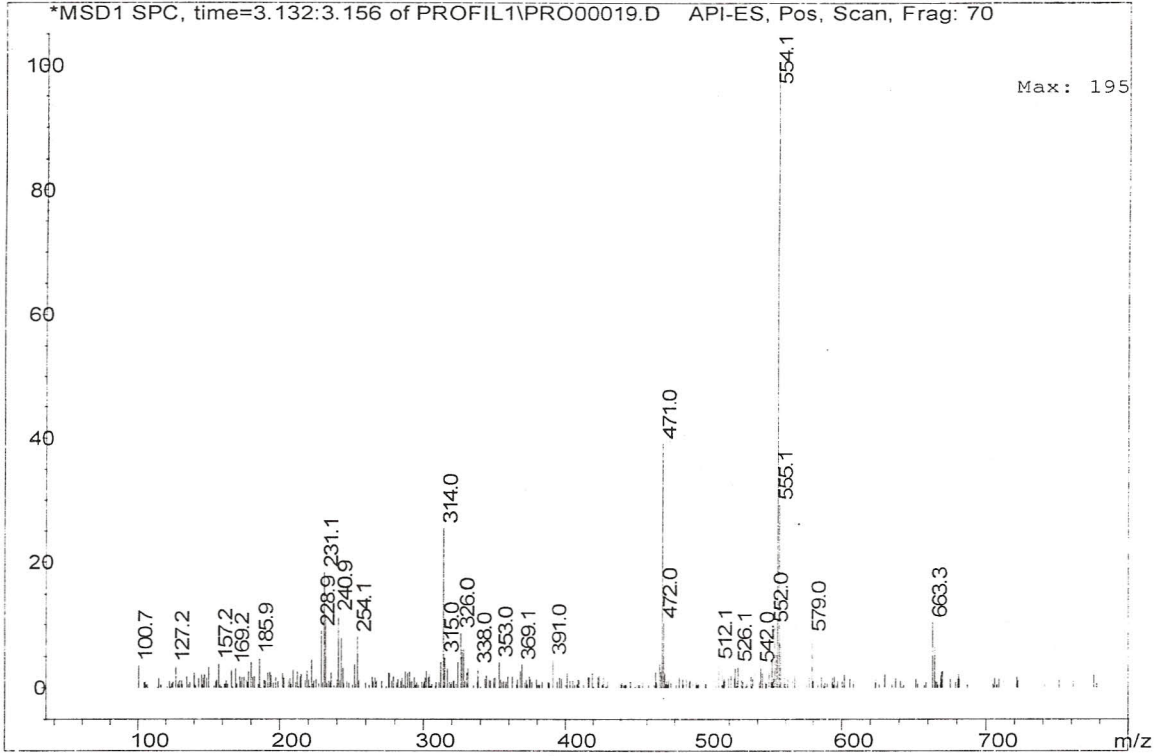
TÜBİTAK

ATAL

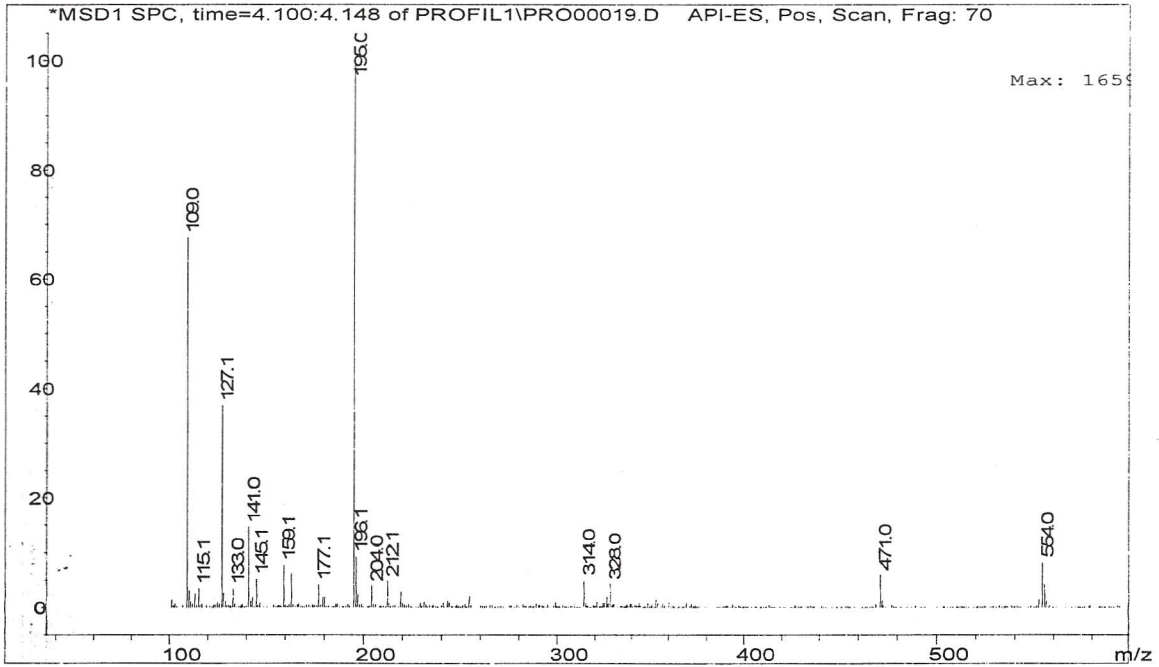




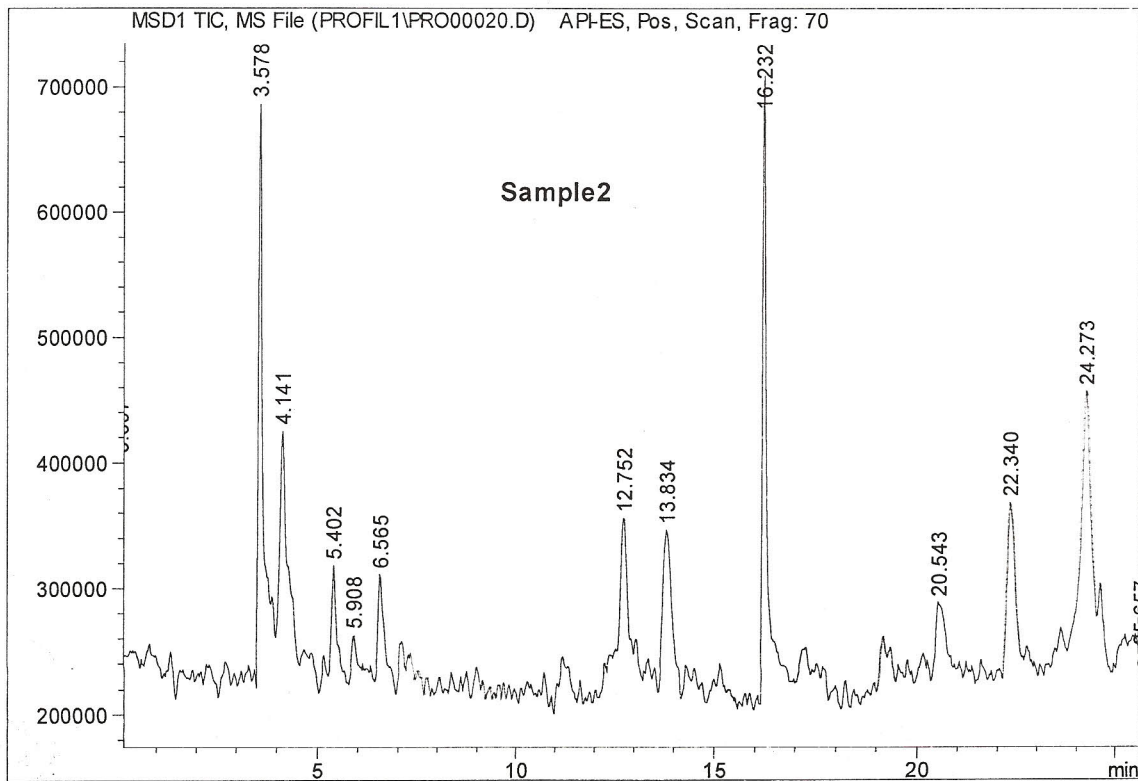
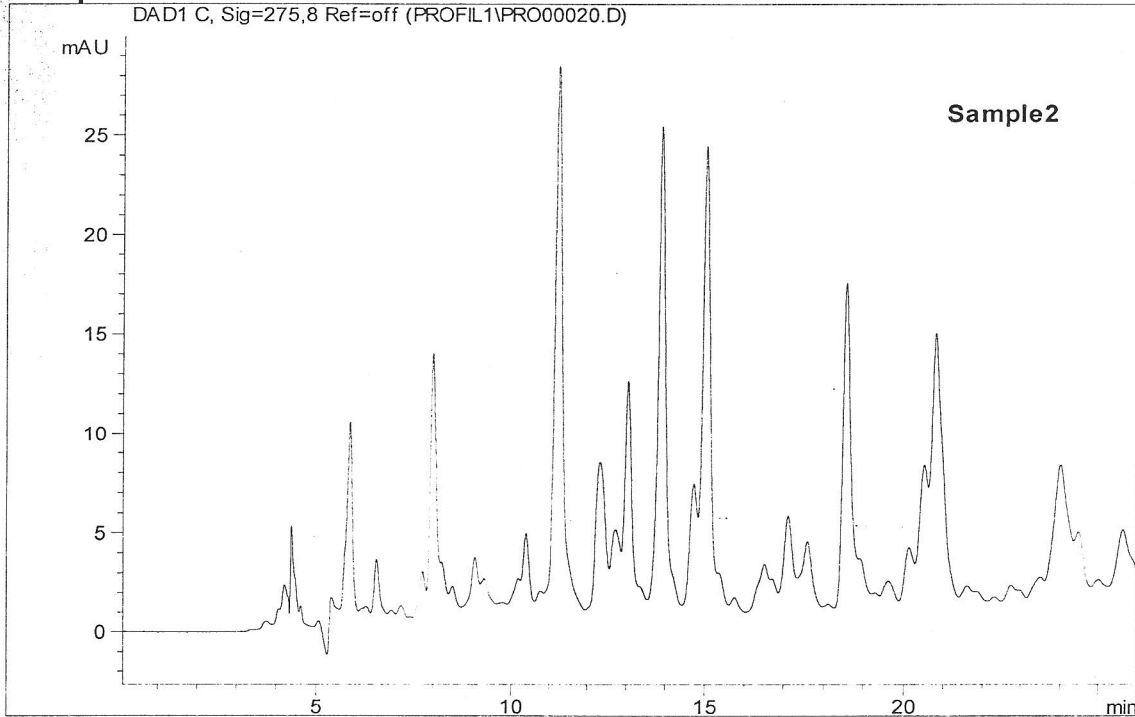
Rt: 3.1



Rt: 4.1



Sample 2:





Rt:24.2

