

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SAPONİN GLİKOZİTLERİNİN OKSİDATİF
AÇILMA İLE HİDROLİZİ, SEÇİLEN GLİKOZİTLER
İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE
EKSTRAKSİYON VE HİDROLİZİN BİRLİKTE
GERÇEKLEŞECEĞİ YENİ BİR REAKTÖR
SİSTEMİNİN TASARLANMASI**

Tuğba TIRPANMAN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Erdal BEDİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 621.01.00

Sunuş Tarihi : 5 Şubat 2010

Bornova-İZMİR

2010

Tuğba Tırpanman tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “ **Saponin Glikozitlerinin Oksidatif Açılma ile Hidrolizi, Seçilen Glikozitler için Metot Optimizasyonu ve Ekstraksiyon ve Hidrolizin Birlikte Gerçekleşeceği Yeni Bir Reaktör Sisteminin Tasarlanması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 5 Şubat 2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Erdal BEDİR

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

.....

Üye : Doç. Dr Canan KARAALP

.....

ÖZET**SAPONİN GLİKOZİTLERİNİN OKSİDATİF AÇILMA İLE
HİDROLİZİ, SEÇİLEN GLİKOZİTLER İÇİN METOT OPTİMİZASYONU
VE EKSTRAKSİYON VE HİDROLİZİN BİRLİKTE GERÇEKLEŞECEĞİ
YENİ BİR REAKTÖR SİSTEMİNİN TASARLANMASI**

TIRPANMAN, Tuğba

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal BEDİR

Şubat 2010, 78 Sayfa

Bu tezin temel amacı, oksidatif açılma yöntemi ile sikloastragenol isimli sapogeninin glikozit formundan mümkün olan en yüksek verim ve seçimlilikte elde edilmesi için ekstraksiyon işleminin ve hidroliz reaksiyonunun entegre bir sistemde gerçekleştirilerek sistemi etkileyen tüm parametrelerin istatistiksel deney metodları kullanılarak küçük, orta ve pilot ölçek için optimize edilmesidir.

Sistemi etkileyen parametreler, bitki/solvent oranı, alkali derişimi, zaman olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen en optimum sikloastragenol verimleri küçük ölçekte 0.033 bitki/solvent (g/mL) oranı, 9 saatlik reaksiyon süresi ve 15g NaOH (0.5M) kullanıldığında %1.44 (g/g), orta ölçekte 0.044 bitki/solvent oranı, 30 saatlik reaksiyon süresi ve 135g NaOH (0,75M) kullanıldığında %1.35 (g/g), pilot ölçekte ise 0.044 bitki/solvent oranı, 30 saatlik reaksiyon süresi ve 480g (0.75M) NaOH kullanıldığında %0.65 (g/g) olarak belirlenmiştir. Entegre hale getirilen ekstraktör ve reaktör üniteleri ile sıcaklık stabilitesi yüksek olan glikozit yapısındaki sekonder metabolitlerin çoğunun hidrolizi için hızlı, ekonomik ve standart bir metodoloji kazanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus*, Saponin, Glikozit, Alkali Hidroliz, Aglikon, Sikloastrogenol, Optimizasyon.

ABSTRACT**HYDROLYSIS OF SAPONIN GLYCOSIDES' BY OXIDATIVE
CLEAVAGE, METHOD OPTIMIZATION FOR SELECTED
GLYCOSIDES' AND DESIGNING A NEW REACTOR SYSTEM BOTH
EXTRACTION AND HYDROLYSIS PROSESSES TAKE PLACE**

TIRPANMAN, Tuğba

Master of Science Thesis, Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Erdal BEDİR

February 2010, 78 pages

The aims of this thesis are to obtain a sapogenin, named cycloastragenol, from its glycosidic form at a highest yield and selectivity by using oxidative cleavage method in an integrated system combining extraction and hydrolysis procedures, and to optimize all effective parameters on the system by using statistical experiment designs for small, medium and pilot scale.

The parameters that affect the system were determined as plant/solvent (w/v) ratio, alkaline concentration and time period. In conclusion; in small scale, when 0.033 plant/solvent (g/mL) ratio, 9h time period and 15g NaOH (0.5M) was used, the optimum cycloastragenol yield was %1.44 (g/g), in medium scale 0.044 plant/solvent (g/mL), 30 h reaction period and 135g NaOH (0.75M) is used, the obtained yield was %1.35 (g/g) and in pilot scale when 0.044 plant/solvent (g/mL), 30 h reaction period and 480g (0.75M) NaOH used %0.65 (g/g) optimum yield was determined. By integrating the extractor and reactor units, for the hydrolysis of most glycoside formed secondary metabolites having higher temperature stability, an economic, fast and standard methodology was achieved.

Keywords: Saponin, Glycoside, Hydrolysis, Optimization, Aglycone, Reactor

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen, bana bilimsel araştırma sevgisini kazandıran, sahip olduğu bilgi birikimini bizimle sabırla paylaşan ve bundan sonraki hayatımın şekillenmesinde yoluma ışık tutan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erdal BEDİR'e, yüksek lisansa başlamamda katkısı bulunan sayın hocam Prof. Dr. Bekir ÇETİNKAYA'ya, yönlendirmeleri ile elde ettiğim sonuçların şekillenmesini sağlayan ve bana çalışmamın her aşamasında destek olan çalışma arkadaşım Araş. Gör. İsmail Hakkı AKGÜN'e, çalışmam boyunca bana her konuda destek olan fikirlerini paylaşan uygulamalarımnda yardımcı olan sevgili arkadaşım Melis KUBAN'a, çalışmamdaki zor koşulların üstesinden gelmemde bana çok büyük yardımları dokunan Feyruz BOZOĞLAN'a, Şeref AKAY'a, Fatih KARABEY'e ve BİONORM Doğal Ürünler San. ve Tic. Ltd. Şti'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeği olan sevgili babam Kemal, annem Mukadder ve ağabeyim Fatih TIRPANMAN'a ve her tür desteğini üzerimden esirgemeyen, azimle sevgiyle çalışma sebebim olan nişanlım Mustafa AKAY'a ve ailesine çok teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK 108 M 416 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. SAPONİNLER	6
2.1 Saponinler hakkında genel bilgi	6
2.2 Saponinlerin yapıları ve kullanım alanları	7
2.3 Yarısentez tanımı, tercih edilme sebepleri ve gerekli ön işlemler.....	8
3. HİDROLİZ REAKSİYONLARI.....	11
3.1 Asidik hidroliz	11
3.1.1 Hidroliz sonrası aglikonların analizi.....	13
3.1.2 Yan ürün oluşumu	14
3.2 Bazık hidroliz	17
3.3 Kısmi hidroliz.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

3.4 Hidrotermoliz	22
3.5 Enzimatik hidroliz	22
3.6 Mikrobiyal hidroliz.....	24
3.7 Ilımlı ve seçimli ayırma yöntemleri	24
3.7.1 İki faz ortamında asit hidroliz.....	25
3.7.2 Periyodat degradesyonu.....	25
3.7.3 Alkali metaller	26
3.7.4 Lityum iyodür	27
3.7.5 Lityum alüminyum hidrür	28
4. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	29
4.1 Deney yöntemi.....	29
4.2 Kullanılan kromatografik yöntemler.....	34
4.2.1 İnce tabaka kromatografisi (İ.T.K.).....	34
4.2.2 Açık kolon kromatografisi.....	34
4.2.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	35
4.3 Kullanılan teknik aletler ve kimyasal maddeler.....	36

İÇİNDEKİLER (devam)

4.4 Gerçekleşen bilimsel ve teknik gelişmeler.....	37
4.5 Bitkisel materyal olarak kullanılan <i>Astragalus trojanus</i>	41
5. DENEYSEL UYGULAMALAR VE SONUÇLARI.....	43
5.1 Deneme set 1.....	45
5.1.1 Deneme set 1 sonuç.....	46
5.2 Deneme set 2.....	50
5.2.1 Deneme set 2 sonuç.....	51
5.2.2 Deneme set 2'ye ait HPLC kromatogramları.....	53
5.3 Deneme set 3.....	58
5.3.1 Deneme set 3 sonuç.....	59
5.4 Deneme set 4.....	61
5.4.1 Deneme set 4 sonuç.....	62
5.5 Pilot ölçek denemeleri.....	65
5.5.1 Deneme set 5 koşulları ve sonuçları.....	66
5.5.2 Deneme Set 5 değerlendirme.....	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR DİZİNİ	73
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 İzopren Ünitesi.....	2
1.2 Skualen molekülünün katyonik atağa uğraması	2
1.3 Triterpenlerin halka sistemlerine göre sınıflandırılması.....	3
2.1 Yarı sentetik türevlerin bitkisel doğal ürünlerden eldesi aşamaları.....	10
3.1 Agavezit B	12
3.2 Hovenozitlerden lakton ve ebelin lakton oluşumu	15
3.3 Ekinositik asidin albigenik aside asidik hidrolizle transformasyonu	15
3.4 Arjungenin epimerizasyonu.....	16
3.5 Arjungenin epimerizasyonu.....	16
3.6 Alatozit A	17
3.7 18,19-sekoursa-11,13(18)-dien-28,21-lakton	17
3.8 1=(S)-20-protopanaksadiol, 2=(S)-20-protopanaksatriol 3=Ginsenzit Rg1, 4= Ginsenzit Rb1, 5= Ginsenzit Ro, 6= Panaksadiol, 7=Panaksatriol ..	19
3.9 Alkali hidroliz reaksiyonu mekanizması	20
3.10 <i>Phytolacca dodecandra</i> 'dan elde edilen saponinin asit hidrolizinden sonra elde edilen ürünler.....	21
3.11 Dioksan:0.1 M HCl ile kısmi hidroliz	21
3.12 Siklaminin iki faz asit hidrolizi	25

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

3.13	Smith degridasyonu	26
3.14	Lityum iyodür ile ester bağlarının koparılması reaksiyonu.....	28
4.1	Modifiye Soxhlet ekstraktörü	29
4.2	Üç boyunlu balon	29
4.3	Hava difüzörü.....	30
4.4	Solvent tutucu.....	30
4.5	Küçük ölçek reaksiyon düzeneği.....	30
4.6	Rotametre.....	30
4.7	Küçük ölçek ekstraktör görüntüsü.....	31
4.8	Orta ölçek reaksiyon düzeneği.....	31
4.9	Pilot ölçek deney düzeneği çizimi.....	32
4.10	Pilot ölçek deney düzeneği görüntüsü.....	33
4.11	AST IV kalibrasyon grafiği.....	39
4.12	CG kalibrasyon grafiği.....	39
4.13	<i>Astragalus trojanus</i>	40
5.1	Sikloastrogenol molekülünün yapısı ve görüntüsü.....	43
5.2	Astragalozit IV bileşiğinin alkali hidrolizi sonucunda oluşan ürünler.....	44
5.3	Gerçekleştirilen set 1 denemelerinin İTK görüntüsü.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

5.4	HR2_110409 analizine ait HPLC kromatogramı	48
5.5	HR8_090409 analizine ait HPLC kromatogramı	48
5.6	Alkali ve bitki miktarına bağlı CG değişimi	49
5.7	Alkali miktarı ve reaksiyon süresine bağlı CG değişimi	49
5.8	Alkali miktarı ve sistem parametrelerinin CG verimi üzerine etkisi	51
5.9	Küçük ölçekte zamana bağlı CG konsantrasyonunun değişim grafiği	52
5.10	Analiz 1'e ait HPLC kromatogramı	53
5.11	Analiz 2'ye ait HPLC Kromatogramı	54
5.12	Analiz 3'e ait HPLC kromatogramı	54
5.13	Analiz 4'e ait HPLC kromatogramı	55
5.14	Analiz 5'e ait HPLC kromatogramı	55
5.15	Analiz 6'ya ait HPLC kromatogramı	56
5.16	Analiz 7'ye ait HPLC kromatogramı	56
5.17	Analiz 8'e ait HPLC kromatogramı	57
5.18	Deneme set 3_HR2_220709_TM denemesinin HPLC kromatogramı	60
5.19	HR5, HR6, HR13 orta ölçek denemelerinin İTK profilleri	62
5.20	Deneme set 4'te standardize edilmiş değerlerin normalite grafiği	64
5.21	Deneme set 4 için kullanılan modelin yanıt yüzey grafiği	64

5.22	Pilot ölçek tur örneklerinin TLC profili.....	65
5.23	PÖ_D2_24h ve PÖ_D2_30h örneklerinin İ.T.K profilleri.....	66
5.24	PÖ_D3_24h ve PÖ_D3_30h örneklerinin İ.T.K profilleri.....	66
5.25	Şekil 5.25 Pilot ölçek denemelerinin analiz grafiği.....	68
5.26	PÖ_D3_30h denemesinin ELSD kromatogramı.....	68
5.27	PÖ_D3_30h denemesinin ELSD analiz raporu.....	68
5.28	PÖ_D2_24h denemesinin ELSD kromatogramı.....	69
5.29	PÖ_D2_28h denemesinin ELSD kromatogramı.....	69
5.30	PÖ_D2_30h denemesinin ELSD kromatogramı.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Triterpen saponinler için kullanılan belirteçler.....	13
5.1 Deneme Set 1.....	45
5.2 Değişkenlerin analizi çizelgesi.....	47
5.3 Değişkenlerin analizi çizelgesi	47
5.4 Deneme Set 2.....	50
5.5 Değişkenlerin analizi çizelgesi	52
5.6 Deneme Set 3 analiz verileri.....	58
5.7 Değişkenlerin analizi çizelgesi	59
5.8 Deneme Set 4.....	61
5.9 Modelin yeterlilik testi.....	63
5.10 Modelin özet istatistikleri.....	63
5.11 Değişkenlerin analizi çizelgesi	62
5.12 Deneme set 5 koşulları ve sonuçları	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
CHCl_3	Kloroform
HCl	Hidroklorik Asit
H_2SO_4	Sülfirik Asit
H_2O	Su
H_3PO_4	Fosforik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
KOH	Potasyum Hidroksit
n-BuOH	n-butanol
MeOH	Metanol
i-BuOH	İzobutanol
s-BuOH	Sekonder Butanol
t-BuOH	Tersiyer Butanol
n-PrOH	n-Propanol
i-PrOH	İzopropanol
LiAlH_4	Lityum Alüminyum Hidrür
NaOMe	Sodyum Metoksit
EtOAc	Etil Asetat
 <u>Kısaltmalar</u>	
akb	Atomik Kütle Birimi
Hex	Hekzan
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

GC	Gaz Kromatografisi
RPHPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
AST IV	Astragalozit IV
AST VII	Astragalozit VII
AG	Astragenol
CG	Sikloastragenol
UV/Vis	Ultraviyole ve Görünür Bölge
DAD	Fotodiyot array dedektörü
ELSD	Evaporatif Işık Saçma Dedektörü
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
w/v	Ağırlık/hacim oranında

1. GİRİŞ

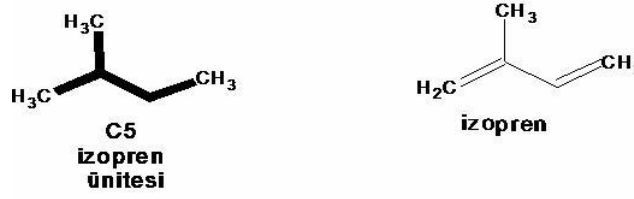
Doğal ürünler, canlı organizmalar tarafından üretilen ve moleköl ağırlığı yaklaşık olarak 1500 akb'den küçük olan ve protein, nükleik asit, polisakkarit gibi organizmanın canlılığı için gerekli olmayan kimyasal maddelerdir. Sekonder metabolit olarak da bilinen doğal ürünler, savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini sürdürme amaçlı özellikle bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleridirler. Bitkilerde; kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi değişik çevresel etkilerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma, herbivorlara ve mikroorganizmalara karşı savunma, hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbetme gibi bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevleri olduğu da bilinmektedir.

Bitkisel sekonder ürünler çoğunlukla bitkilerin belli organlarında, hatta belli organlarda bulunan hücrelerin belli kompartmanlarında bulunmaktadır ve bitkinin belli bir gelişim periyodu süresince üretilmektedirler. Genellikle toplam biyokütlenin %1-%0.001'ini oluşturmaktadırlar. Bu bileşiklerin üretimi, organizmanın içinde bulunduğu çevre veya beslenme koşulları ile değişiklik gösterebilmektedir.

Bu kimyasal maddelerin başta ilaç sanayi (*Catharanthus roseus*'tan elde edilen vinkristin ve vinblastin kanser tedavisinde kullanılmakta olan önemli bir ham madde) olmak üzere; kimya (renk verici), besin (*Thaumatococcus danielli*'den elde edilen taumatin tatlandırıcı olarak), kozmetik, parfümeri (koku verici) ve zirai mücadele (*Nicotiano tobacum*'dan elde edilen nikotin insektisit olarak) sektörlerinde yeri doldurulamaz önemleri bulunmaktadır. Bu moleküllerin direkt ya da modifikasyonla elde edilmiş yapılarının göstermiş oldukları aktiviteler bilim dünyasının ilgisini her geçen gün biraz daha fazla çekmektedir. Doğal ürün araştırma grubumuz da çalışmalarının büyük kısmını özellikle antikanser tedavilerinde öncülük eden bitkisel kaynaklı sekonder metabolitler üzerinde yürütmektedir.

Bitkisel sekonder metabolitler fenilpropanoitler, alkaloitler, kinonlar, steroidler ve terpenoitler olarak beş ana başlık altında toplanmaktadır. Bu tezde üzerinde çalışılan moleküller terpenoit sınıfına dahil olan triterpenlerdir.

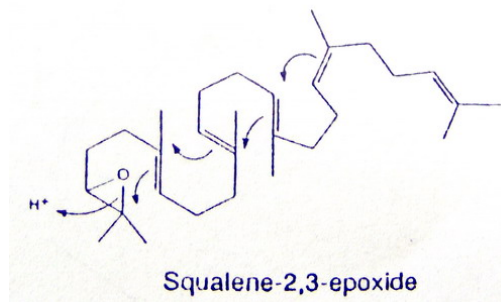
Terpenoitler izopren ünitelerinden oluşan, bitkilerin sitozol ve plastitlerinde üretilen ve içerdikleri izopren ünitesine göre sınıflandırılan moleküllerdir.



Şekil 1.1 İzopren Ünitesi (Akgün I. H., 2006)

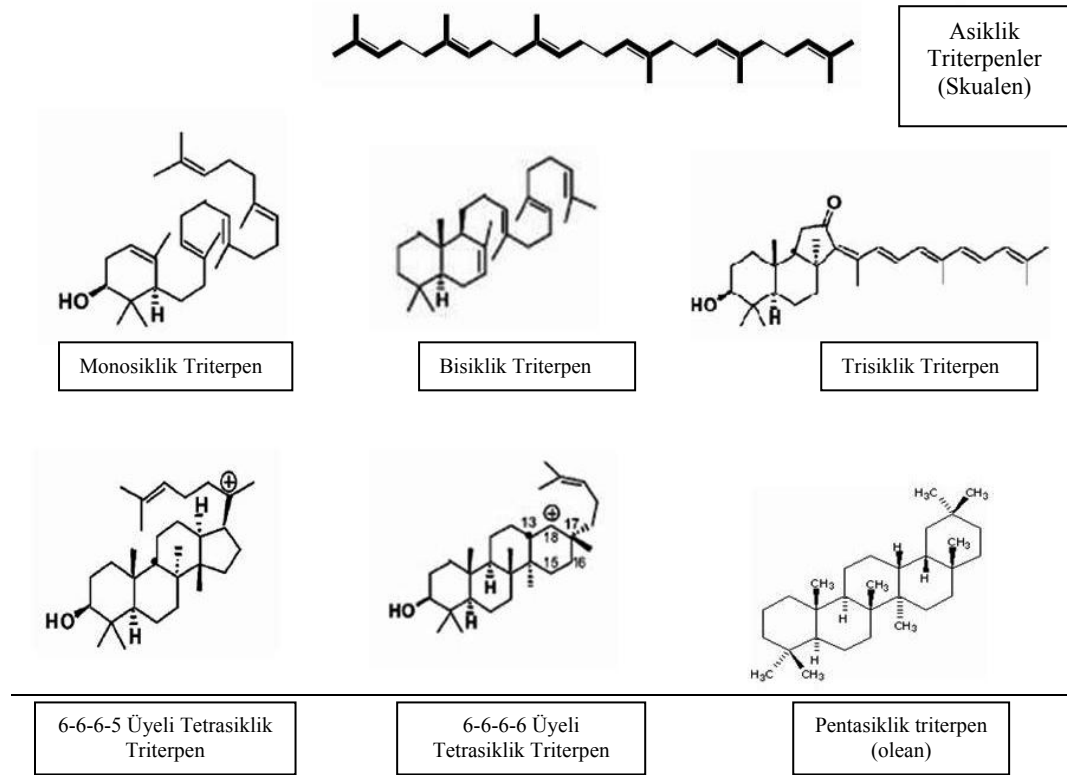
1 ünite izopren: Hemiterpenler-C ₅	4 ünite izopren: Diterpenler-C ₂₀
2 ünie izopren: Monoterpenler-C ₁₀	5 ünite izopren: Sesterpenler-C ₂₅
3 ünite izopren: Seskiterpenler-C ₁₅	6 ünite izopren: Triterpenler-C ₃₀

Triterpenler doğada serbest halde bulunabildikleri gibi, ester ya da glikozitleri şeklinde de bulunabilirler. Temelde triterpenler skualen molekülünün katyonik atağa uğramasıyla başlayan, farklı yollara sahip siklizasyonlar ile oluşmaktadırlar. Bu tür siklizasyonları gerçekleştiren enzimler genel olarak triterpen sentazlar olarak bilinirler.



Şekil 1.2 Skualen molekülünün katyonik atağa uğraması (Hostetmann, K., 1995)

Serbest halde bulunan triterpenlerin halka sistemlerine göre sınıflandırılması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Triterpenlerin halka sistemlerine göre sınıflandırılması (Hostetmann, K., 1995)

Belirtilen bu gruplar içerisinde tetrasiklik ve pentasiklik triterpenler oldukça önemlidir. Çünkü doğadan elde edilen triterpenlerin çoğu bu gruplara dahil olmaktadır. Bitkiler aleminde en yaygın olarak bulunan sekonder metabolit gruplarından birini triterpen ve steroidal yapılı saponinler oluşturmaktadır. 1730 Orta Asya bitki türü ile yapılan araştırmalarda, familyaların %76'sının saponin içerdiği tespit edilmiştir (Gubanov *et. al*, 1970).

Saponin içeren bitkiler yüzyıllardan beri halk arasında sayısız hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkilerin saponin üretmelerinin en önemli sebebinin kendisini ortamda bulunan diğer canlı organizmaların etkilerine karşı korumak olduğu düşünülmektedir. Bu teze kanıt olarak bitkilerin toprakaltı kök kısımlarının saponinlerce zengin, yapraklar gibi toprak üstü kısımlarının ise saponinlerce fakir olduğu gösterilmektedir. Örneğin *Spinacia oleracea*'nın yapraklarında saponin bulunmamasına rağmen birçok mikroorganizmanın bulunduğu toprakaltı kök kısmında antimikrobiyal özellikte oleanolik asit ve

hederagenin aglikonunu içeren monodesmosidik spinasaponin A ve B saponinleri bulunmaktadır.

Saponinlerin her geçen gün artan bilimsel çalışmalarla konunun devamında bahsedilecek birçok aktivitesinin olduğu kanıtlanmıştır. Ancak birçok durumda farmakolojik etkilerinin diğer bazı sekonder metabolitlerle karşılaştırıldığında (Örn: alkaloidler) kısmen zayıf olduğu fakat toksisitelerinin düşük olduğu saptanmıştır.

Son dönemde bilim adamları biyolojik etkileri çok yüksek olmamasına rağmen biyoaktivite rehberli ilaç dizaynı ve sentezi ile etkilerini büyük oranda artırabileceklerini düşündükleri sekonder metabolitlere yönelmişlerdir. Bu amaçla özellikle saponin bileşiklerinin geninleri (sapogenol) üzerinde birçok yarı-sentez çalışmasının yürütülmeye başlandığı görülmektedir (Honda, 2000). Ayrıca betulinik asit gibi bazı saponin aglikonları spesifik biyolojik etkilerinden (anti-melanoma) dolayı klinik çalışmalara alınmıştır ve yakın gelecekte tedaviye girebilme potansiyellerinin çok yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Yürütülmekte olan bu yarı-sentez çalışmalarının büyük bir kısmı saponinlerin steroidal veya triterpenik çekirdeği (sapogenol) üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bitkiler âleminde saponinlerin genelde glikozitleri formunda (saponozit) bulunduğu göz önüne alındığında, bu türevlerin hem araştırma laboratuvarlarında hem de endüstriyel ölçekte aglikon yapısı değişikliğe uğramadan hidrolizinin gerçekleşmesi ve şekerlerinin koparılması gerekmektedir. Bu hidroliz metodunun saponozitin aglikon kısmında değişikliğe yol açmadan, endüstriyel boyut düşünüldüğünde de hem hızlı hem de ekonomik olarak gerçekleştirilmesi zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

Saponinlerin hidroliz işlemini gerçekleştirebilmek için kullanılabilecek çok fazla yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden diğer bölümlerde detaylı bir şekilde bahsedilecektir. Aralarında en sık başvuru yöntemlerinden birisi asidik hidrolizdir. Genelde inorganik asitlerle yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz çalışmaları esnasında katma değeri yüksek olan saponinlerin bazıları düşük stabilitelerinden dolayı istenmeyen artifaktlara dönüşmekte ve verimlilik oldukça azalmaktadır. Bu durumun önüne geçmek için daha zayıf asitlerle, düşük sıcaklıklarda hidroliz işlemleri yapılabilmektedir. Ancak hidroliz işleminin 7-10

gün gibi oldukça uzun bir sürede gerçekleşmesi özellikle endüstriyel açıdan bu metodun kullanımını sınırlamaktadır. Saponinlerin hidrolizinde kullanılabilecek bir diğer metot ise enzimatik hidrolizdir. Enzimatik hidroliz ise oldukça spesifik olmasına rağmen hem ilk yatırımın yüksek olması (enzim fiyatı ve altyapı maliyeti) hem de alt akım işlemlerinin zorluğu nedeni ile çok fazla tercih edilmemektedir.

Bununla birlikte saponozitlerin hidrolizinde kullanılabilecek çok daha etkin ve ekonomik bir kimyasal metodun 1990'lı yıllarda Cui ve ark. tarafından geliştirilmesi birçok bilim adamının ve sanayinin gözünden kaçmıştır (Cui ve ark., 1993 ve 1994). Bu yöntemde alkali ortamda n-BuOH içerisinde çözünmüş olan ginseng saponozitleri sistemden oksijen geçirilerek %95 üzeri verimle ve çok yüksek seçicilikte hidroliz edilebilmiştir. Aynı işlem asidik hidroliz ile gerçekleştirildiğinde siklizasyon, epimerizasyon ve hidroksilasyon reaksiyonlarından kaynaklanan 10 adet yan ürün oluşmuştur. Bu proses iki katı daha uzun sürede gerçekleşmesine rağmen sistemden hava geçirilerek bile yapılabilmektedir.

Bu bilgiler ışığında saponinler üzerinde yoğun araştırmalar yürüten grubumuz hem saf moleküller hem de ekstraler üzerinde birkaç ön deneme yaparak oksijen bağımlı bu metodun yukarıda bahsedilen diğer yöntemlerden daha üstün olduğunu doğrulamıştır. Bunun üzerine yöntemin glikozit formlarında bulunan ve ülkemiz için katma değeri yüksek bir sapogenol olan sikloastragenol'ün (CG) elde edilmesine yönelik geliştirilmesi konusunda çalışılmasına karar verilmiştir.

Bu çalışma sırasında grubumuzun amacı yalnız glikozidik bağların parçalanıp sapogenollerin elde edilmesine yönelik parametrelerin (süre, solvent miktarı, oksijen ve/veya havanın geçiş hızı, sıcaklık vb.) istatistiksel metodlar kullanılarak optimizasyonu değil, hem ekstraktör hem de hidroliz reaktörünün bir arada bulunduğu pilot ölçekli bir sistemin oluşturulmasıdır.

2. SAPONİNLER

2.1. Saponinler hakkında genel bilgi:

Saponinler yüksek molekül ağırlığa sahip bir triterpenik (30 karbonlu) veya steroidal (27 karbonlu) çekirdek üzerinde şeker üniteleri taşıyan, bitkisel veya marin organizmalarda bulunan sekonder metabolitlerdir. (*Panax ginseng-ginsenozit Rg1*) Oldukça yaygın olan bu bileşikler taşıyan bitkilerin köpürme özellikleri nedeni ile sabun olarak ve soğukkanlı canlılara toksik olması nedeniyle balık avlamada kullanılmaları yüzyıllarca yıl geriye dayanmaktadır. Ayrıca, yangın söndürme köpüğü, diş macunu, şampuan, sıvı sabun imalatı, kozmetik, bira ve hafif içeceklerin köpüklenmesini arttırmak için de kullanıldıkları bilinmektedir (Bearez, 1998).

Ayrıca saponinler yüzlerce yıldır geleneksel tıpta (özellikle Hindistan ve Çin’de) kullanılagelmiş drogların terkininde bulundukları için araştırmalara oldukça yoğun konu olmuşlardır. Bu çalışmalardan hareketle etkinliği doğrulanan saponin taşıyan birçok bitki gıda destekleyici ürünler pazarında yoğun olarak tüketilen ürünler arasında yer almıştır (*Ginseng, Astragalus, Tribulus, Centella* vb.).

Fungisidal ve pisisidal etkinlikleri çok iyi bilinen saponinlerin her geçen gün artan bilimsel çalışmalarla antimutajenik, molusisidal, antihelmintik, kardiyovasküler, analjezik, antipiretik, adaptojenik, ekspektoran ve antitussif, hipoglisemik, hipokolesterolemik, antiviral, antibakteriyel, immunostimulan, anti-HIV, sitotoksik ve antitümör gibi aktivitelerinin olduğu saptanmıştır (Hostetmann&Marston, 1995; Rao&Gurfinkel, 2000).

Bu bileşikler yalnız bilimsel çalışmalarda sunulmakla kalmamış ilaç endüstrisinde kendine etken veya yardımcı madde olarak çok farklı kullanım alanları bulmuştur. Bunlara örnek olarak kalp yetmezliğinde kullanılan digoksin, venöz yetmezlikte kullanılan ruskogenin, aşılarında etkinliği artırmak için adjuvan olarak kullanılan veya ilaç taşıyıcı sistemlerde penetrasyonu artıran *Quillaja* saponinleri, AIDS ve kansere karşı kullanılmak üzere klinik denemeler safhasında bulunan betulinik asit ve yarı-sentetik bir oleanan tipi triterpenik sapogenin olan 2-siyano-3,12-dioksolean-1,9-dien-28-oik asit (CDDO) ve moleküler biyolojide

hücre membran yapısını bozmadan geçirgenliği arttırdığı için peptit veya antikorların hücreye penetre etmesini sağlayan saponin karışımları verilebilir.

Son günlerde saponin taşıyan ürünlerin hayvancılık endüstrisinde hem enfeksiyonlara karşı hem de verimliliği artırmak amacı ile kullanılmaya başlandığı da görülmektedir (Tavukçulukta kullanılan *Yucca* saponin preparatları gibi).

2.2. Saponinlerin yapıları ve kullanım alanları

Bitkiler âleminde saponinlerin genelde %90'ı glikozitleri formunda (saponozit) bulunmaktadır. Bu bileşiklerin glikozit formlarının da birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Örneğin, tümör inhibitörü olmalarından dolayı bazı saponinler, son zamanlarda farmakolojik olarak aktif anti-tümör moleküller olarak hedef durumuna gelmişlerdir. Ginsenozit Rg1 ve Rb1 mide kanserine karşı etkili iken (Hayashi&Kubo, 1980), *Glycine max*'tan izole edilen soyasaponinleri birçok tümöre karşı aktivite gösteren moleküllerdir (Jap. Pat. 58 72,523). *Gymnostemma pentaphyllum*'dan izole edilen gipenozit deri, rahim ve karaciğer kanserinin tedavisinde ümit verici gelişmeler ortaya koymuştur (Jap. Pat. 58 59,921).

Saponinlerin glikozit formlarının molekül ağırlıklarının yüksek oluşu, yapıda bulunan şeker moleküllerindeki hidroksil sayısının çokluğu, ilaç etken maddesi olabilecek moleküllerde aranan bir özellik olan Lipinski'nin beş kuralına (5'den fazla hidrojen bağı donörü içermeme, 10'dan fazla hidrojen bağı akseptörü içermeme, moleküler ağırlığı 500 g/mol'den az olma, dağılım katsayısı 5'ten az olma) uymamaktadır. Bu nedenle saponozitlerden çok sapogeninler ilaç araştırma-geliştirme çalışmalarının ilgi odağı olmuştur.

Saponinlerin genelinin daha önce de belirttiğimiz gibi glikozitleri formunda bulunduğu göz önüne alındığında, yarı sentez çalışmalarında kullanılmak üzere, endüstriyel ölçekte aglikon yapısı değişikliğe uğratılmadan şekerlerinin koparılarak aglikonların elde edilmesi gerekmektedir. Bu hidroliz metodunun saponozitin aglikon kısmında değişikliğe yol açmadan gerçekleştirilmesinin yanında, endüstriyel boyut düşünüldüğünde hem hızlı hem de ekonomik olması zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3. Yarisentez tanımı, tercih edilme sebepleri ve gerekli ön işlemler:

Doğal ürünlerin birçoğu biyolojik aktivite göstermelerine rağmen, düşük fizyolojik etkileri ile birlikte çözünürlük, emilim ve dağılım gibi kinetik özelliklerinin yetersiz olması ilaç olabilmelerinin önünde engel teşkil etmektedir. Bu gibi doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerini arttırmak ve fizyolojik etkinliğini ve farmakokinetik özelliklerini istenilen seviyeye getirmek için molekülün üzerinde kimyasal ve/veya enzimatik reaksiyonlarla değişiklikler yapılabilmektedir. Doğal ürünün ana iskeletinin çıkış maddesi olarak kullanıldığı ve sentez reaksiyonları ile yeni moleküllerin oluşturulduğu işlemlerin tümüne yarı sentez denmektedir.

2005-2007 yılları arasında FDA tarafından onaylanmış 13 doğal ürün ilacının 4 tanesi doğal ürünün kendisi iken geri kalan 9'u yarı sentetik türevleridir. Halen FDA'den onay bekleyen 37 doğal ürün kaynaklı ilacın 16'sı doğal ürünlerin yarı sentetik türevi iken 18 tanesi doğal ürün iskeletleri örnek alınarak elde edilmiş ilaçlardır (farmakofor grubu taşıyan). Bu 37 ilacın sadece 3 tanesi herhangi bir değişikliğe uğratılmamış doğal üründür (Butler, 2008). Tedaviye giren veya girmek üzere olan bu ürünler yarı sentez çalışmalarının önemini ve biyolojik aktivitesi olan doğal ürünlerin ilaç molekülleri haline getirilebilme potansiyellerinin ne kadar yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Total sentez yani küçük ve ucuz sentetik başlangıç moleküllerinden hareket edilerek hedef molekülün tamamının sentetik olarak hazırlandığı çalışmalar da yapılmaktadır. Bu yöntem küçük doğal ürünler için başarılı olmasına rağmen, birçok asimetric merkez taşıyan karmaşık sekonder metabolitler için ya başarısız ya da çok fazla basamak taşıması nedeni ile ekonomik olamamıştır (düşük verim, yüksek maliyet). Panacos Pharmaceuticals firması tarafından geliştirilen AIDS tedavisinde kullanım için FDA'den onay bekleyen Berivamat betulinik asitin yarı-sentetik bir türevidir. Berivamat'ın sentezinde kullanılan betulinik asidin total sentezi yaklaşık olarak 30 basamakta ve düşük bir verimle gerçekleştirilmektedir (Jung, 2006). Buna karşın betulinik asit öncül maddeleri bir huş ağacı türü olan *Betula platyphylla*'nın ağaç kabuklarından kütsel olarak %35'lere varan verimlerde elde edilebilmektedir.

Bu nedenle günümüzde, doğadan izole edilmiş hedef bileşik ya da moleküllerin kimyasal ve enzimatik modifikasyonlarla biyolojik ya da farmakolojik etkiye sahip yeni türevlerine dönüştürülmesi işlemi olarak bilinen yarı sentez metodu sıklıkla tercih edilmektedir. Son 10 yıl içinde gerçekleşen çalışmalarda yarı-sentez ile triterpenik yapıdaki moleküllerin fizyolojik etkilerinin 10000 kata kadar artırılabilceğinin anlaşılmasını takiben (Honda, 2000) bazı doğal ürün kimyası grupları triterpenik sapogenoller üzerinde yoğunlaşmaya başlamış ve birçok yarı sentetik türev hazırlanmıştır.

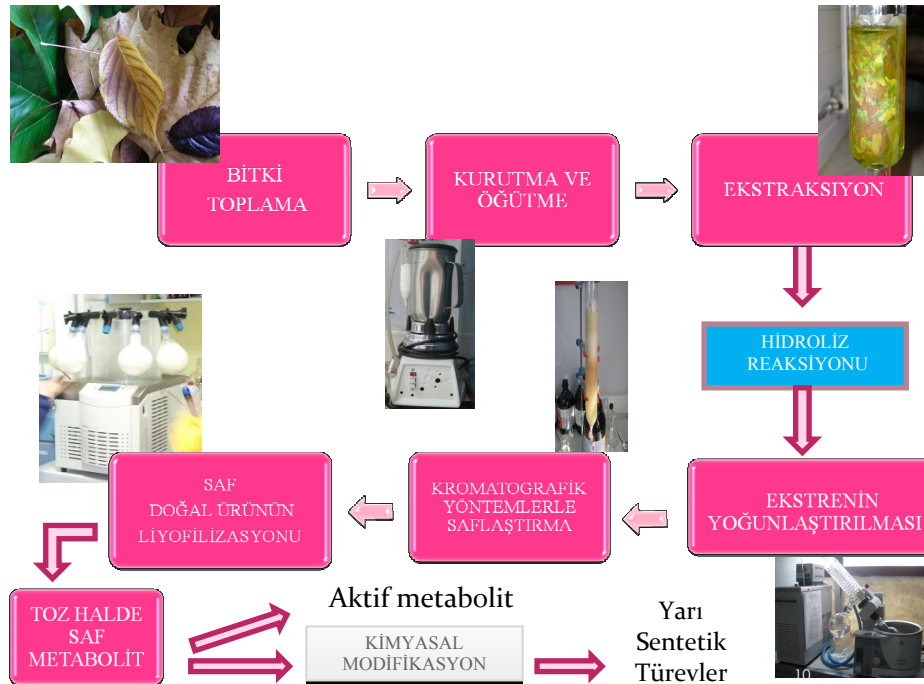
Saponinlerin yarı sentezi üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında, yakın zamanda yapılmış bir çalışmada oleanan türevi yarı sentetik bir triterpen olan 2-siyano-3,12-dioksoolean-1,9-dien-28-oik asit ya da CDDO klinikte kanser tedavisinde gelecek vaat eden multi fonksiyonel bir molekül olarak saptanmıştır (Suh, 1999). İn vitro çalışmalar CDDO'nun, insan lösemi, osteosarkoma (Ito, 2001), göğüs kanseri (Lapillonne, 2003) hücrelerinde farklılaşmayı indüklediği, büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozisi teşvik ettiğini göstermiştir (Ito, 2000; Pedersen, 2002). Klinik çalışmalara alınan bu bileşiğin aynı zamanda in vivo çalışmalarda interferon-gama tarafından indüklenen nitrit oksit üretimini piko gram seviyesinde inhibe ettiği için mükemmel bir antiinflamatuvar ajan olarak geliştirilmesi çalışmaları sürdürülmektedir.

Yukarıda adı geçen betulinik asit sıklıkla yarı-sentetik çalışmalarının ilgi odağı olmuştur. Betulinik asidin aglikonu olan lupandan türemiş birçok sentetik triterpenoit bileşiğin hücresel taramalarında potansiyel anti kanser ilaç olabilecek analoglarının belirlenmiştir (Sarek, 2003). Betulinik asidin kendisi ve bazı türevleri potansiyel anti-HIV ajanı olarak da tespit edilmiştir (Mayaux, 1994). Triterpenik sapogeninlerle beraber steroidal sapogeninlerde bu tip araştırmaların ilgi odağı olmaktadır. Takkalonolit türevi moleküllerin taxol benzeri mikrotübül stabilizasyon üzerinden aktivite göstermeleri nedeniyle göğüs kanseri tedavisinde kullanımları araştırma konusu olmuştur (Hemscheidt, 2004).

Astragalus türlerinde yaygın olarak bulunan 20,24-epoksisikloartan glikoziti astragalozit IV bileşiğinin de çok önemli bir farmakolojik etkisi olduğu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar, AG IV'ün koroner sistem üzerinde çok etkili bir kardiyoprotektif molekül olduğunu göstermiş, özellikle Çinli ve Rus bilim adamları bu bileşiğin akut ve kronik kalp yetmezliği olan hastalar tarafından

yaygın olarak kullanılan digoksin isimli kardiyolojik ilaca alternatif olarak geliştirilebileceğini ve yan etkilerinin çok daha az olduğunu ifade etmişlerdir. Bu alanda kullanımı için astragalozit IV ve türevleri için alınmış lisanslar bulunmaktadır (Zhanga et. al., 2005).

Yarı sentez işleminin bitkisel doğal ürünlerden elde edilen aglikonlar üzerinde gerçekleştirilebilmesi için gerekli ön işlemler genel hatlarıyla şekil 2.1 üzerinde açıklanmıştır. Kullanılacak bitkisel materyal toplandıktan sonra uygun sıcaklıkta kurutulmaktadır. Ardından ekstraksiyon verimliliğini arttırmak amacıyla bitkisel materyal öğütülerek uygun tanecik boyutuna getirilmektedir. Ekstraksiyon işlemini takiben, hidroliz reaksiyonu tamamlanmakta sonra elde edilen hidrolizat nötrleştirilmekte, yoğunlaştırılmakta ve uygun sıvı-sıvı ekstraksiyonlar, çöktürme ve/veya kromatografik yöntemler uygulanıp doğal ürün saf olarak elde edilmektedir. Son olarak saf madde kurutulurken (liyofilizasyon, spray drying, vakumlu etüv vb.) solvent kalıntılarından ve neminden arındırılmaktadır. Toz olarak elde edilmiş yarı-sentez hareket maddesi olan molekül kimyasal ya da biyotransformasyon işlemleri biyoaktivite rehberli çalışmalar ışığında modifiye edilerek etkinliği yüksek yarı sentetik türevlere geçilmektedir.



Şekil 2.1 Yarı sentetik türevlerin bitkisel doğal ürünlerden eldesi aşamaları

3. HİDROLİZ REAKSİYONLARI

Saponinler, siklik piranoz ya da furanoz formlarında bulunan şekerlerin hemiasetal hidroksil gruplarının triterpen ya da steroidal iskeletle beraber asetal oluşturmasıyla meydana gelmiş glikozitlerdir. Hemiasetal hidroksil gruplarıyla, triterpenler ya da steroidler arasında bulunan eter bağı, glikozidik bağ olarak bilinmektedir. Aynı zamanda oligosakkaritlerin monosakkarit bileşenleri de eter bağlarıyla birbirlerine bağlıdır (glikozitlerarası bağ).

Bir glikozitin tamamlanmış hidrolizinde glikozit bağı parçalanarak monosakkaritler ve karbonhidrat içermeyen kısımlar (aglikon ya da genin) açığa çıkmaktadır. Hidrolizde elde edilen bu karbonhidratsız kısım *sapogenol* ya da *sapogenin* olarak adlandırılır. Bilinen bir çok glikozit eter ve ester bağı O-glikozitlerdir. Saponinlerin analizlere hazır hale gelmesinde kullanılan hidrolizle küçük ünitelere parçalama işlemi için sayısız kimyasal reaksiyon ve metot kullanılmıştır (Bakınız, örnek, Kitagawa, 1981).

3.1 Asidik hidroliz:

Asit hidroliz, saponinin asit içerisinde değişmeyen bir süre boyunca genellikle 2-4 M HCl ile 4 saatlik bir zaman aralığında yürütülmektedir. Hidrolizden sonra elde edilen sulu çözelti, dietil eter, kloroform ya da etil asetat ile ekstre edilerek aglikon elde edilmektedir. Şekerlerin sulu fazdan ekstraksiyonu, solüsyon nötralize edildikten sonra (alkali ya da iyon değiştirici reçineler ile) piridin ile gerçekleştirilmektedir (Tschesche ve Forstmann, 1957; Sandberg ve Michel, 1962).

Saponinler bu metodla kendini oluşturan birimlere tamamen ayrılmaktadır. Böylece aglikonun karakteri ve sahip olduğu monosakkaritlerin sayısı ile ilgili bilgi edinmek mümkün olmaktadır. Eğer bir prosapogenin asit hidrolize tabi tutulursa eter bağlarıyla aglikona bağlı durumda olan şeker zincirleri tespit edilebilir. Sulu reaksiyon ortamı alkol ya da dioksan ile yer değiştirebilir.

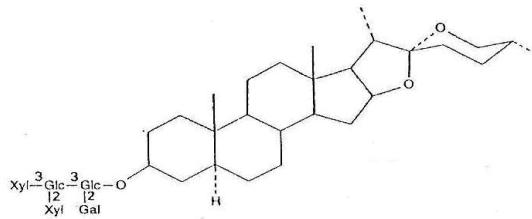
HCl'e ek olarak H₂SO₄ de saponinlerin hidrolizinde kullanılmaktadır. Sülfürik asitle molekülün degradasyonu ya da yeniden düzenlenmesi daha az oranda gözlenmesine (Kubota *et al.* 1969) karşın eter bağlarının kopması hızlı ve

verimli gerçekleşmemektedir. *Dianthus* saponinlerinden elde edilen gipsogenik asit için kullanışlı bulunan metot, dioksan içinde 1M sülfürik asitle gerçekleşen hidroliz işlemidir (Oshima *et al.* 1984a). HCl ve H₂SO₄'in suyla ve su-etanolle olan hidrolitik durumları kıyaslandığında, saponinlerin 2 saat %5'lik H₂SO₄/H₂O içerisinde ölçümlü vakum ampullerde ısıtılmasıyla sakkaritler en iyi şekilde elde edilmiştir (Kikuchi *et al.* 1987).

Bazı hidrolizler ise trifloroasetik asit ile başarılmıştır. Böylece saponinlerden ekinositik asit gibi degrede olmamış aglikonların hidrolizi, 1M trifloroasetik asit içerisinde 3 saat reflax işlemi ile mümkün olmuştur (Carpani *et al.* 1989).

Steroid saponinleri ise genellikle HCl ya da H₂SO₄'le (1-2 M), %50'lik metanol ya da dioksan içerisinde (2-5 saat 100°C ya da 10 saat 80°C) hidroliz edilebilmektedir. Furostanol glikozitlerinden bu işlemlerle oluşan yan ürünler, spirostanoller, spirosta-3, 5-dienleri ve C-25 epimerlerini (Voigt and Hiller, 1987) içermektedir. Nuatigenin glikozitleri gibi çok hassas saponinler için aglikonun yıkımı ılımlı koşullar sağlanarak önlenmeye çalışılmaktadır. Bu durumda hidroliz, metanol içerisinde 37°C'de %2'lik HCl ile 8 günde gerçekleştirilmektedir (Kesselmeier ve Budzikiewicz, 1979).

Saponinlerin solusyonda hidrolizine alternatif olarak HCl buharını direk İTK tabakasına uygulayarak hidroliz işlemi gerçekleştirilebilir. Asit buharlaştırıldıktan sonra, İTK solventiyle normal elüsyon gerçekleştirilerek mevcut monosakkaritler tanımlanabilir (Kartnig ve Wegschaider, 1971; He, 1987). Bunun anlamı, terminal şekerler olan ksiloz ve galaktoz, agavezit B'nin (Şekil 3.1) kısmi hidrolizi sonrası tanımlanabilmektedir. İTK tabakasında spotlar (8:5:1) kloroform-metanol-su çözgen sistemiyle yürütülmekte ve anilin-difenilamin-H₃PO₄-metanol (1:1:5:48) ile tanımlamaları yapılmaktadır (Uniyal *et al.* 1990).



Şekil 3.1 Agaveside B

3.1.1 Hidroliz sonrası aglikonların analizi

Hidroliz tamamlandıktan sonra, aglikonlar hidrolizattan basit filtrasyonla ya da su-organik solvent partisyonu ile ayrılabilmekte ve bilinen triterpenlere ya da steroidlere karşı analizleri yapılabilir. Bunun için en sık kullanılan yöntem İTK, kullanılan solvent sistemi ise diizopropil eter:aseton (75:30) olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.1’de görülen spray belirteçler saponinlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Çizelge 3.1 Triterpen saponinler için kullanılan belirteçler

BELİRTEÇ	REFERANS
Vanilin-Sülfürik asit	Godin, 1954
Vanilin-Fosforik Asit	Oakenfull, 1981
Lieberman-Burchard (Asetil asit-Sülfürik asit)	Abisch and Reichstein, 1960
%10 Sülfürik asit içinde %1 Seryum sülfat	Wagner <i>et al.</i> 1984a
Etanol içerisinde %10 Sülfürik asit	Kitagawa <i>et al.</i> 1984b
%50 Sülfürik asit	Price <i>et al.</i> 1987
<i>p</i> -Anisaldehyt-Sülfürik Asit	Price <i>et al.</i> 1987
Komarowsky (p-hidroksibenzaldehit-sülfürik asit)	Wagner <i>et al.</i> 1984a
Antimon(III) Klorür	Wagner <i>et al.</i> 1985
Kann	Wagner <i>et al.</i> 1984a
Su	Wagner <i>et al.</i> 1984a

Gaz-sıvı kromatografisi, aşağıda verilen örneklerde gösterildiği gibi triterpenlerin türevlendirilmesini gerektirmektedir. Oleanolik ve ursalik asidin metil esterleri GC tarafından cam kolon üzerinde 30% OV-17 yada SE-30 (Fokina, 1979) ile ayrılabilir.

Triterpenler, N,O-bis(trimetilsilil)asetamit ve klorotrimetilsilan ile türevlendirildikten sonra GC ile saptanabilir.

GC-MS de sapogeninlerin karakterizasyonunda kullanılan önemli bir yöntemdir. Trimetilsilil türevleri normal bir şekilde hazırlanmakta ve spektrometre ile analiz edilmektedir.

Triterpenlerin HPLC analizleri türevlendirme gerektirmemekte ve son derece hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Hem normal faz (Quinoa sapogeninlerin analizi; Burnouf-Radosevich ve Delfel, 1984) hem de RP-HPLC (Lin *et al.* 1981) uygulanabilmekte fakat RP-HPLC'nin bir dezavantajı olarak bileşiklerin sıvı mobil fazda çökmeye neden olduğu bilinmektedir. Bununla beraber *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae) buğday tanesi hidrolizatının aglikon analizinde butanol ekstraktı diklorometan-metanol (1:1) karışımı içinde çözülerek C-8 kolonuna enjekte edilebilmektedir. Asetonitril-su gradiyent elüsyonuyla oleonolik asit ve hederagenin sapogeninlerinin saf ayrımı sağlanabilmektedir. Bu aglikonların kantitatif analizleri sayesinde farklı quinoa gruplarının standardizasyonu mümkün olabilmektedir.

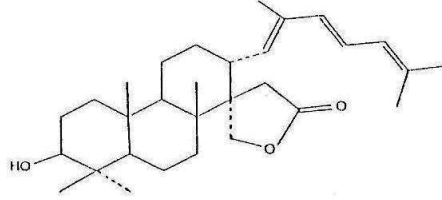
Bir aglikonun karakterizasyonu için bilinen spektroskopik tekniklerin dışında klasik kimyasal reaksiyonların ve degradasyon tekniklerinin kullanılması da mümkündür.

3.1.2. Yan ürün oluşumu

Asidik hidroliz risksiz değildir çünkü inorganik asitlerle uzun süreli ısıtma işlemi, yan ürün oluşumunu da kapsayan güçlüklerin artmasına, verimin azalmasına ve düşük seçiciliğe neden olmaktadır (Tschesche and Wulff, 1972; Kitagawa, 1981). Sadece triterpenik saponinleri değil aynı zamanda steroidal saponinler ve marin kaynaklı saponinler yapı aydınlatma çalışmalarını sıklıkla karmaşık hale getirmektedir. Örneğin, yapılan çalışmalarda soya saponinlerinin, sapogenin profili üzerindeki çeşitli hidrolitik prosedürlerin etkilerine bakıldığında soyasapogenollerden B₁, C, D ve E muhtemelen yan ürün olarak sulu ortamda hidrolizle oluşmaktadır. Bu yüzden, olean-13(18)-en soyasapogenol B₁, soya ununun etanol içerisinde HCl ile hidrolizinden sonra izole edilmektedir. Doğru aglikonlar, soyasapogenol A ve B, H₂SO₄ ve HCl ile birlikte susuz metanol içerisinde hidroliz edilmektedir (Ireland and Dziedzic, 1986a). Diğer problem ise

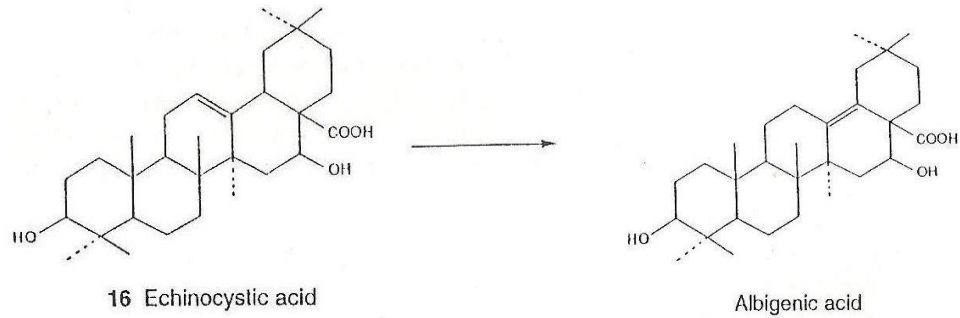
oleanolik asit ve hederagenin glikozitinin dioksan içinde asidik hidrolizi esnasında lakton oluşumudur (Hiller et al. 1987a,c).

Hovenozitlerin (jujubogenin glikozitleri) sülfürik asitle hidrolizleri sonucunda, benzer şekilde lakton ve ebelin lakton oluşumu gözlenmektedir.(Şekil 3.2) (Inoue et al.1978)

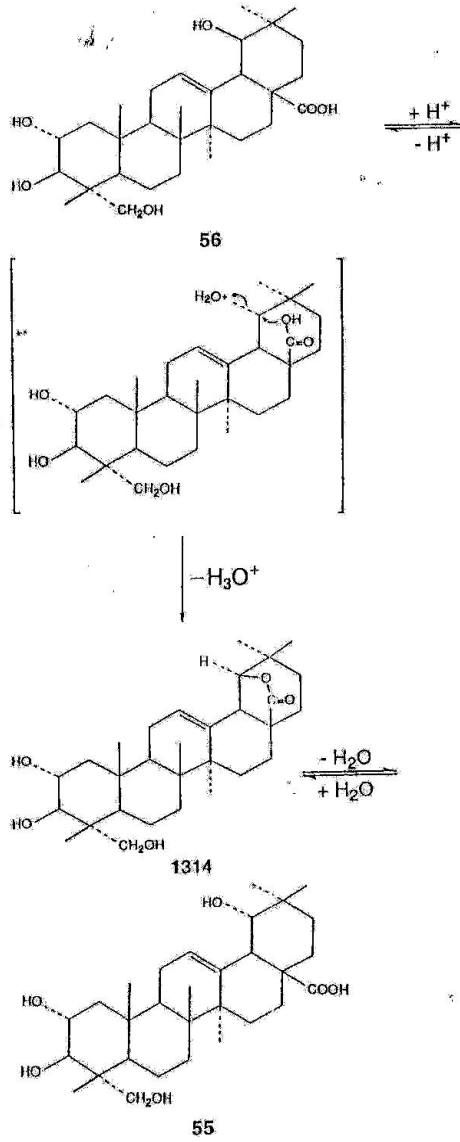


Şekil 3.2 Hovenozitlerden lakton ve ebelin lakton oluşumu

Hidroliz esnasında triterpenlerde asit katalizli çift bağ göçü meydana gelmektedir. Örneğin, bazı olean-12-enler, sulu etanol içerisinde HCl ile birlikte olean-13(18)-enlere izomerize olmaktadır. (Kubota et al.1969). Quillaik ve ekinositik asidin her ikisi de olean-13(18)-enlere bu koşullar altında benzer şekilde izomerize olmaktadır (Şekil 3.3).



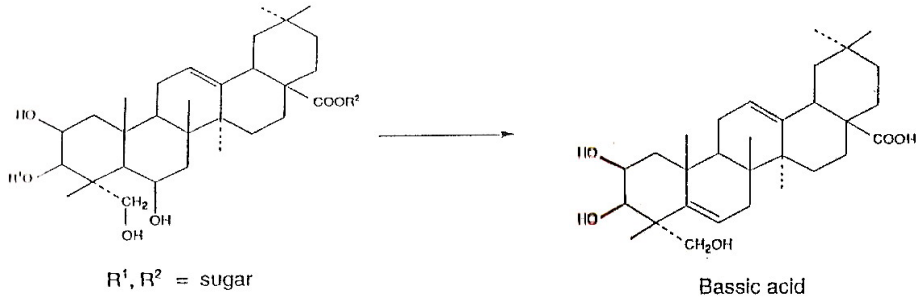
Şekil 3.3 Ekinositik asidin albigenik aside asidik hidrolizle transformasyonu



Asit hidroliz esnasında epimerizasyonun mümkün olduğu arjungenin'in (Şekil 3.4_56) tometozik aside (Şekil 3.4_55) dönüşümü örnek gösterilebilir. Transformasyon yolağı şekil 3.4'te gösterilmiştir. Kokalik asidin, ekinositik aside transformasyonu 16-OH gruplarının epimerizasyonu ve muhtemelen $28 \rightarrow 16$ lakton üzerinden meydana gelmektedir.

Şekil 3.4 Arjungenin Epimerizasyonu [Cui ve ark., 1993-1994]

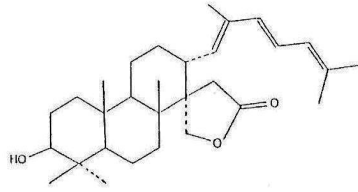
Protobassik asit saponinlerinin %10'luk H_2SO_4 'le hidrolizi dehidrasyon ve bassik asit oluşumuyla sonuçlanmaktadır. (Şekil 3.5)



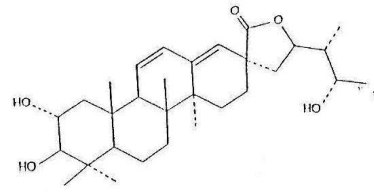
Şekil 3.5 Arjungenin epimerizasyonu

Gerçek aglikonu elde etmek için bu hidroliz işlemi toprak bakteri preparatı ile beraber gerçekleştirilmelidir. Ayrıca yan ürün oluşumunu engellemek için kullanılabilecek diğer metodlardan bu bölümün devamında bahsedilecektir.

Sesamum alatum'dan (Pedaliaceae) sağlanan alatozit A'nın (Şekil 3.6) asit hidrolizi benzer şekilde dehidrasyon reaksiyonu ile sonuçlanmaktadır. Yan ürün olarak oluşan 18,19-sekoursa-11,13(18)-dien-28,21-lakton (Şekil 3.7) molekülü konjuge dien sistemine sahip olması nedeniyle yüksek UV absorpsiyonu (λ_{max} 250 nm) vermektedir. Esas aglikon alatogenin, alatozit A'nın (Şekil 3.6) enzimatik hidrolizi sonrası elde edilmektedir.



Şekil 3.6 Alatozit A



Şekil 3.7 18,19-sekoursa-11,13(18)-dien-28,21-lakton

Furostanol bidezmozitleri, metanol ile reflaks edildiğinde daha az polar 22-OCH₃ türevlerine dönüşmektedir. Bu türevler kaynayan su ya da seyreltilmiş dioksan işlemlerine tabi tutulduktan sonra başlangıçtaki 22-OH bileşiklerine yeniden rejenere olabilmektedirler (Kawasaki,1981).

Ekstraksiyonun prosedürü de bir bitkiden izole edilen saf bileşiklerin yapısında değişime yol açmaktadır. Monodesmozidik:bidesmozidik saponin oranı ekstraksiyon koşullarını önemli ölçüde değiştirmektedir (Domon ve Hostettmann,1984; Kawamura *et al.* 1988).

3.2. Bazik hidroliz

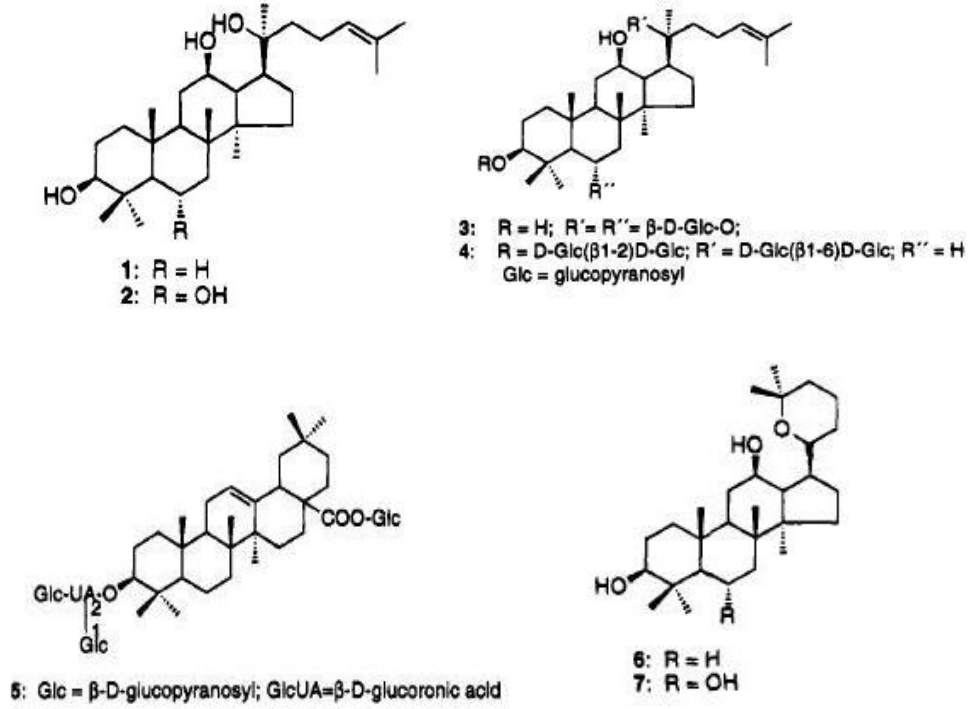
O-açilglükozidik şeker zincirlerinin bazik hidroliz koşulları altında koparılması genellikle 0,5M KOH ile reflaks yapılarak gerçekleştirilmektedir (Domon and Hostettmann,1984; Kochetkov and Khorlin, 1966). Alternatif olarak KOH'in %1-20'lik metanolik ya da etanolik solüsyonları kullanılabilmekte ancak bu durumda triterpen asitlerinin karboksil gruplarında metilasyon riski söz konusu olmaktadır. Dowex 1 gibi iyon değiştiriciler ılımlı bazik hidroliz koşullarının

oluşmasını sağlamaktadır (Bukharov and Karlin, 1970a). Bir diğer metot ise kollidin içerisinde lityum iyodür kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Kochetkov *et al.* 1964b).

Reaksiyon koşullarının dikkatli bir şekilde kontrolüyle selektif olarak farklı ester gruplarını koparmak mümkün olmaktadır. K₁₁ kizuta saponininin 30 dakika 0.5M KOH ile reflaks işlemi (hidroliz) sonucunda bidezmozitin C-28 konumundaki şeker koparılabilmektedir. Diğer yandan, saponinin 20 saat boyunca oda sıcaklığında 0.1M KOH ile karıştırılması ile C-28 konumlu ester glikozit zincirindeki asetat grubu seçimli olarak giderilebilmektedir (Kizu *et al.* 1985b)

1990'lı yıllarda Cui ve ark. tarafından ginsenositlerde bulunan glikozit bağlarını kırmaya yönelik yapılan çalışmada butanol içerisinde oksidatif ortamda alkali koşullar sağlandığında hidroliz işlemi %95 üzeri verimle başarılmaktadır. Reaksiyon verimi asidik koşullarda yapılan hidroliz işlemine göre çok daha verimli bulunmuştur. Ginsenosit bağlarının bazik koşullar altında asidik koşullara göre çok daha kararlı olması şaşırtıcıdır. Reaksiyon ortamındaki oksijen ya da hava nitrojen ile değiştirildiğinde dönüşüm çok az ya da hiç gerçekleşmemektedir. Ortama antioksidan, glikoz ya da su ilavesiyle dönüşüm seviyesi azalmaktadır. N-butanol solventi sec-, iso- ya da 2-metil-2-propanol ile yer değiştirdiği zaman ürün verimi %75'e düşmektedir. Solvent olarak n- ya da izopropanol kullanıldığında verim %40 olarak gözlenmiştir. Glikoz gruplarının bu koşullar altında tamamen degrede olduğu ve 5/1 oranında format ve karbonatın major ürün olarak elde edildiği gösterilmektedir. Son on yıl içinde saponinlerdeki gibi oligosakkaritlerin glikozit bağlarını parçalamak için uygulanan tetreasetat oksidasyonu, anoksik oksidasyon, UV ışınlama, asit- ve toprak bakteri hidroliz yöntemleri geliştirilmeye çalışılmış ancak verimleri genellikle yan ürün oluşumu ve aglikonda meydana gelen değişimlerden dolayı düşük bulunmuştur (Cui ve ark., 1993-1994).

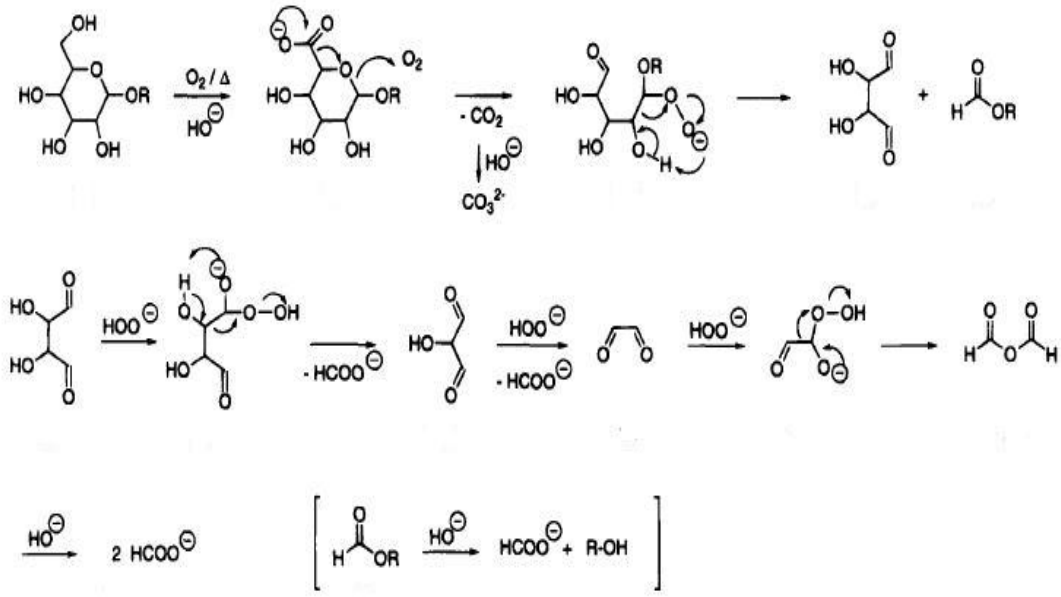
Alkali koşullarda butanol içerisinde yapılan bu çalışma esnasında yüksek verimlerle (S)-20-protopanaksadiol (Şekil 3.8_1) ve (S)-20-protopanaksatriol (Şekil 3.8_2) sapogeninleri elde edilmiştir. Buna karşın asit hidrolizde bahsedilen bu iki sapogeninin yanı sıra 10 adet yan ürün oluşmaktadır.



Şekil 3.8 1= (S)-20-protopanaksadiol, 2= (S)-20-protopanaksatriol 3= Ginsenozit Rg1, 4= Ginsenozit Rb1, 5= Ginsenozit Ro, 6= Panaksadiol, 7= Panaksatriol [Cui ve ark., 1993-1994]

Elde edilen diğer sonuçlar ise şu şekildedir. NaOH alkali olarak kullanıldığında reaksiyon 90°C'de 13 saat civarında gerçekleşmekte iken onun yerine NaOMe kullanıldığında reaksiyon çok daha hızlı ilerlemekte ve 5 saat içinde tamamlanmaktadır. Bizim çalışmamızda da NaOMe kullanımı denenmiş ve dönüşümün hızlı olduğu gözlenmiştir ancak sodyum metoksitin kanserojen özelliğinin ve maliyetinin fazla olması nedeniyle ticari ölçekte kullanımının uygun olmadığına karar verilerek optimizasyon esnasında NaOH kullanılmıştır.

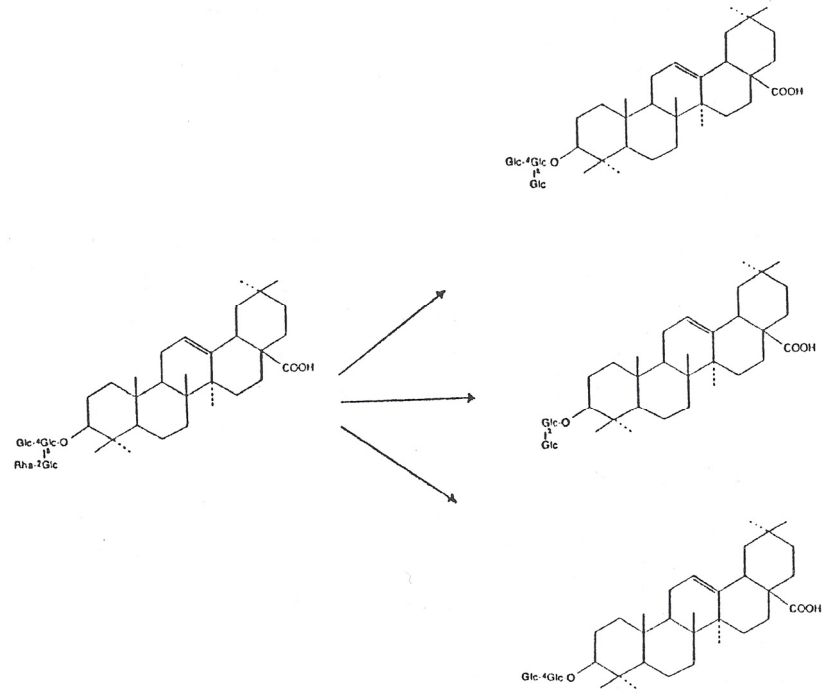
Aynı çalışmada farklı solventlerin reaksiyon üzerindeki etkileri incelenmiş n-BuOH'ün %100, s-BuOH'ün %73, i-BuOH'ün %74, t-BuOH'ün %73, n-PrOH'ün %38 ve i-PrOH'ün % 35 oranında dönüşüm sağladıkları tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen oksidatif açılma reaksiyona ait öngörülen mekanizma şekil 3.9'daki gibidir. (Kitagawa, 1983)



Şekil 3.9 Alkali hidroliz reaksiyonu mekanizması [Cui ve ark., 1993-1994]

3.3. Kısmi hidroliz:

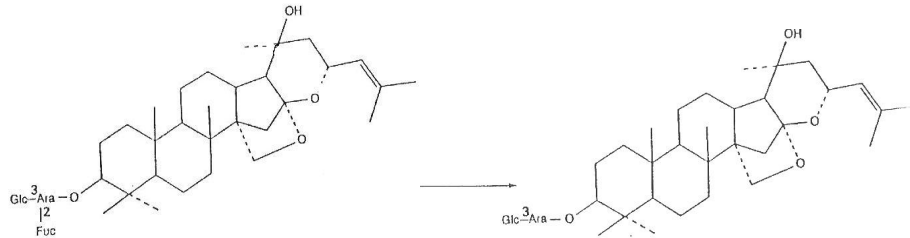
Saponinlerin uzun şeker zincirlerine sahip oldukları ya da yüksek oranda dallandıkları bazı durumlarda yapı aydınlatma çalışmalarında gerekli olan fragmentleri elde etmek için kısmi hidrolizi içeren bir prosedür kullanılmaktadır. Bu işlem asidik ya da enzimatik olarak başarılmaktadır. Oligosakkaritler ve/veya kalan saponin kısımları izole edildikten sonra karakterize edilmektedir. Örneğin *Phytolacca dodecandra*'dan elde edilen (Şekil 3.10_254) saponinin, 0.1M HCl ile 45 dakika muamelesi sonucunda 3 ürün karışımı elde edilmektedir.(Şekil 3.10_165,217,1312)



Şekil 3.10 *Phytolacca dodecandra*'dan elde edilen saponinin asit hidrolizinden sonra elde edilen ürünler

Bu bileşikler RP-LPLC ile ayrılmakta ve şeker dizileri MS, ^{13}C -NMR ve alditol asetatlarının GC-MS analizi yapılarak tayin edilebilmektedir. Tüm bu bilgiler bir araya getirildiğinde 254 numaralı bileşiğin formülü 3-O- $\{\text{O-}\alpha\text{-L-ramnopironozil-(1}\rightarrow\text{2)-O-}\beta\text{-D-glukopiranozil}\}$ oleanolik asit olarak belirlenmiştir.

Dioksan içerisinde hidroliz işlemi ile de ılımlı koşullar sağlanmakta ve kısmi hidroliz mümkün olmaktadır. Aşağıdaki örnekte saponinin 6 saat dioksan:0.1 M HCl (1:3) içerisinde reflaks işlemi görülmektedir.



Şekil 3.11 Dioksan:0.1 M HCl ile Kısmi hidroliz [Cui ve ark., 1993-1994]

Kısmi hidroliz için kullanılan bir diğer metotta triterpen saponin solüsyonunun alkol içerisinde alkali metal ile muamele edilmesinden sonra eser miktarda su ilavesi yapılmaktadır.

3.4. Hidrotermoliz:

Triterpenlerin ve steroid glikozitlerin hidrotermolizi aynı aglikon ve prosapogeninlerin oluşumuna yol açmaktadır (Kim *et al.* 1992). Metot glikozitlerin su ile ya da 100-140°C 'deki su-dioksan sistemi ile örneğe bağlı olarak 10 ile 140 saat arası bir zaman diliminde uygulanan ısıtma işlemini kapsamaktadır. 3,28-*O*-biglikozitler'in hidrotermolizi sonucunda 3,28-*O*-glikozitler elde edilmektedir (Kim *et al.* 1992).

3.5. Enzimatik hidroliz:

Enzimatik hidroliz, yan ürün oluşumu gözlenmeksizin, saponinlerden şekerleri koparmak için kullanılan, çok ılımlı ve etkili metottur. Tüm şekerler için konuyla ilgili olan hidrolazlar ticari olarak uygun olmamalarına rağmen β -glukozun β -glikozidaz ile koparılması tam olarak gerçekleşmektedir.

Spesifik enzimle bu ayrılma işleminin yararına bir ek olarak, şeker kısmının anomerik konfigürasyonu otomatik bir şekilde sağlanmaktadır. Uygulanabilirliğin mümkün olduğunu örneklemek gerekirse;

- β -galaktozidaz, *Solanum dulcamara*'nın furostanol glikozitlerini hidrolizleme işleminde

-Selülaz Kizuta saponin K_{7A} 'dan glikoz ayrılmasında (Kizu *et al.* 1985a) ya da sakkarit kısımlarının kısmi hidrolizinde (Yoskikawa *et al.* 1991b) kullanılmaktadır.

-Ham hesperidinaz (Kohda ve Tanaka, 1975; Mizui *et al.* 1988) Rb₁, Rb₂, Rc, Rg₁ (Kohda ve Tanaka, 1975; Tanaka ve Kasai, 1984) gibi *Ginseng* saponinlerinden esas aglikonun yüksek verimle elde edilmesini sağlamaktadır. Hesperidinaz triterpen dissakkarit alatozit A'dan (691) ramnoz ünitesini koparmada etkili olmaktadır (Potterat *et al.* 1992). *Polyscias dichroostachya*'dan elde edilen (Araliaceae) caulosit D'nin (372) yapı tayininde hesperidinazla

enzimatik hidroliz gerçekleştirilerek C-28 şeker zincirindeki terminal ramnoz üniteleri koparılmaktadır.

-*Aspergillus niger*'den elde edilen pektinaz terminal ramnoz ünitelerini koparma işleminde kullanılmaktadır (Kimata *et al.* 1983; Watanabe *et al.* 1983). Ham pektinazın aynı zamanda glikoz kısımlarını koparmada etkili olduğu bilinmektedir (Ohtani *et al.* 1990)

-Naringinaz D (*Aspergillus niger*'den elde edilen 10 ünite pektinazla beraber aynı zamanda ramnozidaz ve β -glikozidaz olan 200 ünite naringinaz) ramnozil kısımlarının koparılmasında (Elajoba ve Hardman, 1985) aynı zamanda hovenozitlerden ksilozu ayırmak için kullanılmaktadır (Inoue *et al.* 1978).

-Proteaz (*Aspergillus satoi*'den tip 13) ksiloz ünitelerini (Inada *et al.* 1987b) koparmak ve aynı zamanda sülfatlanmış saponinden gentibiyosit ünitesini ayırmak için kullanılmıştır (Inada *et al.* 1988). Molsin uygulaması *Beesia* türlerinde bulunan sikloartan glikozitlerinden ksiloz ünitelerini koparmaktadır (Sakurai *et al.* 1986).

-Ksilozidaz terminal ksiloz kısımlarını hidrolizlemek ve *Sesamum alatum*'dan elde edilen saponinlerin yapı çözümlemesinde kullanılmıştır (Potterat *et al.* 1992)

-Yulaftan elde edilebilen bir β -glikozidaz olan Avenakosidaz, furostanol saponinlerinin C-26 konumunda bulunan glikoz ünitesini kırmaktadır. Tütün tohumlarından elde edilen saponinlerin bu enzimle hidrolizi sonucunda halka ve spirostanol oluşumu gözlenmeden C-26 konumundan deglikozidasyon sağlanmaktadır (Grünweller *et al.* 1990).

-Hesperidinaz, naringinaz, pektinaz, selülaz, amilaz ve emülsin'in ham preparatları üzerinde yapılan sistematik bir çalışmada, hesperidinaz, naringinaz ve pektinazın, ginsenositlerin hidrolizinde çok etkili oldukları gösterilmiştir (Kohda ve Tanaka, 1975).

Helix pomatia salyangozundan elde edilen enzim preparatları ve diğer kaynaklar şeker gruplarının hidrolizi için alternatif bir yol sağlamaktadır. Örneğin *Helix pomatia* salyangozlarının taze hepatopankreatik suyu, *Passiflora quadrangularis*'den elde edilen quadrangulozitin gentibiyozit kısmını ayırmada

oldukça etkilidir (Orsini et al. 1986). Şeker zincirini hidrolizlemenin bir başka yolu da fare intestinal florasından yararlanarak başarılmıştır (Shimizu *et al.* 1985).

Şeker zincirlerinde (dallanmış zincirlerde) sterik engel söz konusu olduğunda enzimle gerçekleştirilen katalitik hidroliz esnasında zorluklar meydana gelmektedir. β -glikoz kısmının koparılamadığı ya da sadece β -glikozidazla yavaşça ayrıldığı durumlarda, β -glukuronidaz ile çok etkili reaksiyonlar yapılabilmektedir (Dorsaz ve Hostettmann, 1986). Thladiozit H₁'e ait 3-O- β -galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -glukuronopiranozil disakkaritinin yıkımı da β -glukuronidaz ile başarılmıştır (Nie *et al.* 1989).

3.6. Mikrobiyal hidroliz

Mikrobiyal hidroliz aslında bir enzim kombinasyonu ile yapılan enzimatik hidrolizdir. Bu yöntem mikroorganizmaların saponinin karbon kaynağı olarak kullanıldığı besin ortamında kültürlerinin hazırlanmasını gerektirmektedir. Mikroorganizmaların saf kültürleri kullanılmaya başlanmasından bu yana uygun suşun saptanması için kapsamlı başlangıç tarama testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

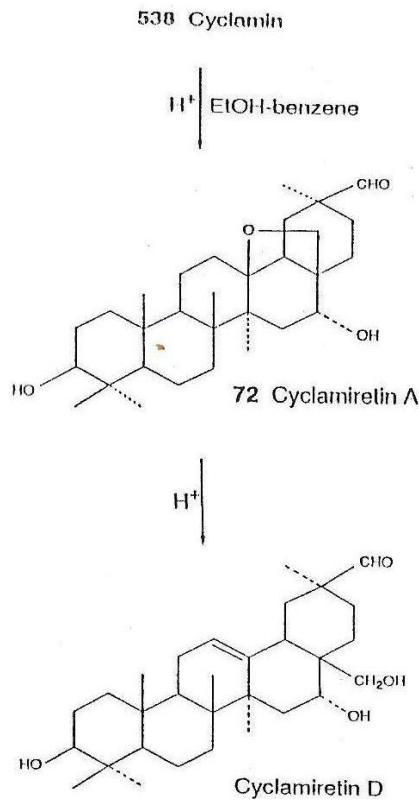
Örneğin diosgenin yarı endüstriyel ölçekte mikrobiyal hidrolizle *Aspergillus terreus* ile beraber *Dioscorea tokoro*'dan elde edilmektedir (Kitagawa, 1981). Toprak mikroorganizmaları da saponinlerin hidrolizinde başarıyla uygulanmaktadır. Toprak örneğinde hidroliz için etkili bir şekilde kullanılan mikroorganizma olarak *Pseudomonas* türleri tanımlanmaktadır.

3.7. Ilımlı ve seçimli ayırma yöntemleri

Daha öncede belirtildiği gibi asit hidroliz, aglikonun modifikasyonuna yol açabilmektedir. Bu problem, saponinlerin yapı tayinleri esnasında zorluklara neden olmakta ve başka metodlarla seçimli olarak esas aglikon elde edilebilmektedir. Bunun için kullanılabilecek yöntemlerden birisi enzimatik hidrolizken aşağıda bahsedilen kimyasal yöntemler de uygulanabilmektedir.

3.7.1. İki faz ortamında asit hidroliz

Eğer ortamla karışmayan bir organik solvent (benzen, etil asetat) asit hidroliz esnasında sulu ortama eklenirse, sapogenolün organik faza geçmesi sağlanır böylece ikinci modifikasyon engellenmiş olmaktadır. Bu yöntem *Cyclamen europaeum*'un köklerinden elde edilen siklamin'in hidrolizi için kullanılmıştır (Tschesche *et al.* 1964). Siklamin'in normal asit hidrolizi sonucunda siklamiretin D, etanolik HCl içeren benzen ortamında hidrolizi sonucunda ise siklamiretin A sapogenölü oluşmaktadır (Şekil 3.12).



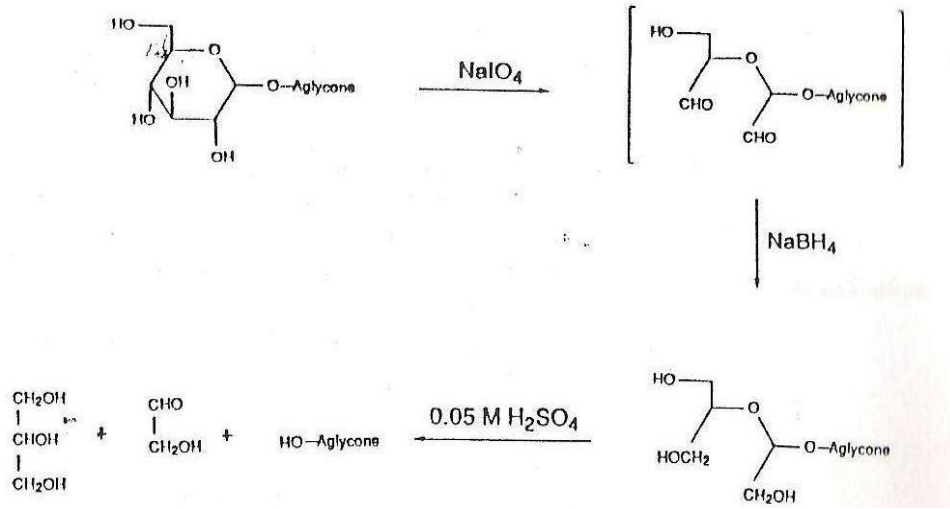
Şekil 3.12 Siklaminin iki-faz asit hidrolizi [Cui ve ark., 1993-1994]

Tetraklorür içinde HCl ile beraber iki faz sistemi steroidal alkaloidlerin hidrolizi için de önerilmektedir (Van Gelder, 1984).

3.7.2. Periyodat degradasyonu

Smith degradasyonu. Visinal hidroksil gruplarının periyodat oksidasyonu (ör: ramnozda) sonucunda aldehit oluşmaktadır. Bu indirgenmiş ve modifiye

olmuş şeker kısımları ılımlı bir asit hidrolizle kolayca ayrılabilir (Şekil 3.13). Periyodat degradasyonu birçok saponinin örnek olarak *Guaiacum officinale*'nin yapı tayininde uygulanmıştır. Ayrıca ginsenositlerden sapogeninlerin eldesinde de kullanılmaktadır (Tanaka ve Kasai, 1984). Bu metod aynı zamanda *Polyscias scutellaria*'dan elde edilen saponinlerde olduğu gibi şekerlerin bağlanma pozisyonları hakkında da bilgi vermektedir (Paphassarang *et al.* 1989). Ancak bu verimlerin oldukça düşük olduğu belirtilmektedir.



Şekil 3.13 Smith Degradasyonu [Cui ve ark., 1993-1994]

Smith-de Mayo degradasyonu, *Polygala senega*'dan elde edilen esas aglikonun izolasyonu (Dugan ve de Mayo, 1965) ve hovenozitlerden şekerlerin koparılması işlemlerinde uygulama alanı bulan bir modifiye Smith degradasyon metodudur (Inoue *et al.* 1978).

3.7.3. Alkali metaller

Alkali metalin alkolik solüsyonu ile glikozidik bağların koparılması mümkün olmaktadır. Bu reaksiyonu ilerletebilmek için eser miktarda su gerekmektedir (Ogihara ve Nose, 1986). Bu sayede saikosaponin C'den (544) saikogenin E ve prosapogenin karışımı elde edilebilmektedir (Ogihara ve Nose, 1986).

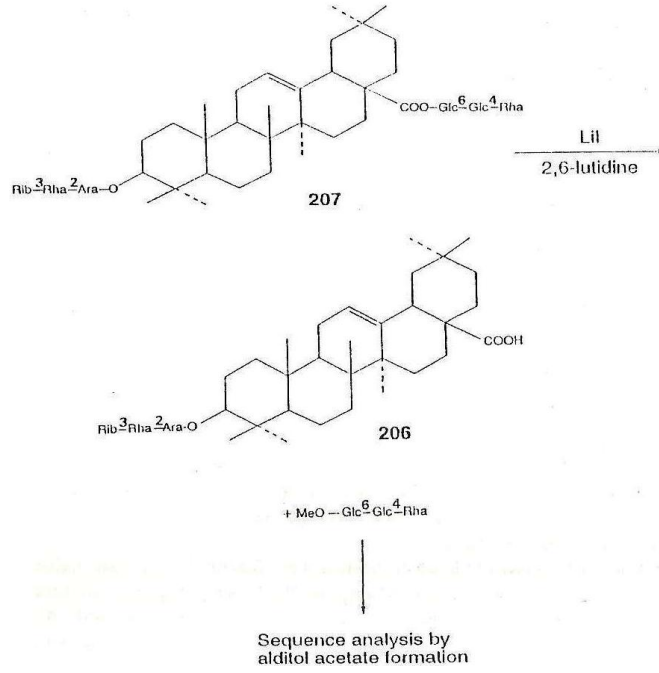
Hovenia dulcis'ten (Rhamnaceae) elde edilen saponin D, etanol içerisinde sodyum metali ile 50°C'de 7 saat muamele edildiğinde 3-glikozil-20-ramnozil ve değişikliğe uğramamış saponin D ile beraber 20-ramnozil türevlerini de içeren aglikon karşımını (jujubogenin) elde edilmektedir (Ogihara *et al.* 1987).

Anagallis arvensis'ten elde edilen (Primulaceae) saponin aglikonlarının izolasyonu için n-butanol içerisindeki sodyum solüsyonu kullanılır. Anagallisin A'nın alkali metal solüsyonu ile 40 saat 95°C'de ısıtılmasının ardından 3 β ,16 α ve 23 numaralı karbonlarına –OH grubu bağlı olan oleanan tipi anagalligenin B triterpen aglikonu elde edilmiştir (Mahato *et al.* 1991).

3.7.4. Lityum iyodür

Ester glikozit bağlarının seçimli bir şekilde ayrılması işlemi saponinin susuz lityum iyodür ve 2,6-lutidin (ya da kollidin) içeren susuz metanol ortamında bulunmasıyla gerçekleşmektedir (Ohtani *et al.* 1984). Bu genellikle kantitatif bir reaksiyon olup parçalanmadan sonra şeker kısımlarının zarar görmeden eldesi sağlanmaktadır. Bu şeker zinciri şekil 3.14'te (Mizutani *et al.* 1984) görüldüğü gibi alditol asetat oluşumuyla tespit edilebilmektedir.

Aynı metot *Kalopanax septemlobus* (Araliaceae) köklerinden elde edilen kalopanaks saponinlerinin (Shao *et al.* 1989b) ve *Thladiantha hookeri*'den (Cucurbitaceae) elde edilen thladiozit H1'in kısmi yapı tayinlerinde de (Nie *et al.* 1989) kullanılmıştır.



Şekil 3.14 Lityum iyodür ile ester glikozit bağlarının koparılması reaksiyonu
[Cui ve ark., 1993-1994]

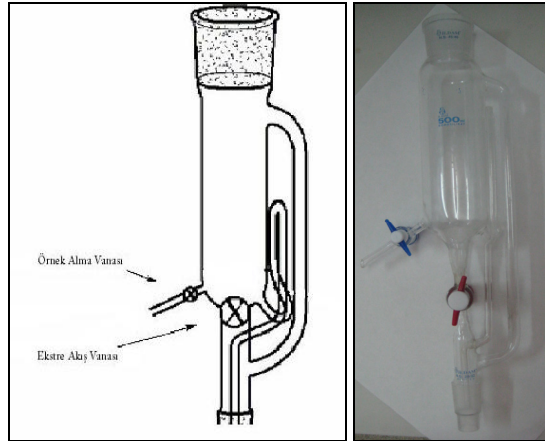
3.7.5. Lityum alüminyum hidrür

Lityum alüminyum hidrür, saponinlerden sakkaritlerin indirgeyici kırılmaları için kullanılmaktadır. Örneğin permetillenmiş entada saponin-H1'in LiAlH_4 ile muamelesi C-3 konumunda bulunan şeker grubunun kopmasına neden olmaktadır (Okada *et al.* 1987). O-açilglikozidik şeker zincirlerinin olması durumunda (çoğu bidezmosidik saponinde bulunan), permetillenmiş saponinin LiAlH_4 ile indirgenmesi olayı açilglikozidik bağının kopmasıyla sonuçlanmaktadır (Kaonoshima *et al.* 1980; Okada *et al.* 1980). Bu yöntem bidesmozidik saponinlerin yapı tayininde oldukça yararlı olmaktadır çünkü ester bağlı şeker grubunun ayrılmasını takiben yapının ve eter bağlı şeker zincirindeki şekerlere ait glikozitlerarası bağın tayini mümkün olmaktadır. Ayrılan şeker zincirinin yapısal araştırması NMR ile (Higuchi and Kawasaki, 1972; Tsukitani and Shoji, 1973; Tsukinatti *et al.* 1973), kısmi metillenmiş monosakkaritlerin hidrolizi ve takibindeki kromatografik analizlerle ya da uygun alditol asetatların GC-MS analizi ile gerçekleştirilebilmektedir.

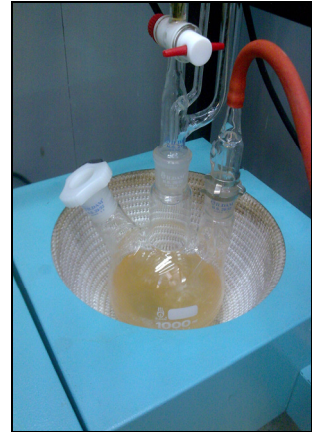
4. MATERYAL VE YÖNTEMLER

4.1 Deney yöntemi

Bu çalışma kapsamında ilk olarak kullanılan reaksiyon düzeneği; küçük ve orta ölçek optimizasyon denemeleri için temelde üç boyunlu balon, modifiye Soxhlet ekstraktörü, manyetik karıştırıcı, ceketli ısıtıcı ve sirkülatöre bağlı geri soğutuculardan oluşturulmuştur. Soxhlet ekstraktörü şekil 4.1’de görüldüğü gibi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu modifikasyon ekstraktörün kapalı olan alt kısmının açılıp bir vana sisteminin ilavesiyle gerçekleşmiştir. Aynı zamanda bitkisel materyalin hareketlenmesini sağlayacak hava girişi vanası ekstraktör haznesine ilave edilmiştir. Ancak küçük ve orta ölçekte yapılan denemeler neticesinde bitkileri hava ile karıştırmak çok fazla solvent kaçağına neden olduğu için bu vana ekstraksiyon tur sayısı tespitinde örnek almak için kullanılmıştır. Küçük ve orta ölçek denemelerinde kullanılmış olan üç boyunlu balonların yan boyunlarından biri hava veya O₂ girişi için, diğeri çözgen-alkali ilavesi veya örnek almak için, üçüncü ve ortada yer alan boyun ise ekstraktörün oturtulması için kullanılmıştır.

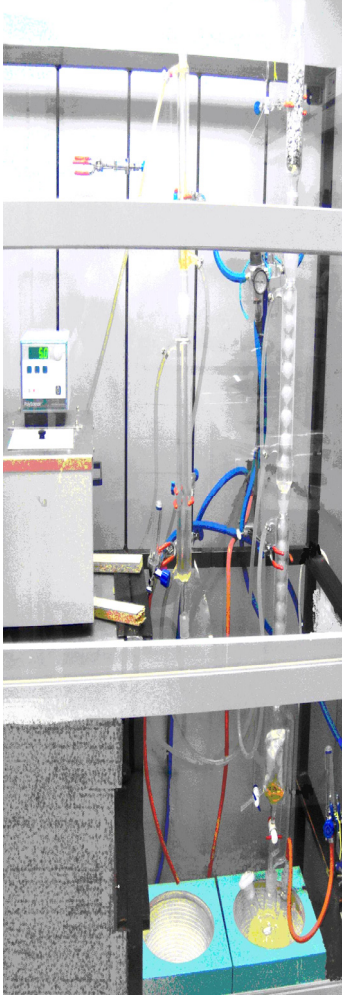


Şekil 4.1 Modifiye soxhlet ekstraktörü

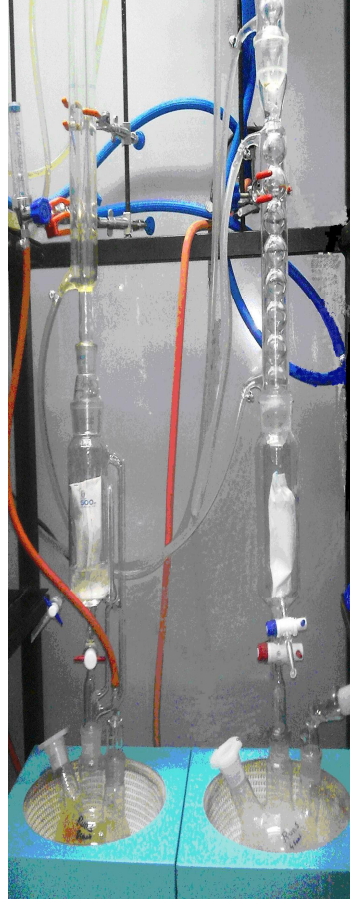


Şekil 4.2 Üç boyunlu balon

Ekstraktörün üzerine yoğunlaşmak için gelen n-BuOH’ün hava/O₂’in yaratacağı akım nedeniyle sistemden kaçabileceği hesaplanarak sirkülatöre bağlı çok sayıda soğutucu kullanılmıştır. Fakat bu kaçaklar %100 giderilemediği için daima son solvent hacmi dikkate alınarak derişim tayinleri yapılmıştır.



Sekil 4.5 Küçük Ölçek Reaksiyon Düzenegi



Sekil 4.3 Hava Difüzörü



Sekil 4.4 Solvent tutucu



Sekil 4.6 Rotametre

Üç aşamalı olarak gerçekleştirilen çalışmamızın ilk basamağında 1000 mL'lik balon (Şekil 4.5) ve 500 mL'lik ekstraktör kullanılmıştır. Optimizasyon sırasında incelenen parametreler en uygun çözen-bitki oranı, zaman, gaz türü (oksijen, hava) ve miktarı, alkali derişimi ve gaz akış hızı olmuştur. Bu parametrelerden çözen bitki oranı ve alkali derişimi bir sonraki ölçeğe oransal olarak aktarılabilirken gaz akış hızı ve zaman ölçeğin büyümesiyle farklılaştığı için bu parametreler her bir ölçek için ayrı ayrı optimize edilmiştir. Orta ölçek olarak belirlenen ikinci basamakta 6000 mL'lik balon ve 2000 mL'lik ekstraktörden oluşan sistem (Şekil 4.8) test edilmiştir.

Paralel verimliliğin elde edilmesi üzerine son aşama olarak ekstraktör ve hidroliz ünitelerinin bir arada bulunduğu 20 L'lik reaktör ve 10 L'lik ekstraktör ünitesinden oluşan pilot ölçekli yeni cam sistem (Şekil 4.10) üzerinde denemelere

geçilmiştir. Reaksiyonların ilerleyişi ise İTK ve HPLC gibi kromatografik yöntemler kullanılarak takip edilmiştir.



Şekil 4.7 Küçük ölçekli ekstraktör görüntüsü



Şekil 4.8 Orta ölçekli reaksiyon düzeneği



Ekstraksiyonu ve alkali hidrolizi aynı anda gerçekleştirmeyi amaçladığımız pilot ölçekli sistemde (Şekil 4.9) ve ön çalışmalarda kullandığımız Soxhlet-reaksiyon balonu sisteminin çalışma prensibi hemen hemen aynıdır. Pilot ölçekli sistemde gerçekleşecek reaksiyonun basamakları aşağıdaki şekilde olmaktadır;

a) Sistemde çözügen olarak kullanılacak n-butanol ilk önce alkali hidroliz tankına eklenmekte ve uygun derişime gelmesini sağlayacak kadar NaOH ilave edilmektedir.

b) Ceketli ısıtıcı yardımı ile reaksiyon çözügeninin (n-BuOH) buharlaşması sağlanmaktadır.



Şekil 4.10 Pilot ölçek deney düzeneği görüntüsü

4.2. Kullanılan kromatografik yöntemler

4.2.1 İnce tabaka kromatografisi (İ.T.K.)

Çalışmamızdaki reaksiyonların kontrollerinde normal faz silika jel kaplı hazır plaklar kullanılmıştır.

<u>Kromatografi tankı:</u>	Camag, 22 x 23 x 8 cm
<u>Adsorban:</u>	Silika Jel (Alüminyum folyo, hazır plak, Kiesegel 60 F ₂₅₄ , 0.2 mm, Merck, Art.5554)
<u>Solvan sistemleri:</u>	(70:30:3) (CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O) (10:10:2) (Hex:EtOAc:MeOH), 100:20:15 (EtOAc:MeOH:Su)
<u>Tatbikler:</u>	Pastör pipeti ile plağın alt ucunun 1-1.5 cm yukarısından 0.7 cm ara ile yapılmıştır.
<u>Sürüklenme mesafesi:</u>	7-9 cm

Lekelerin Belirlenmesi: Sülfürik asidin sudaki %20'lik çözeltisi püskürtülmüş, ardından plaklar 5-10 dakika 105-110 °C'de ısıtılarak lekeler belirlenmiştir.

4.2.2. Açık kolon kromatografisi

Çalışmamızda HPLC analizlerine başlamadan önce astragalozit IV ve sikloastragenol moleküllerine ait kalibrasyon grafiklerinin çizilebilmesi için bu moleküller bitki ekstresinden yola çıkılarak saflaştırılmıştır. Bu moleküllerin eldesi için gerçekleştirilen ön fraksiyonlama ve izolasyon aşamalarında normal faz silika jel ile doldurulmuş klasik açık kolon kromatografisinden yararlanılmıştır. Fraksiyonlar, 5-15 mL toplanmış ve kontrolleri İ.T.K ile yapılmıştır.

Dolgu Materyali: Silika jel (Kieselgel 60, 70-230 mesh, Merck),

Silika Jel Kolonun Hazırlanması: Yeterli miktarda çözgen sistemi ile silika jel süspanse hale getirilmiş ve karışım alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Adsorbanın üzerinde birkaç mm yüksekliğinde çözgen kalıncaya kadar akıtılmıştır.

Numune Tatbiki: Numune yeterli miktarda çözgen içinde ultrasonik banyoda çözülerek pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edilmiştir. Kolonun üzerine de yüzeyin bozulmasını önlemek için pamuk yerleştirilmiştir.

Fraksiyon Miktarı: Fraksiyonlar 5-15 mL olacak şekilde toplanmıştır.

4.2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

HPLC, hızı, duyarlılığı ve uçucu olmayan polar bileşiklere uyarlanabilirliği nedeniyle saponin ve sapogeninlerin analizi için idealdir.

Modern kromatografi çeşitli maddelerin hareketli bir faz yardımıyla sabit bir faz üzerinde değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanan ayırma tekniklerinden oluşmaktadır.

Mobil faz; örnek bileşenlerini sabit faz boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel veya kimyasal özelliklere sahip çözücü karışımlarıdır. Kullanılacak mobil fazın seçiminde, analizi yapılacak örnek madde bileşenlerinin özellikleri, kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri gibi birçok parametreye dikkat edilmektedir. Sabit faz ise mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır.

Tüm ilkel kromatografik yöntemlerde (İTK, kağıt kromatografisi) mobil faz, sabit faz içerisinden kapiler etki ve yer çekimi gibi etkenler sayesinde geçer. “Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi” veya “Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi” olarak bilinen HPLC’de ise mobil faz sabit faz (kolon) içerisine yüksek basınçla pompalanmakta, istenilen akış hızında ayırma yapabilen duyarlı bir kromatografi tekniği olarak bilinmektedir. Genel olarak pompa, mobil faz, enjektör, kolon, dedektör ve bilgi işlemci bileşenlerinden oluşmaktadır.

Pompa olarak metalik malzeme (paslanmaz çelik) tercih edilirken enjektörler manuel ya da oto enjektörlü olabilmekte, dedektörler ise tayin edilen temel bileşenin fiziksel özelliğine göre seçilmektedir (UV/Vis, DAD, ELSD vb.). İzokratik (tek pompa, tek solvent, solvent karışımı olabilir ancak ayırım yetersizdir), düşük (tek pompa, max 4 farklı mobil faz, karışma pompadan önce) ve yüksek (2 ya da 3 pompa, 2 ya da 3 farklı mobil faz, karışma pompadan sonra) basınçlı gradiyent sistemleriyle çalışılabilmektedir. Kullanılacak ayırma tekniğine (Normal faz, ters faz, ters faz iyon çifti, iyon değişim, vb.) ise yine temel bileşen esas alınarak karar verilmektedir.

Kromatografik analiz sonucunda elde edilen grafikte y-ekseni kullanılan dedektörün ölçtüğü fiziksel özelliği (absorbans), x-ekseni ise zamanı göstermektedir. Zamana karşı y-ekseninde ölçülen fiziksel özelliğin artıp tekrar azalması şeklinde oluşan pik şeklindeki eğrilerin her biri analizlenen maddeye ait bir bileşeni göstermektedir. Bu piklere ait değerler (pik alanı, yüksekliği) kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizler yapmak mümkün olmaktadır. HPLC'nin analizinde kullanıldığı biyoteknolojik ürünlere örnek olarak; aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler ve steroidler verilebilmektedir.

4.3. Kullanılan teknik aletler ve kimyasal maddeler

- Liyofilizatör Christ-ALPHA 1-4 LD
- Evaporatör Heidolph Laborota 4001
- Ultrasonik Banyo Ultrasonic LC30
- Ceketli Isıtıcı BI Barnstead Electrothermal
- Sirkülatör Polyscience temperature controller
- Kompresör Motormax air compressor, 25L, 115Psi
- Rotametre Özmed Oxygen Therapy Apparatus
- HPLC (Yüksek Shimadzu LC-10 AT Performans Sıvı Kromatografisi) ve Thermo Acella U-HPLC
- Cam malzemeler İldam
- Kimyasallar DOP ve Pozitif Kimya firmalarından temin edilmiştir.

4.4. Gerçekleşen bilimsel ve teknik gelişmeler

İlk olarak denemelerde bitki materyali olarak kullanılacak olan *Astragalus trojanus* türü Haziran - 2008 tarihinde (Bergama, Kozak yaylası, Güneşli köy) 1100m yükseklikten toplanmıştır. Bitki köklerinin 40°C'deki sıcaklıklarda vakumlu etüvlerde kurutulup öğütülerek tanecik boyutlarının küçültülmesi sağlanmıştır. Tanecik boyutunun küçülmesiyle temas yüzeyi artmakta ve ekstraksiyon daha verimli gerçekleşmektedir. Bu nedenle mümkün olan en küçük materyal boyutuyla çalışılmıştır.

Temelde üç boyunlu balon, modifiye Soxhlet ekstraktörü, manyetik karıştırıcı, ceketli ısıtıcı ve sirkülatöre bağlı geri soğutuculardan oluşan küçük ölçekli reaksiyon düzeneği şekil 4.5'teki gibi kurulmuştur.

Yapılan çalışmalar esnasında küçük ve orta ölçek düzeneklerinde meydana gelen çözgen kaçaklarını gidermek için bazı önlemler alınmıştır. Bu önlemlerden ilki şekil 4.4'te görülen, geri soğutucuların üzerine yerleştirilen içerisinde çakıl taşlarının bulunduğu çözgen tutucu bir sistem şeklinde olmuştur. Buna ilave olarak geri soğutuculardan geçirilen suyun sirkülatöre bağlanması sağlanarak su sıcaklığının 5°C'de sabit tutulması sağlanmıştır.

Düzenekle ilgili diğer bir teknik gelişme, reaksiyonun gerçekleştiği balona verilen havanın homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak ve oksijen transferini etkin bir biçimde gerçekleştirebilmek için balonun merkezine inen ucu delikli cam hava difüzörünün (Şekil 4.3) tasarlanması olmuştur. Hidroliz balonuna hava sürekli olarak verilirken pnömatik karıştırmaya ek olarak mekanik karıştırma da yapılmıştır. Mekanik karıştırma için küçük ve orta ölçekte manyetik karıştırıcılardan yararlanılmış, pilot ölçekte ise düzenekte var olan motorlu karıştırıcı kullanılmıştır.

Küçük ölçekte deney düzeneği tasarlanırken, bitkilerin serbest bir şekilde hareket edebileceği bir aparat içinde ekstraktör haznesine koyularak hava ile karıştırılması planlanmıştır. Bu amaçla da ekstraktör haznesinde bitkinin tutulmasını sağlayacak çelik bir kartuş hazne geliştirilmeye çalışılmıştır. Fakat bu durum, küçük ölçek düzeneğinde kullanılabilecek bitki miktarını sınırladığı için

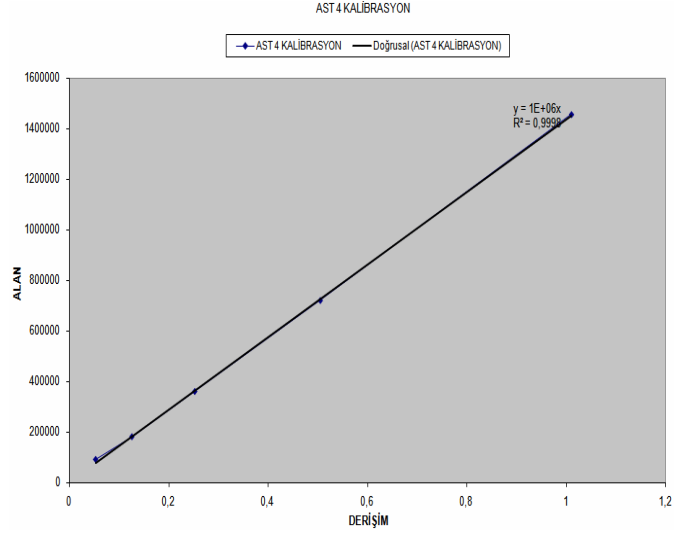
kullanışlı bulunmamıştır. Sonuç olarak, bitki materyalinin ekstraktöre süzgeç kağıdının kartuş haline getirilmesiyle yerleştirilmesine karar verilmiştir. Ancak bu da küçük ve orta ölçekli ekstraktörlerde bitkilerin havayla karışmasını engelleyen bir durum olarak karşımıza çıkmıştır. Fakat sistem içinde devamlı taze çözgen ile ekstraksiyon çok etkin bir şekilde yapılabildiği için bunun bir problem yaratmadığı tespit edilmiştir.

Düzeneğin kurulması için gerekli teknik gereksinim ve ekipmanlar tamamlandıktan sonra reaksiyon örneklerinin HPLC analizlerini gerçekleştirmek için yeni bir örnek hazırlama prosedürü ve HPLC analiz metodu geliştirilmiştir.

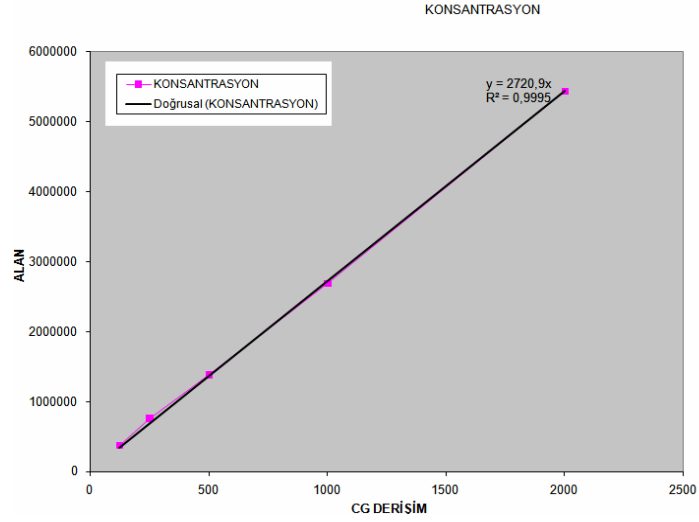
Analiz öncesi örnek hazırlama prosedürü: 1mL reaksiyon örneğinin üzerine 30mL saf su ilave edilmekte ardından %10'luk HCl çözeltisi ile pH'ın 2'ye ayarlanması sağlanmaktadır. Ardından 2 kez 25mL %60 CHCl₃-%40 n-BuOH sistemi ile 1 kez de 25mL %100'lük n-BuOH ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Ekstraksiyon işlemi esnasında birleştirilen organik fazlar uçurulduktan sonra kalan örnek 2mL HPLC MeOH'de çözülerek enjeksiyona hazır hale getirilmektedir. Bu yöntem gereksinim duyulmasının nedeni RP yöntemi ile hazırlanan örneklerde çoğunlukla çökelek gözlenmesi ve bu durumun HPLC örnek enjeksiyonuna engel teşkil etmekte oluşudur.

HPLC analiz metodu: HPLC analizleri için kromatogramlardaki hedef moleküllere ait sinyalleri net bir şekilde gözlemleyebilmek için yeni bir HPLC metodu geliştirilmiştir. Metotta; su (A), asetonitril (B) ve metanol (C) çözgenleri kullanılmıştır. Hareketli faz, su ve asetonitril bileşenlerinden oluşmaktadır. Gradyent elüsyonu 70A/30B'den 20A/80B'ye olacak şekilde 30dk uygulanmıştır. Bu analizi, 10 dk metanolle yıkama ve 5dk baştaki koşula şartlama işlemi takip etmektedir.

Analizlere başlamadan önce izole edilen astragalozit IV ve sikloastragenol moleküllerine ait kalibrasyon grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.11 AST IV Kalibrasyon Grafiği



Şekil 4.12 CG Kalibrasyon Grafiği

Uygulamada karşımıza çıkabilecek eksikliklerin giderilmesinin ardından sistemin doğru çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir. Reaksiyon ilerleyişinin teoride olduğu gibi gerçekleşmesinin üzerine sistemi etkileyebilecek parametreler aşağıda görüldüğü gibi belirlenmiştir.

- Gaz akış hızı
- Alkali miktarı
- Çözgen-bitki oranı
- Reaksiyon süresi

Bu parametrelerin etkilerini anlayabilmek için Dizayn Expert istatistiksel programı kullanılmıştır. Bu program beklenen yanıtta etki eden çok fazla değişkenin olması durumunda; problemlerin analiz edilmesinde ve modellenmesinde kullanılan istatistiksel tekniklerin ve matematiksel ifadelerin birleşimidir. Yeni ürünün formülasyonunda, var olan ürün tasarımının iyileştirilmesinde, süreç optimizasyonunda, sürecin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Montgomery, 2002). Sisteme olan etkisi araştırılmak istenen numerik ya da kategorik parametrelerin sayısına göre farklı deney planları oluşturulmakta ve elde edilen sonuçlar programın önerdiği modele göre değerlendirilmektedir.

Set 1, set 2, set 3 ve set 5 deneme planları oluşturulurken iki seviyeli faktöriyel deneysel tasarım matrisinden yararlanılmış ve 2k faktöryel dizayn uygulanmıştır. Hedef molekülün maksimum seviyede eldesine yönelik kriterler istatistiksel yaklaşımla analiz edilmiştir. Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları incelenerek hangi faktörlerin daha önemli rol oynadığı ve modelin doğruluğu tespit edilmiştir. Deneme set 4'te ise tepki yüzey metodolojisinden (RSM) yararlanılmıştır. Bu metodoloji ile üç seviyeli deneysel tasarım matrisinden yararlanılmış ve elde edilen veriler quadratik dizayn modeliyle değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada küçük ölçekte yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilip orta ölçeğe (Şekil 4.8) ardından pilot ölçeğe aktararak yeni deneme planları oluşturulmuştur.

Uygulamaların küçük ölçekte yürütülmesi esnasında pilot ölçekte kullanılması planlanan ekstraktör + reaktör sistemi belirlenmiş ve siparişi verilmiştir. Bu sistemin fotoğrafı ve detaylı gösterimi şekil 4.10 ve 4.9'da verilmiştir.

4.5 Bitkisel materyal olarak kullanılan *Astragalus trojanus*

Leguminosae familyasının üyesi olan *Astragalus* cinsi dünya üzerinde yaklaşık 2000 tür ile vasküler bitkiler arasında en büyük cinsi oluşturmaktadır. Bu cinsin Kuzey Amerika’da 372, Avrupa’da 133 türü tanımlanmıştır. Ülkemiz bitki örtüsünde ise yaklaşık 380 tür ile temsil edilmektedir ve Anadolu’nun hemen her bölgesine dağılmıştır (Davis *et al* 1970).

Endemik bir tür olan *Astragalus trojanus* yere yayılan çalimsı, gövdeleri 5-30 cm, stipula tabanlarıyla tamamen örtülmemiş, viloz, yaprak rakisi dikenli, 2-6 cm, düz veya kıvrık şekilde görülmektedir. Çiçekler sapsız ve yaprak koltuğunda 4-5’li kümeler halinde bulunmaktadır. Çiçeklenme zamanı 5-7 ay arasında olup, step ve makilerde deniz seviyesinden 1040 m’ye kadar olan yüksekliklerde yetişmektedir. Batı Anadolu-Adalar, Çanakkale’nin 18 km güneyi, İzmir-Yamanlar Dağı, Karagöl, Balıkesir-Edremit’in 76 km batısı, Burhaniye-Hacıbozlar Köyü, İzmir/Manisa Bornova-Manisa arası, Afyon- Afyonkarahisar havaalanı bölgelerinde yayılış göstermektedir. (Bedir E., Doktora tez, 1995)



Şekil 4.13 *Astragalus trojanus*

Astragalus türleri köklerinin Güney Doğu Anadolu’da yara iyileştirici ve kan kanseri (lösemi) tedavisinde kullanılmasından hareketle gerçekleştirilen çalışmalarda Türkiye *Astragalus*’larından 60’a yakın doğal bileşiğin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Çalış *et al.* 1996, Çalış *et al.* 1999). Çoğunluğunu sikloartan tipi saponin glikozitlerinin oluşturduğu bu bileşiklerden yaklaşık 30’unun doğa ve

bilim için yeni olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen bileşiklerin ilk aşamada antikanser veya immun sistem üzerinde etkilerinin olup olmadığı incelenmiştir. Sonuç olarak antikanser aktivite gözlenmez iken, immun sistem üzerinde modölatör aktivitelerinin olduğu saptanmıştır (Çalış *et al* 1997, Bedir *et al* 2000).

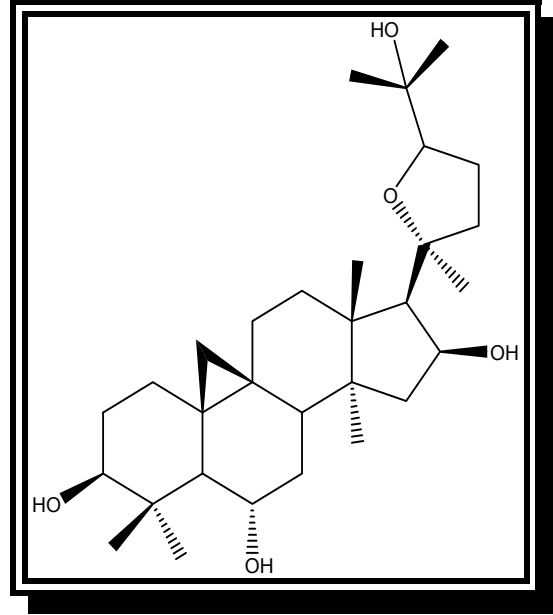
Aynı zamanda grubumuz tarafından yapılan diğer bir çalışmada *Astragalus* türlerinin yara iyi edici olarak kullanımının bir dayanağı olup olmadığı majör saponinler kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak, astragalozit IV, siklokantozit E ve astragalozit IV'ün aglikonu olan sikloastragenol isimli bileşiklerin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak çok düşük dozlarda aktivite gösterdiği saptanmıştır (yayına hazırlanıyor-Ege Univ. BAP projesi).

Hector ve ark. tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışma sonucunda ise CG'nin telomeraz aktivitesini arttırarak T-hücrelerinin çoğalmasını sağladığı tespit edilmiştir. Telomeraz, telomerik DNA'nın bir zincirinden sentezlenen, ribonükleoprotein yapısında bir reverstranskriptaz'dır ve büyük bir enzim kompleksidir (Atlı K., 2002). Kromozomların uçlarında yer alan telomerik yapılar, tekrarlayan TTAGGG ünitelerinden oluşmaktadır. Her hücresel bölünmede, telomerik uçlardan bir miktar DNA kaybedilmekte ve bu kısılmanın da hücresel yaşlanmaya yol açtığı ileri sürülmektedir. Ribonükleoprotein yapıda bir enzim olan telomeraz, kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak sentezlediği heksomerik parçaları (TTAGGG)n kromozomal uçlara ekleyerek kromozomal uçlardaki kaybı dengelemektedir (Dikmen G,2003). Böylelikle hücresel yaşlanmanın önüne geçilebilecektir.

Bunun yanısıra piyasada bulunan kitosan ve benzeri maddelerle bir araya getirilerek formüle edilmiş bazı sikloastragenol tabletlerinin bağışıklığı ve (kardivasküler) dolaşım sistemini desteklediği, DNA onarımı sağladığı, hücre bölünmesini ve kromozom sağlamlığını desteklediği belirtilmektedir.

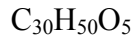
5. DENEYSEL UYGULAMALAR VE SONUÇLARI

Yüksek verimle üretilmesi hedeflenen sikloastragenol molekülü (Şekil 5.1), *Astragalus* türlerinde yaygın olarak bulunan 20,24-epoksisikloartan glikoziti olan astragalozit IV bileşiğinin bazik koşullarda n-BuOH içerisinde ortama oksijen verilerek kimyasal hidrolizi ile çalışmalarımızda elde edilmektedir.



CA-S1

(20 *R*,24 *S*)-epoksisikloartan-3β,6α,16β,25-tetraol (Sikloastragenol)

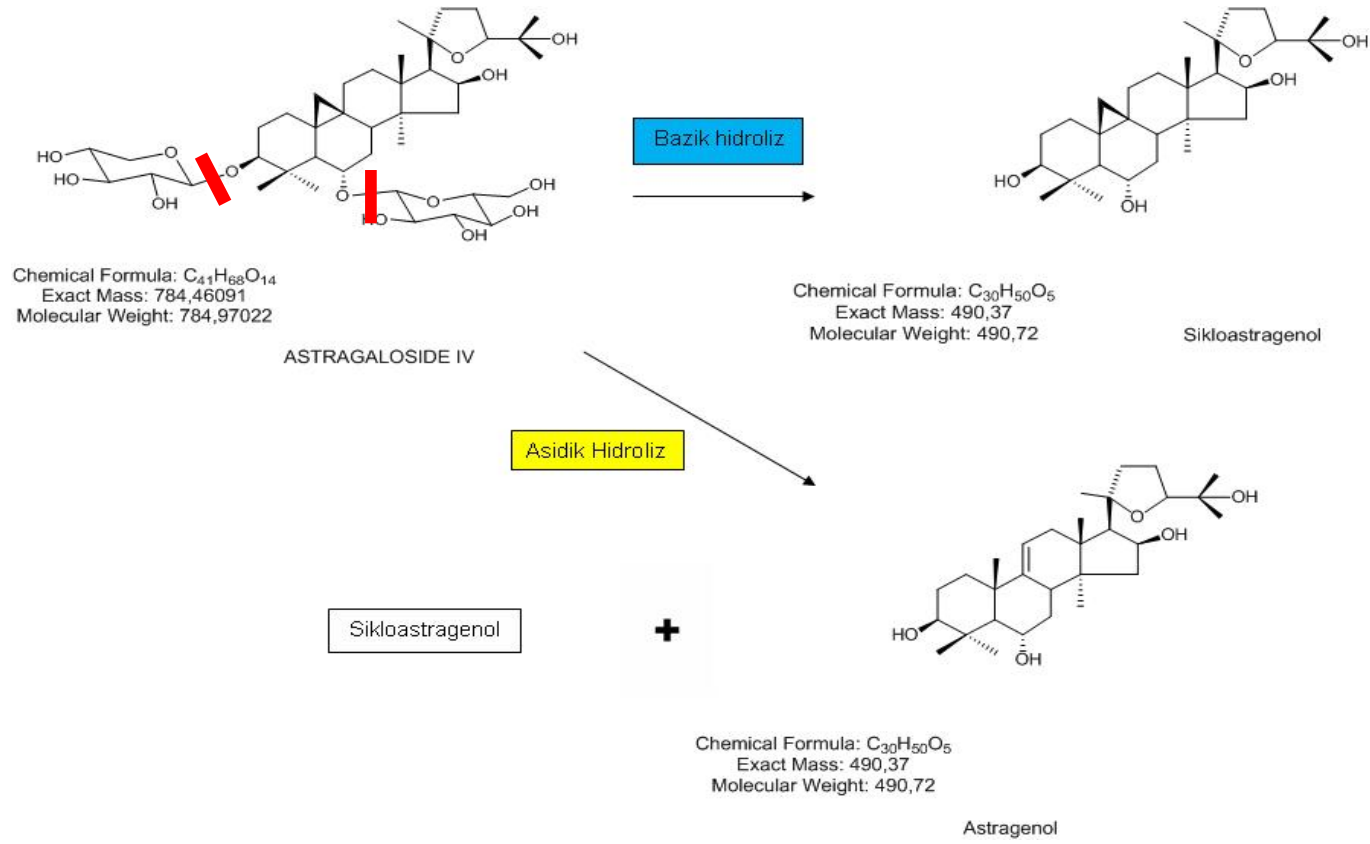


M. A. : 490,715 g/mol

C, %73.43; H, %10.27; O, %16.30

Şekil 5.1 Sikloastrogenol molekülünün yapısı ve görüntüsü

Asidik koşullarda ve yüksek sıcaklıklarda bu reaksiyonun gerçekleştirildiği durumda, sikloartan grubu bir triterpen olan sikloastragenol molekülünde bulunan gergin 9,19-siklopropan halkası açılarak şekil 5.2’de gösterilen astragenol isimli yan ürün oluşmakta ve verimlilik oldukça azalmaktadır.



Şekil 5.2 Astragalosit IV bileşiğinin hidrolizleri sonucunda oluşan ürünler

5.1 Deneme set 1

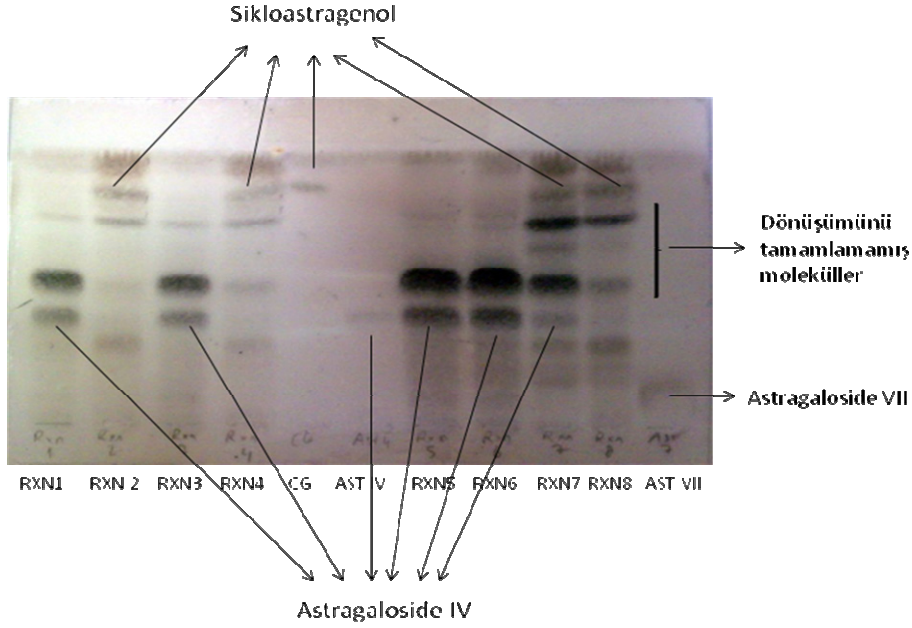
Amaç: Sistemi etkileyen parametreler için sınır değerleri belirlemek

Çizelge 5.1 Deneme Set 1

ANALİZ	HPLC KODU	SON ÇÖZGEN HACMİ	HAVA AKIŞ HIZI	ALKALİ MİKTARI	REAKSİYON SÜRESİ	BİTKİ MİKTARI	ESTD KONS CG	ESTD KONS AST IV	CG	AST IV	CG YÜZDESİ
		mL	L/dk	G	Saat	G	µg/ Ml	µg/ mL	Mg/g	mg/g	(g/g)x100
1	HR1_140409	656	1	1	4	10	4.055796756	102.002	0.532120534	13.382662	0.05321205
2	HR2_110409	675	1	10	8	10	122,887	2.602	15.92198069	0.35127	1.59219806
3	HR3_130409	565	2	1	8	10	5.239978488	123.896	0.592117569	14.000248	0.05921175
4	HR4_130409	570	2	10	4	10	99.57568163	5.99	11.35162771	0.68286	1.13516277
5	HR5_130409	680	2	1	4	25	0.323176512	264.671	0.017580802	14.398102	0.00175808
6	HR6_140409	670	1	1	8	25	2.288938728	313.565	0.122687116	16.807084	0.01226871
7	HR7_150409	640	1	10	4	25	106.423	48.055	5.4488576	2.460416	0.54488576
8	HR8_090409	590	2	10	8	25	309.595	1.98	14.6112464	0.093456	1.46112464
1	DR1_SÜREKLİ_8 saatten sonra	560	1	14	7	10	151.993	0.597	17.023216	0.066864	1.7023216
2	DR2_SİFONLA	665	1	14	7	10	110.782	39.148	14.734006	5.206684	1.4734006

5.1.1 Deneme set 1 sonuç

Yapılan 8 deneme neticesinde alkali miktarının 1g olduğu 1, 3, 5 ve 6 nolu denemelerde sikloastragenol (CG) molekülünün oluşmadığı gözlenmektedir. 1g alkali miktarı 750mL n-BuOH'un pH'ını 13'e ayarlamaya yetmesine rağmen reaksiyonun gerçekleşmesi için yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.3 Gerçekleştirilen set 1 denemelerinin İTK görüntüsü (70:30:3)

Maksimum alkali miktarı olarak belirlenen 10 g NaOH'in kullanıldığı 2, 3, 7 ve 8 no'lu reaksiyonlarda CG oluşumu gözlenmiştir. Bundan sonraki denemelerde, 10g NaOH üzerinde değişiklikler yapılarak çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Her bir deneme sonucunda alınan 1 mL'lik numunelerden HPLC analiz örnekleri hazırlanmıştır. Çizelge 5.1'de görülen konsantrasyon değerleri ise her bir örnek için son çözgen hacmi dikkate alınarak hesaplanmıştır. HPLC analizlerinden elde edilen sayısal veriler, faktoriyel dizayn deney tasarım modeli aşağıdaki gibi özetlenmektedir.

Çizelge 5.2 Değişkenlerin analizi çizelgesi

Kaynak	Karelerinin toplamı	df	Karelerinin ortalaması	F değeri	p-değeri Olasılık > F
Model	330.97	7	47.28		
A-ALKALI	265.30	1	265.30		
B-RXN SÜRESİ	24.14	1	24.14		
C-HAVA HIZI	2.58	1	2.58		
D-BITKI MIKTARI	8.4	1	8.40		
AB	23.01	1	23.01		
AC	2.69	1	2.69		
AD	4.85	1	4.85		
Pure Error	0.000	0			
Cor Total	330.97	7			
Std. Dev.				R-kare	10.000
Ortalama	6.07			Tahminlenen değerlere yakınlığı ifade eden R-KARE değeri	
C.V. %				Tahminlenen R-kare değeri	N/A
PRESS	N/A			Doğruluk yeterliliği	0.000

Çizelge 5.2’den görüldüğü gibi hava akış hızının modele katkısı çok düşük bulunmuştur. Bu nedenle hava hızını (C) içeren katsayılar modelden çıkartılarak tekrar hesaplama yapıldığında modelin çizelge 5.3’de de görüldüğü gibi R^2 değerleri 0.9841 ve 0.9442 olarak saptanmıştır.

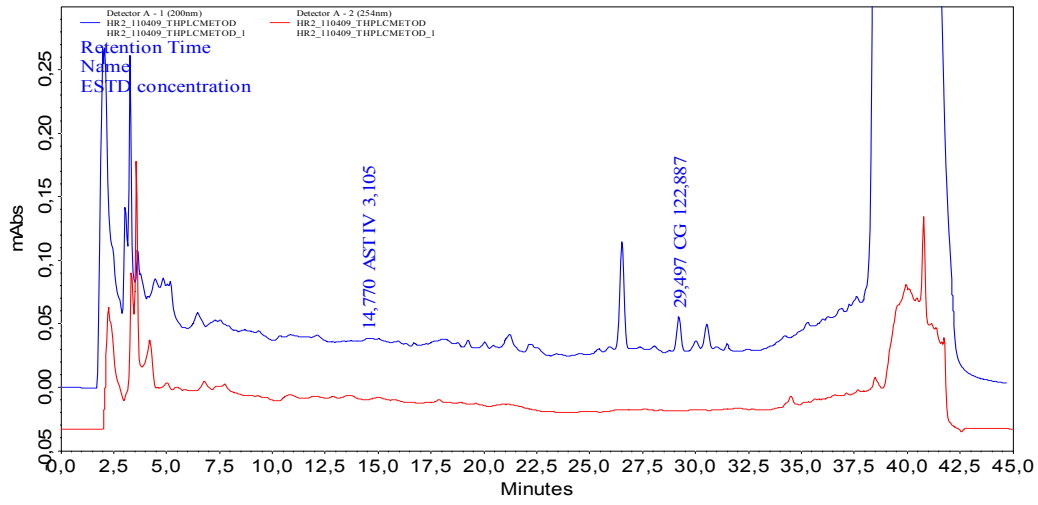
Çizelge 5.3 Değişkenlerin analizi çizelgesi

Kaynak	Karelerinin toplamı	Df	Karelerinin ortalaması	F değeri	p-değeri Olasılık > F
Model	325.70	5	65.14	24.71	0.0393
A-ALKALI MİKTARI	265.30	1	265.30	100.64	0.0098
B-RXN SÜRESİ	24.14	1	24.14	9.16	0.0940
D-BITKI MIKTARI	8.40	1	8.4	3.19	0.2162
AB	23.01	1	23.01	8.73	0.0980
AD	4.85	1	4.85	1.84	0.3078
Residual	5.27	2	2.64		
Cor Total	330.97	7			
Std. Dev.	1.62			R-kare	0.9841
Ortalama	6.07			Tahminlenen değerlere yakınlığı ifade eden R-KARE değeri	0.9442
C.V. %	26.73			Tahminlenen R-kare değeri	0.7451
PRESS	84.36			Doğruluk yeterliliği	12.120

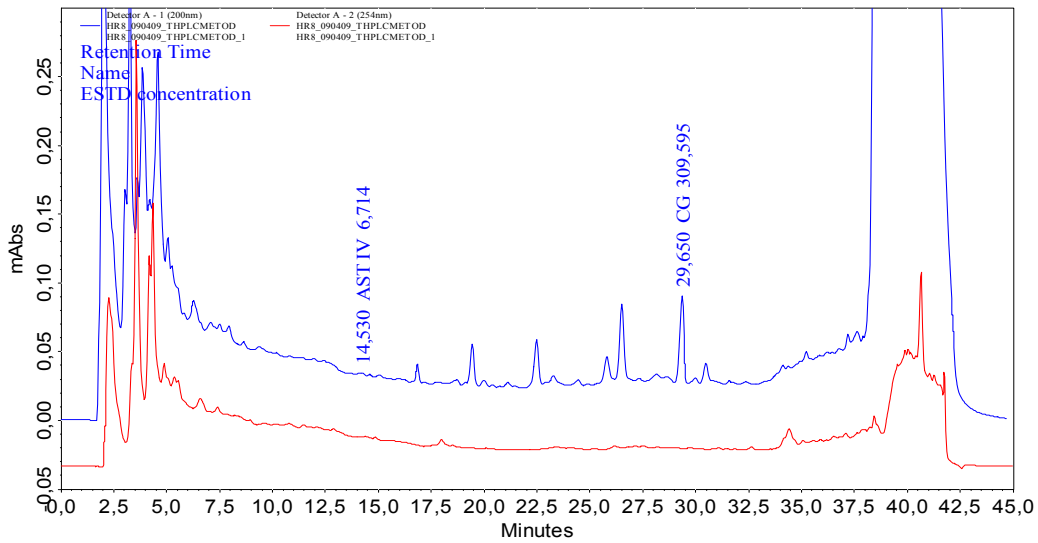
Deneme Set 1'e ait bazı denemelerin HPLC kromatogramlarına bakıldığında;

Şekil 5.4 ve şekil 5.5'te henüz dönüşümünü tamamlamamış maddelerin varlığı gözlenmekte ve 8 saatlik zaman diliminin reaksiyonun tamamlanması için yetersiz olduğu anlaşılmaktadır.

En verimli olduğu belirlenen HR2_110409, HR8_090409 reaksiyonlarının verimleri birbirlerine eşit olmasına rağmen HR8_090409 reaksiyonunda birim zamanda elde edilen CG miktarı daha fazla olduğu için bundan sonraki çalışmalara 25 g bitki miktarı üzerinden devam edilmesine karar verilmiştir.



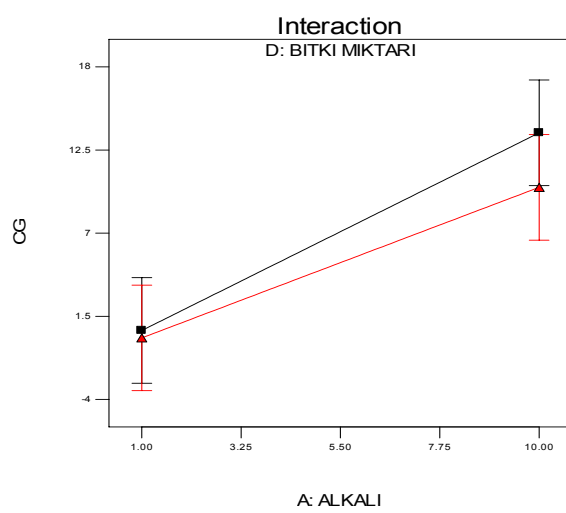
Şekil 5.4 HR2_110409 analizine ait HPLC kromatogramı



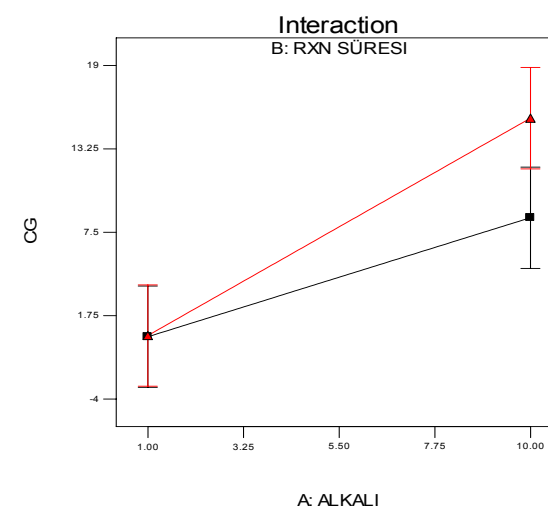
Şekil 5.5 HR8_090409 analizine ait HPLC kromatogramı

Seçilen faktörlere ait olarak belirlenen eşitlik;

$$CG = +0.21345 + 0.55283 \cdot \text{ALKALI} - 0.16780 \cdot \text{RXN SÜRESİ} - 9.72666 \cdot 10^{-3} \cdot \text{BITKİ MIKTARI} + 0.18844 \cdot \text{ALKALI} \cdot \text{RXN SÜRESİ} - 0.023072 \cdot \text{ALKALI} \cdot \text{BITKİ MIKTARI}$$



Şekil 5.6 Alkali ve bitki miktarına bağlı CG değişimi



Şekil 5.7 Alkali miktarı ve reaksiyon süresine bağlı CG değişimi

Hava akış hızının sistemi çok fazla etkilemediği sonucuna varılmasını takiben 1L/dk hava akış hızı ve 25 g bitki miktarı sabit kabul edilerek yeni bir deneme planı oluşturulmuştur. Daha önce yapılan reaksiyonlarda 8 saatlik zaman dilimi maddelerin dönüşümü için yetersiz bulunduğundan minimum 9 ve maksimum 15 saat süren reaksiyonlar sonucu verimlerin kıyaslanmasına karar verilmiştir. Bunun yanı sıra yeni deney seti ile sürekli damlatmalı ve sürekli sifon yapan iki sistemin verimliliğin kıyaslanması bu parametrenin modele kategorik olarak ilave edilmesiyle sağlanmıştır. Bu faktörlere bağımlı olarak belirlenen yeni deneme set 2 planı aşağıdaki gibidir.

5.2 Deneme set 2

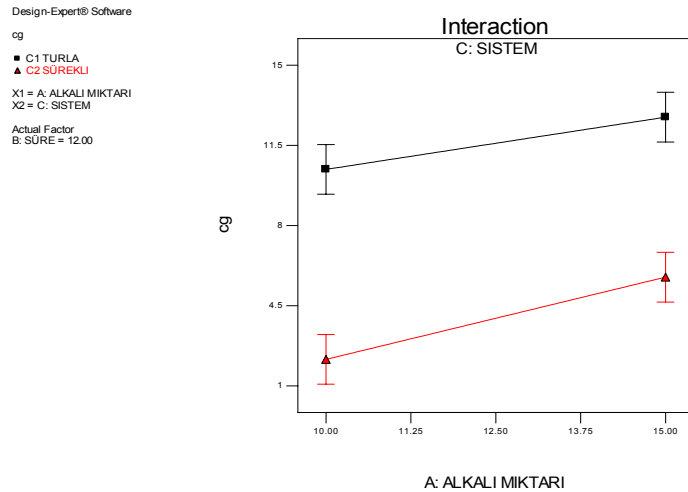
Amaç: Küçük ölçekte alkali miktarının 10-15g'lık bir aralıkta değiştirildiği, sürenin 9-15 saat tutulduğu ve sistemin sürekli ya da sifon yaptırıldığı koşullarda verimliliğin kıyaslanması (Bitki miktarı 25g sabit, hava akış hızı 1L/dk ve solvent miktarı 750mL sabit tutulmuştur.)

Çizelge 5.4 Deneme Set 2

					Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3			Yanıt 1	Yanıt 2	
HAVA AKIŞ HIZI	BİTKİ MİKTARI	Analiz	HPLC ANALİZ KODU	SON ÇÖZGEN HACMİ	A:ALKALI MİKTARI	B:SÜRE	C:SİSTEM	ESTD CONS CG	ESTD CONS AST IV	CG	AST IV	CG YÜZDESİ
L/dk	g	-	-	mL	g	Saat	-	µg/mL	µg/mL	mg/g	mg/g	(g/g)x100
1	25	1	HR1_110609	610	10	15	SÜREKLİ	38.4	63.045	1.87392	3.076596	0.187392
1	25	2	HR2_100609	650	15	15	SÜREKLİ	77.233	27.671	4.016116	1.438892	0.4016116
1	25	3	HR3_110609	545	10	15	SİFON YAPTIRILAN	240.311	11.674	10.4775596	0.5089864	1.04775596
1	25	4	HR4_080609	675	15	9	SÜREKLİ	138.534	115.521	7.480836	6.238134	0.7480836
1	25	5	HR5_080609	670	15	9	SİFON YAPTIRILAN	268.615	98.282	14.397764	5.2679152	1.4397764
1	25	6	HR6_090609	560	10	9	SİFON YAPTIRILAN	232.783	75.49	10.4286784	3.381952	1.04286784
1	25	7	HR7_090609	680	10	9	SÜREKLİ	44.878	135.258	2.4413632	7.3580352	0.24413632
1	25	8	HR8_100609	630	15	15	SİFON YAPTIRILAN	219.564	17.773	11.0660256	0.8957592	1.10660256

5.2.1 Deneme set 2 sonuç

2^{4-1} kısmi faktöriyel dizayn ile tasarlanan denemeler neticesinde çizelge 5.4'teki benzer reaksiyonlara bakılarak (ör: Analiz 1 - Analiz 3, Analiz 4 - Analiz 5) sifon yapan denemelerdeki reaksiyonların verimliliği açıkça görülmektedir. Bu sayısal veriler faktöriyel dizayn deney tasarım modeli ile değerlendirildiğinde de reaksiyonu etkileyen parametreler arasında çizelge 5.4'te görüldüğü gibi sistemin sürekli yada sifonla gerçekleşmekte oluşu diğer parametrelerle kıyaslandığında en etkili faktör olarak saptanmaktadır. Orta ölçek çalışmalarına geçildiğinde sistemin ekstraksiyon işlemi tamamlana kadar sifon yapması ardından sürekli sisteme çevrilmesi planlanmıştır.

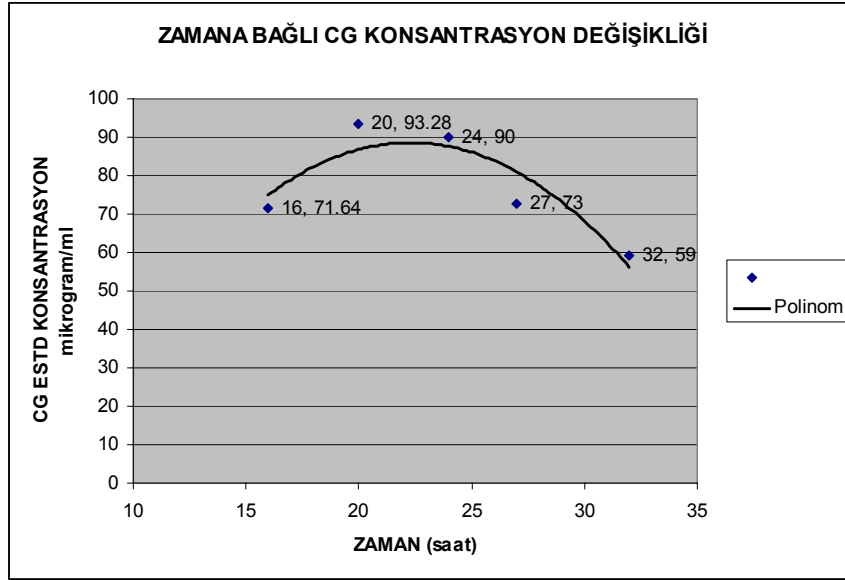


Şekil 5.8 Alkali miktarı ve sistem parametrelerinin CG verimi üzerine etkisi

Analiz 5 ve analiz 6 kıyaslandığında her iki denemede 9 saat sürmekte, turla gerçekleşmekte ancak alkali miktarı 15g olan analiz 5'te CG veriminin daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

Bunun yanı sıra bu denemelerde dikkatimizi çeken bir diğer nokta analiz 5 ve analiz 8 arasında görüldüğü gibi 9 saatlik reaksiyon süresinin 15 saate kıyasla daha verimli çıkmasıdır. Zamana bağlı olarak CG oluşumunun olumsuz yönde etkilenip etkilenmediğini anlamak için ekstra bir deneme yapılarak 9. saatten sonraki 16, 20, 24, 27 ve 30. saatlerde alınan örnekler HPLC ile analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara şekil 5.9 üzerinde bakıldığında 24. saatten sonra verimde azalma gözlenmektedir.



Şekil 5.9 Küçük ölçekte zamana bağlı CG konsantrasyonunun değişim grafiği

Çizelge 5.5 Değişkenlerin analizi çizelgesi

Kaynak	Karelerinin toplamı	Df	Karelerinin ortalaması	F değeri	p-değeri Olasılık > F
Model	146.49	6	24.42	836.08	0.0265
A-ALKALI MIKTARI	17.23	1	17.23	589.89	0.0262
B-SÜRE	6.69	1	6.69	229.04	0.0420
C-SİSTEM	116.72	1	116.72	3996.99	0.0101
AB	4.93	1	4.93	168.70	0.0489
AC	0.86	1	0.86	29.48	0.1160
BC	0.070	1	0.070	2.4	0.3647
Residual	0.029	1	0.029		
Cor Total	146.52	7			
Std. Dev.	0.17			R-kare	0.9998
Ortalama	7.77			Tahminlenen değerlere yakınlığı ifade eden R-KARE değeri	0.9986
C.V. %	2.2			Tahminlenen R-kare değeri	0.9872
PRESS	1.87			Doğruluk yeterliliği	77.591

Çizelge 5.5'deki değişkenlerin analizinde elde edilen sonuçların tahminlenen sonuçlara yakınlığı 0.9872 olarak gözlenirken tahminlenen değerlere yakınlığı 0.9986 olarak saptanmıştır. Yöntemin doğruluğu ise 0.9998 olarak bulunmuştur. Deneme set 2 sonucunda elde edilen denklemler aşağıdaki gibidir.

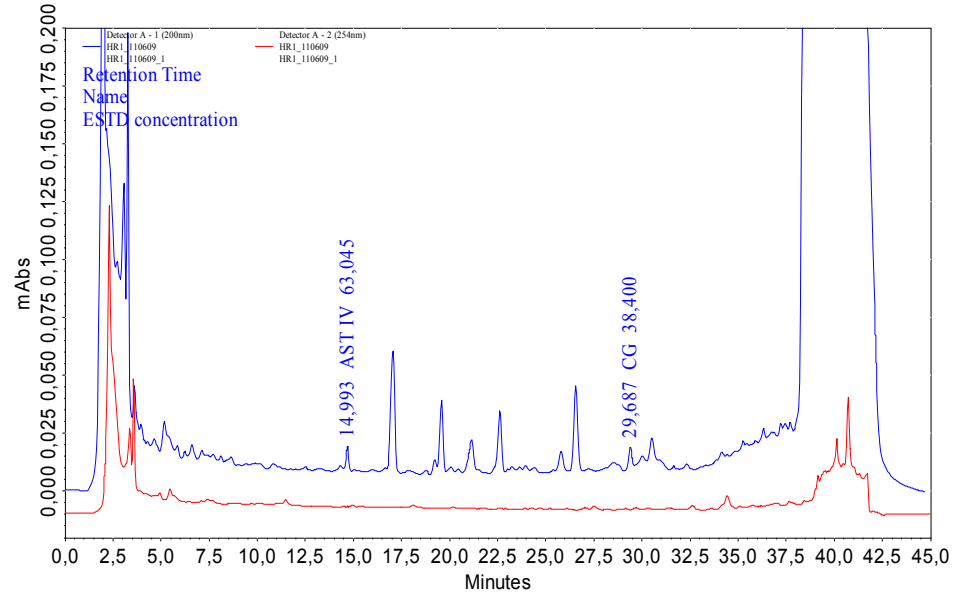
Sistem sifon yaptığında:

$$CG = -6.51632 + 1.71133 * \text{ALKALI MIKTARI} + 1.03432 * \text{SÜRE} - 0.10463 * \text{ALKALI MIKTARI} * \text{SÜRE}$$

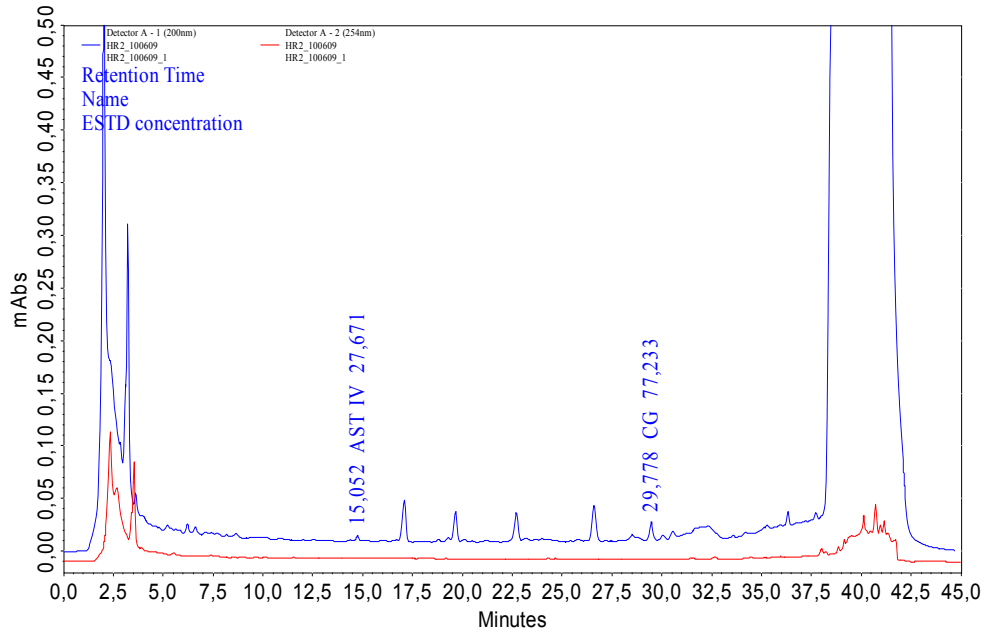
Sistem sürekli olduğunda:

$$CG = -16.68660 + 1.97375 * \text{ALKALI MIKTARI} + 0.97188 * \text{SÜRE} - 0.10463 * \text{ALKALI MIKTARI} * \text{SÜRE}$$

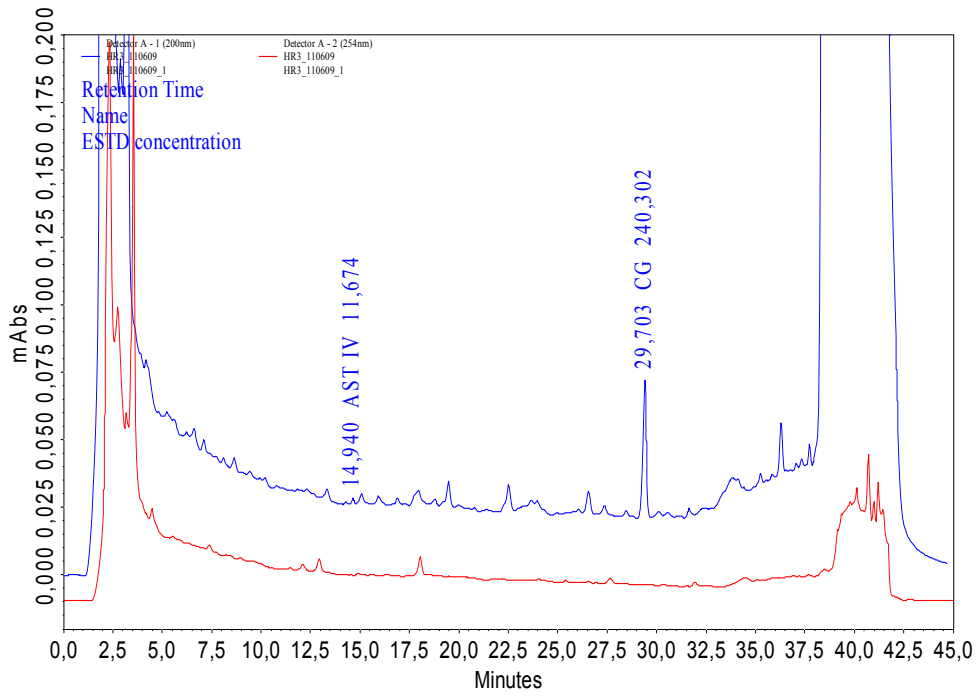
5.2.2 Deneme set 2'ye ait HPLC kromatogramları



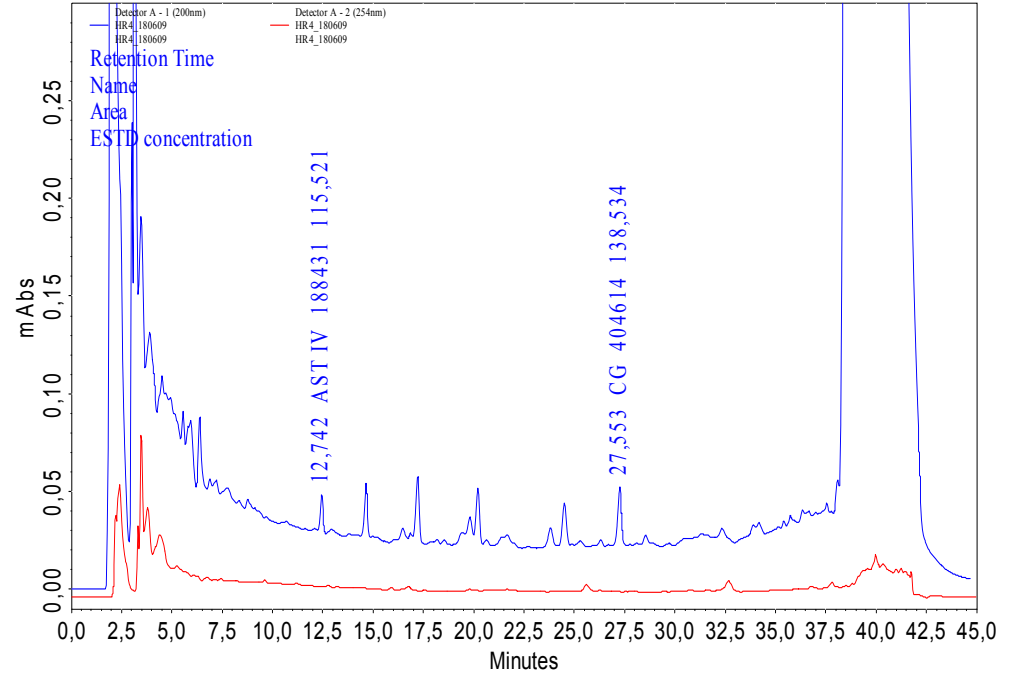
Şekil 5.10 Analiz 1'e ait HPLC Kromatogramı



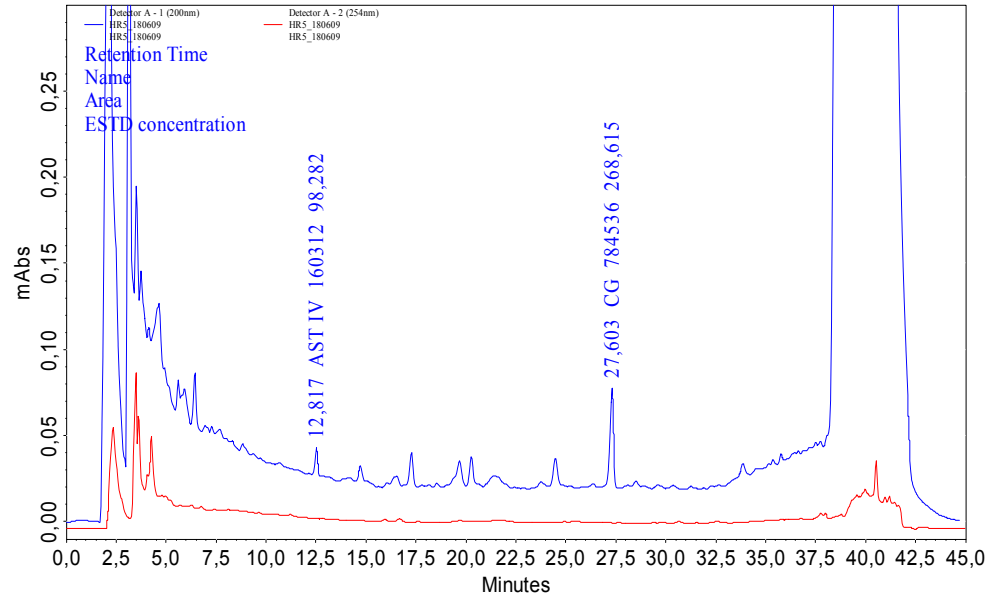
Şekil 5.11 Analiz 2'ye ait HPLC Kromatogramı



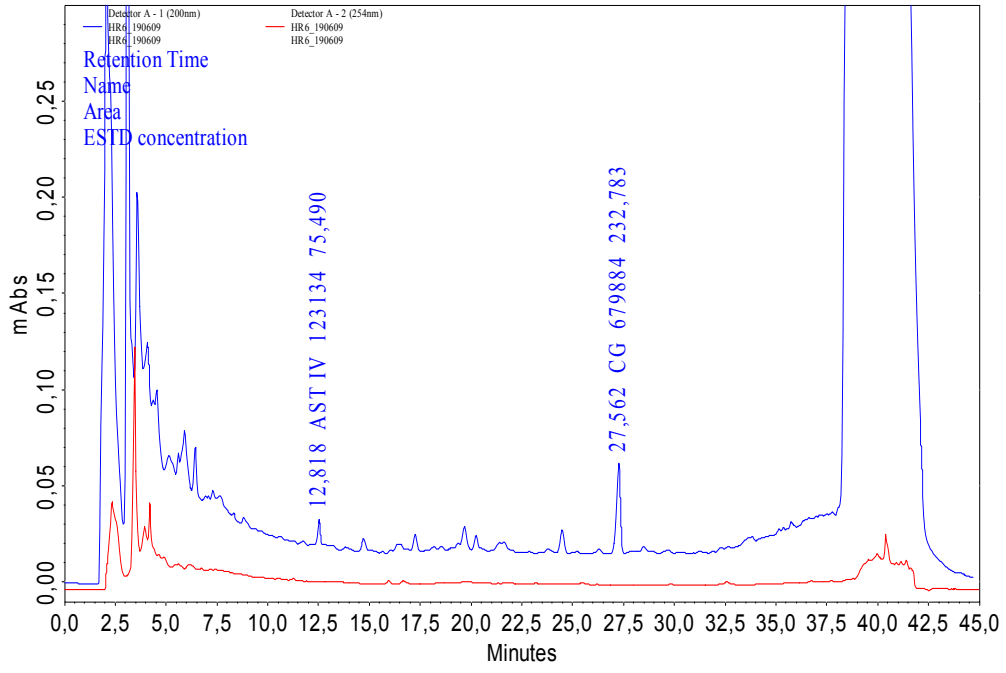
Şekil 5.12 Analiz 3'e ait HPLC Kromatogramı



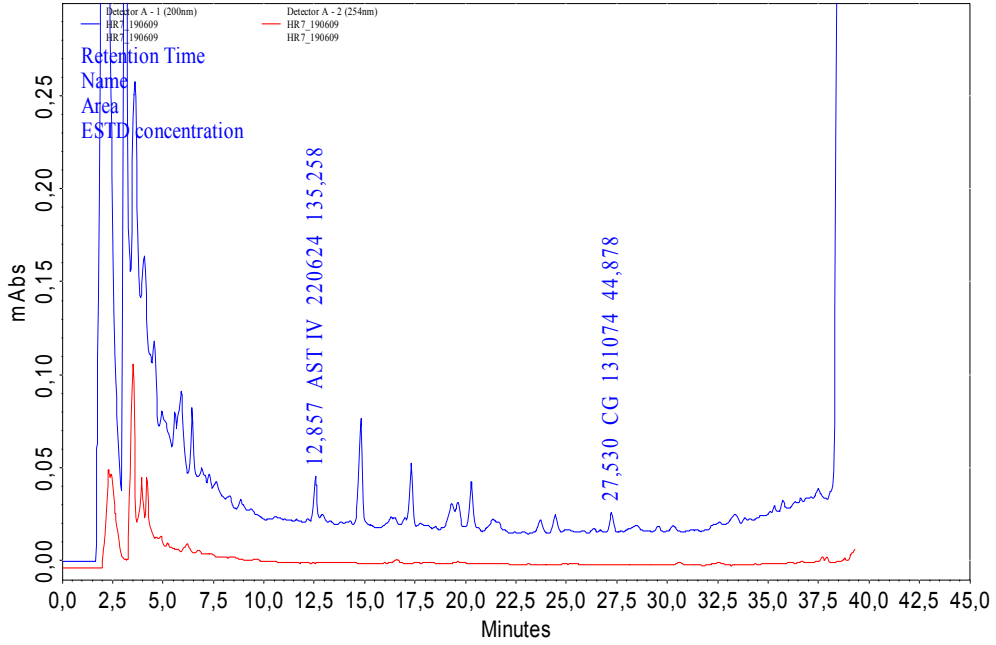
Şekil 5.13 Analiz 4'e ait HPLC Kromatogramı



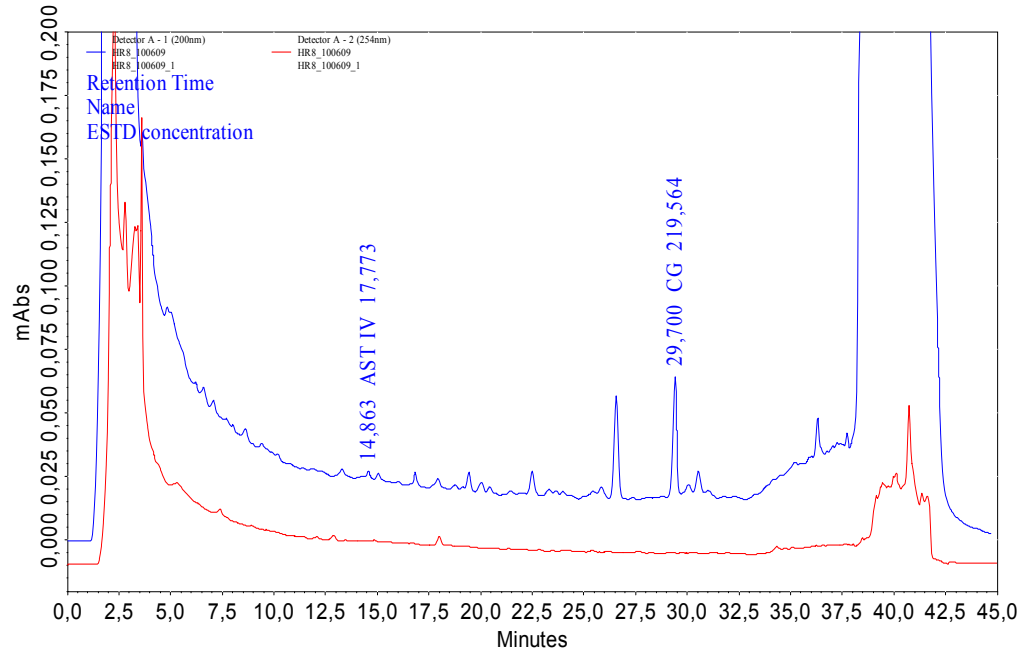
Şekil 5.14 Analiz 5'e ait HPLC Kromatogramı



Şekil 5.15 Analiz 6'ya ait HPLC Kromatogramı



Şekil 5.16 Analiz 7'e ait HPLC Kromatogramı



Şekil 5.17 Analiz 8'e ait HPLC Kromatogramı

Küçük ölçekte elde edilen sonuçlar doğrultusunda en uygun bitki/solvent oranının 0.033 (25g/750mL), alkali miktarının 15g (0.5M), reaksiyon süresinin 9 saat olan ve sifon yaptırılarak yürütülen deneme set 2'deki HR5_080609 nolu reaksiyon baz alınarak orta ölçek denemelerine geçilmiştir.

Bu koşulların, 1000 mL'lik balon ve 500 mL'lik ekstraktör'den 6000 mL'lik balon ve 2000 mL'lik ölçeğe aktarılması esnasında bitki/solvent oranı sabit tutularak aynen kullanılmıştır. 4500mL kullanılması planlanan solvent hacmine 150g bitki ilave edildiğinde bu oran sağlanmaktadır. Ancak orta ölçek için tasarlanmış olan ekstraktör hacmi daha fazla bitkiyi ekstrakte edebilmek için elverişli olduğundan bitki miktarı 150-200g olarak denenmiştir. Alkali miktarı olarak ise küçük ölçekte 0.5M olarak saptanan oran büyük ölçekte 90g olarak denenmiş ve deneme set 3 datalarında da (çizelge 5.6) görüleceği gibi dönüşüm tam olarak gerçekleşmemiş ve verim düşük bulunmuştur. Bu ön deneme alkali ilave edilerek devam ettirildikten sonra dönüşümün gerçekleştiği saptanmıştır. Bu nedenle alkali miktarının orta ölçekte 135g ve 180g olarak denenmesine karar verilmiştir.

5.3. Deneme set 3

Amaç: Küçük ölçekte elde edilen verilerin orta ölçeğe aktarılarak reaksiyonu etkileyen parametrelerin optimizasyonu

Çizelge 5.6 Deneme Set 3 analiz verileri

			Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Yanıt 1	Yanıt 2			
Son Solvent Hacmi	Analiz	HPLC ANALİZ KODU	A:ALKALI MIKTARI	B:BITKI MIKTARI	C:REAKSIYON SURESI	AST IV KONS	CG KONS	AST IV KONS	CG KONS	CG YÜZDESİ
mL			G	G	saat	mg/mL	mg/mL	mg/g	mg/g	(g/g)x100
4350	1	HR1_220709_TM	135	200	12	15.185	51.288	0.660548	2.231028	0.223103
4200	2	HR2_220709_TM	135	200	20	2.56	178.053	0.10752	7.478226	0.747823
3850	3	HR3_150709_TM	180	150	12	16.86	55.021	0.86548	2.824411	0.282441
4300	4	HR4_200709_TM	180	200	20	25.702	117.013	1.105186	5.031559	0.503156
4380	5	HR5_170709_TM	135	150	20	19.993	41.536	1.167591	2.425702	0.24257
4100	6	HR6_160709_TM	180	150	20	15.263	78.651	0.834377	4.299588	0.429959
4100	7	HR7_230709_TM	180	200	12	32.442	77.317	1.330122	3.169997	0.317
3600	8	HR8_140709_TM	135	150	12	13.511	94.531	0.648528	4.537488	0.453749
4340		HREXTRA_TM	90	200	20	9.923	97.531	0.430658	4.232845	0.423285

5.3.1. Deneme set 3 sonuç:

Deneme set 3'te elde edilen analiz sonuçlarına bakıldığında CG yüzdesinin genel olarak düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun reaksiyon süresinin yetersiz gelmesi nedeniyle gözlemlendiği kararlaştırılmıştır. Bu nedenle bundan sonraki deney setinde reaksiyon süresinin daha uzun tutulmasına karar verilmiştir. Ancak yapılan denemeler arasında da en yüksek verimi veren HR2_220709_TM kodlu reaksiyonda 135g alkali miktarı (0.75M'a denk gelmekte) ve 200g bitkisel materyal kullanımından deneme set 4 planları oluşturulurken yararlanılmıştır.

Elde edilen analiz değerleri faktoriyel dizayn deney tasarım yöntemi ile değerlendirildiğinde aşağıdaki istatistiksel sonuçlar elde edilmektedir.

Çizelge 5.7 Değişkenlerin analizi çizelgesi

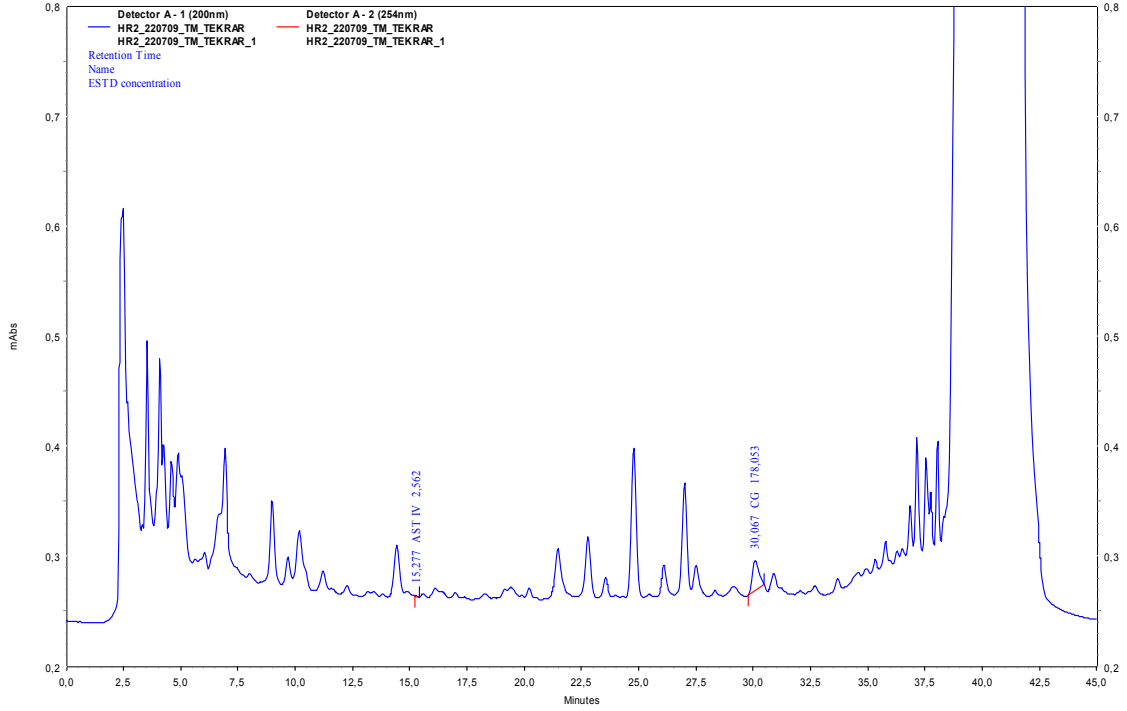
Kaynak	Karelerinin toplamı	df	Karelerinin ortalaması	F değeri	p-değeri Olasılık > F
Model-Significant	21.21	6	3.54	697.86	0.0290
A-ALKALI MİKTARI	0.23	1	0.23	44.76	0.0945
B- BITKİ MİKTARI	1.83	1	1.83	360.70	0.0335
C-REAKSİYON SÜRESİ	5.24	1	5.24	1033.47	0.0764
AB	0.35	1	0.35	68.68	0.0165
BC	7.50	1	7.50	1480.07	0.0184
ABC	6.08	1	6.08	1199.47	
Residual	5.067 E-003	1	5.067E-003		
Cor Total	21.22	7			
Std. Dev.	0.071			R-kare	0.9998
Ortalama	4.00			Tahminlenen değerlere yakınlığı ifade eden R-KARE değeri	0.9983
C.V. %	1.78			Tahminlenen R-kare değeri	0.9847
PRESS	0.32			Doğruluk yeterliliği	79.564

F-değerinin 697.86 olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. "**Olasılık>F**" değerinin 0.0500'ten büyük olması model terimlerinin belirleyici olduğunu ifade etmektedir. Bu durumda B, C, BC, ABC model terimlerinin önemli olduğu anlaşılmaktadır. Değerlerin 0.1000'den yüksek olması model terimlerinin anlamlı olmadığını ifade etmektedir.

Çizelge 5.7'deki değişkenlerin analizinde görülen elde edilen sonuçların tahminlenen değerlere yakınlığını ifade eden R^2 değeri 0.9983 olarak saptanmıştır. 0.9847 olarak saptanan tahminlenen R^2 değeri, 0.9983 değerinin yanında kabul edilebilir bulunmaktadır. Modelin doğruluk değerinin (79.564) yeterli olduğu belirtilmiştir.

Hedeflenen Sonuca İlişkin Final Eşitliği:

$$CG\ KONS=+4.00-0.17*A+0.48*B+0.81*C-0.21*A*B+0.97*B*C-0.87*A*B*C$$



Şekil 5.18 Deneme set 3'e ait HR2_220709_TM denemesinin HPLC Diyagramı

5.4 Deneme set 4

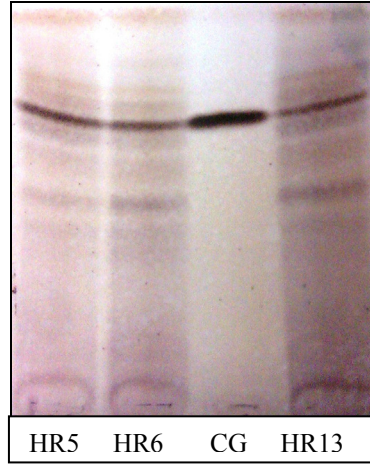
Amaç: Deneme set 3'ten elde edilen optimuma en yakın koşulların orta ölçekte 3 faktöriyel deneme planı ile incelenmesi (200g bitki miktarı sabit tutularak)

Çizelge 5.8 Deneme Set 4

ANALİZ	SON SOLVENT HACMİ	HPLC KODU	Faktör 1	Faktör 2	Response 1	Response 2	
	mL		A:Alkali miktarı g	B:Reaksiyon süresi saat	ESTD KONS CG (µg/mL)	CG KONS (mg/g)	CG Yüzdesi (g/g)x100
1	4230	HR1_050809	157.5	27	80.491	3.404769	0.340477
2	4180	HR2_100809	180	24	92.967	3.886021	0.388602
3	4200	HR3_050809	157.5	30	86.882	3.649044	0.364904
4	4400	HR4_170809	157.5	27	66.856	2.941664	0.294166
5	3900	HR5_120809	135	30	346.968	13.53175	1.353175
6	4020	HR6_120809	135	24	293.244	11.78841	1.178841
7	4500	HR7_180809	157.5	27	108.96	4.9032	0.49032
8	4080	HR8_100809	180	30	62.242	2.539474	0.253947
9	4200	HR9_200809	157.5	27	104.89	4.40538	0.440538
10	4260	HR10_050809	157.5	24	106.518	4.537667	0.453767
11	4200	HR11_210809	157.5	27	77.57	3.25794	0.325794
12	4140	HR12_100809	180	27	78.278	3.240709	0.324071
13	3960	HR13_120809	135	27	138.076	5.46781	0.546781

5.4.1 Deneme set 4 sonuç:

1, 4, 7, 9 ve 11 nolu analizler aynı reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen ve modelin tekrarlanabilirliğini belirleyen denemelerdir. Yapılan denemelerin sonuçlarına bakıldığında birbirine yakın sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bu da modelin tekrarlanabilir sonuçlar verdiği anlamına gelmektedir. Elde edilen diğer analiz verileri değerlendirildiğinde 4,5L n-BuOH içinde çözünmüş 135g NaOH kullanıldığında, 200g bitkisel materyalden 30 saatlik reaksiyon süresi sonucunda HR5_120809 kodlu denemede **1,353175 g/g** sikloastrogenol verimi elde edilmiştir. Aynı reaksiyon koşullarında 24 ve 27 saat sürdürülen HR6_120809 ve HR13_120809 kodlu denemelerin İ.T.K. kromatogramına bakıldığında (Şekil 5.19) profillerin benzer olduğu görülmektedir. HPLC sonuçlarına bakılarak verim hakkında kesin bir sonuca varılmaktadır.



Şekil 5.19 HR5, HR6, HR13 orta ölçek denemelerinin İTK profilleri

Bu veriler ışığında varılan bir diğer sonuç da alkali miktarı arttıkça dönüşüm verimliliğinin olumsuz yönde etkilenmesidir. Çünkü 157,5g ve 180g alkali kullanılarak gerçekleştirilen denemelerin verimlerinde paralel bir şekilde düşüş gözlenmektedir.

Bu nedenle pilot ölçek denemelerine, orta ölçekte en yüksek verimi veren HR5_120809 kodlu deneme baz alınarak devam edilmiştir.

Çizelge 5.9 Modelin yeterlilik testi

Kaynak	Kareler toplamı	df	Karelerinin ortalaması	F değeri	p-değeri Olasılık > F	
<i>Lineer</i>	64.03	6	10.67	15.42	0.0097	
<i>2FI</i>	61.65	5	12.33	17.81	0.0077	
<u>Quadratik</u>	<u>25.15</u>	<u>3</u>	<u>8.38</u>	<u>12.11</u>	<u>0.0178</u>	<u>Önerilen</u>
<i>Kubik</i>	7.38	1	7.38	10.66	0.0309	

Çizelge 5.10 Modelin özet istatistikleri

Kaynak	Std. Dev.	R kare değeri	Adjusted R-Squared	Tahminlenen R-Kare	
Lineer	2.58	0.5269	0.4323	-0.0811	
2FI	2.68	0.5438	0.3917	-1.5064	
<u>Quadratik</u>	<u>2.00</u>	<u>0.8023</u>	<u>0.6610</u>	<u>-0.6663</u>	<u>Önerilen</u>
Kubik	1.42	0.9281	0.8275	-5.1027	

Yapılan ilk analizde reaksiyon süresinin etkisi çok düşük olduğu için ihmal edilerek tekrar analiz edildiğinde alkali miktarının büyük ölçekte kurulan deneme setinde reaksiyonu en çok etkileyen parametre olduğu saptanmıştır.

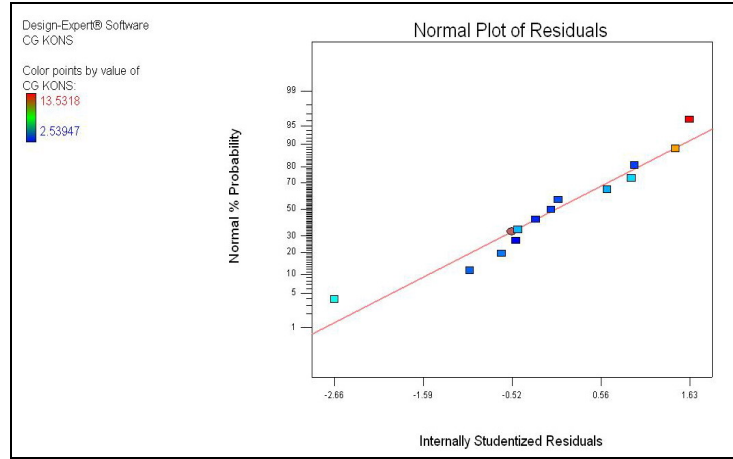
Çizelge 5.11 Değişkenlerin analizi çizelgesi

Kaynak	Karelerinin toplamı	Df	Karelerinin ortalaması	F değeri	p-değeri Olasılık > F
<i>Model- Anlamlı</i>	113.24	4	28.31	8.10	0.0065
<i>A-Alkali miktarı</i>	74.35	1	74.35	21.27	0.0017
<i>AB</i>	2.39	1	2.39	0.68	0.4325
<i>A²</i>	12.78	1	2.78	3.66	0.0922
<i>B²</i>	9.87	1	9.87	2.82	0.1314
<i>Residual</i>	27.96	8	3.50		
<i>Yeterlilik- Anlamlı</i>	25.19	4	6.30	9.10	0.0275
<i>Pure Error</i>	2.77	4	0.69		
<i>Cor Total</i>	141.20	12			
Std. Dev.	1.87		R-Squared	0.8020	
Mean	5.20		Adj R-Squared	0.7030	
C.V. %	35.98		Pred R-Squared	0.1685	
PRESS	117.41		Adeq Precision	8.369	

F-değeri olarak belirlenen 8.10 değeri modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Olasılık > F değerinin 0.05'ten büyük olmaması modelin kabul edilebilir olduğunu göstermektedir. Yeterlilik değerinin ise 9.10 olması da modelin yeterli olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

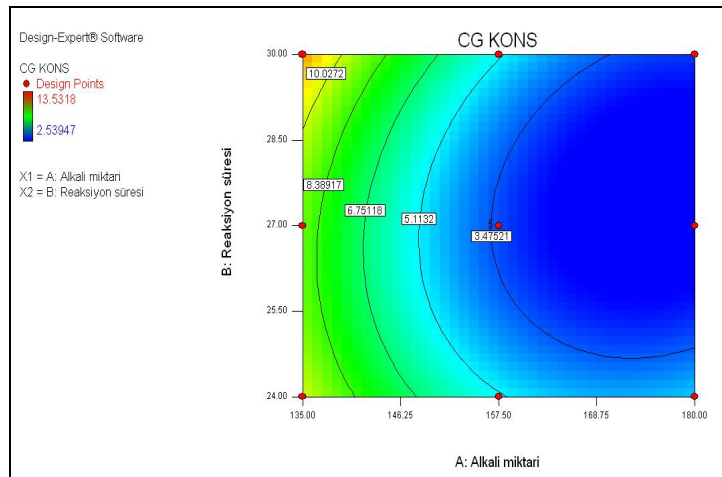
Hedeflenen sonuca ilişkin final eşitliği:

$$CG\ KONS = +3.33 - 3.52 * A - 0.77 * A * B + 2.15 * A^2 + 1.89 * B^2$$



Şekil 5.20 Deneme set 4'te standardize edilmiş değerlerin normalite grafiği

Modelin uygunluğunun incelenmesi için istatistiksel hata analizi yapılmış ve standardize edilmiş değerlerin normalite grafiğinin doğrusallık gösterdiği belirlenmiştir (şekil 5.20).

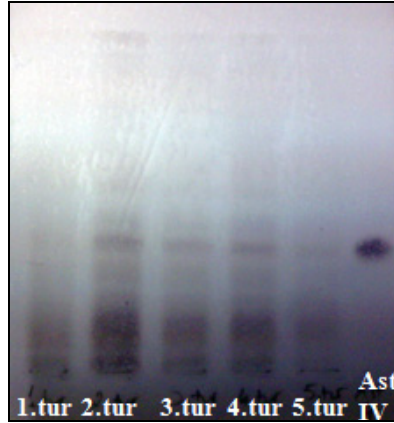


Şekil 5.21 Deneme set 4 için kullanılan modelin yanıt yüzey grafiği

5.5 Pilot ölçek denemeleri

Pilot ölçek denemelerinde amaç, orta ölçekte elde edilen sonuçların bu ölçeğe oransal olarak aktarıldığında paralel verimliliğin elde edilip edilemeyeceğini tespit etmek, standart bir üretim için optimum noktayı saptamak ve karşılaşılan donanımsal eksikleri saptayarak sistemin devamlılığı için çözüm üretmektir. Bu amaçla orta ölçekte optimum verimi veren 200g bitkisel materyalin, 4.5L n-BuOH'ün ve 135g (0.75M) alkalinin kullanıldığı, %1.35 CG (g/g) veriminin elde edildiği HR5_120809 denemesi baz alınarak pilot ölçek denemelerine geçilmiştir.

Gerçekleştirilen ilk denemede amaç, sistemin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol etmek ve kaçakların tespit edilerek sistemin sorunsuz çalışmasını sağlamak olmuştur. Bu deneme esnasında mevcut olan cam geri soğutucunun reaksiyon esnasında çatlaması üzerine paslanmaz çelik malzemeden yeniden yaptırılmıştır. Buna ilave olarak bazı vanalardaki solvent kaçakları tespit edilerek tamiri sağlanmıştır. Ayrıca sifon işleminin doğru çalışmadığı tespit edilerek şekil 4.10'da görülen vanalar yardımıyla manuel olarak gerçekleşmesi sağlanmıştır. Yapılan İTK kontrolleriyle 5 turdan sonra ekstraksiyonun hemen hemen tamamlandığı gözlenmiş (Şekil 5.22) ve bunun üzerine 5. turdan sonra sifon vanaları tamamen açılarak solventin ekstraktörden reaktöre devamlı olarak akışı sağlanmıştır.



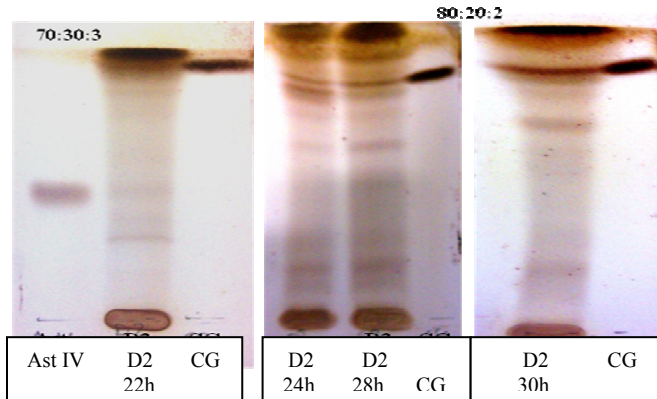
Şekil 5.22 Pilot ölçek tur örneklerinin TLC profili (70:30:3)

Pilot ölçekte meydana gelen çalışma güçlükleri nedeniyle bu ölçekte daha dar aralıkta optimizasyon çalışması yapılmasına karar verilmiştir.

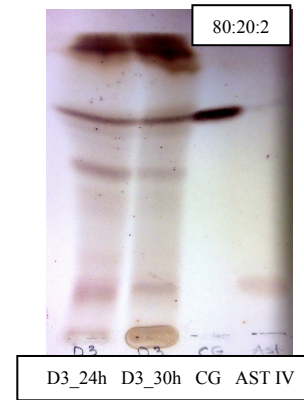
5.5.1 Deneme set 5 pilot ölçek koşulları ve sonuçları

Çizelge 5.12 Deneme set 5 koşulları ve sonuçları (D3, D1'in denemesinin tekrarı)

	Analiz Kodu	Bitki miktarı (g)	Reaksiyon süresi (saat)	Alkali miktarı sabit	Solvent miktarı sabit	Son Solvent Hacmi	ESTD KONS CG ($\mu\text{g/mL}$)	CG KONS (mg/g)	CG YÜZDESİ (g/g)x100
Deneme 3	PÖ_D3_24h	700	24	480g	16L	14.4L	127.489	5.2452	0.524526
Deneme 3	PÖ_D3_30h	700	30	480g	16L	14.4L	157.872	6.4953	0.649531
Deneme 4	PÖ_D2_24h	1000	24	480g	16L	12L	157.804	3.7872	0.37873
Deneme 4	PÖ_D2_30h	1000	30	480g	16L	12L	155.085	3.9276	0.392765
Deneme 4	PÖ_D2_28h	1000	28	480g	16L	12L	163.652	3.7220	0.372204
Deneme 1	PÖ_D1_24h	700	24	480g	16L	9.5L	201.227	5.4618	0.54618
Deneme 1	PÖ_D1_36h	700	36	480g	16L	9.5L	192.855	5.2346	0.52346



Şekil 5.23 PÖ_D2_24h ve PÖ_D2_30h örneklerinin İ.T.K profilleri



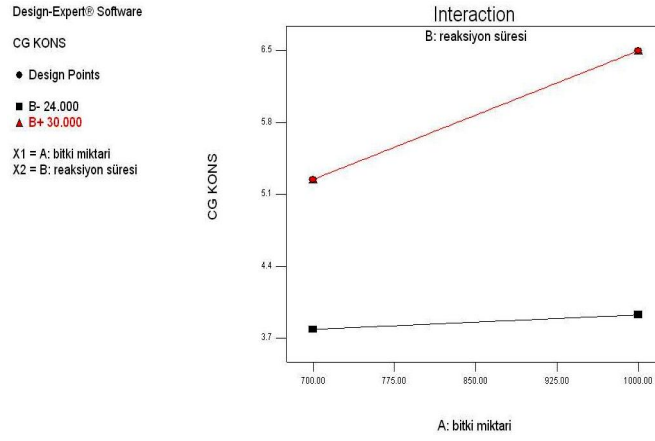
Şekil 5.24 PÖ_D3_24h ve PÖ_D3_30h örneklerinin İ.T.K profilleri

5.5.2 Deneme Set 5 Değerlendirme

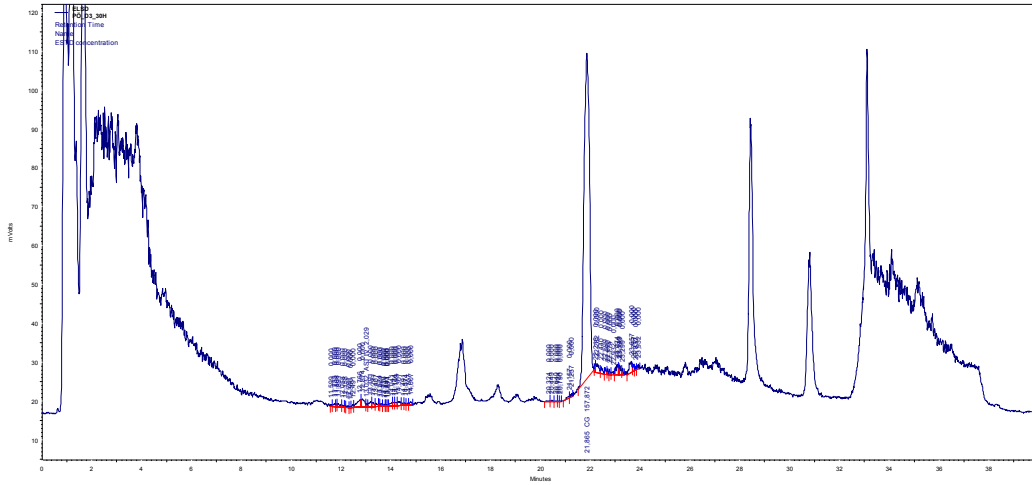
Deneme set 5'te orta ölçeğe elde edilen optimum NaOH konsantrasyonu (0.75M-480g), bitki/solvent oranı (0.044-700g) ve reaksiyon süresi (30 saat) parametreleri pilot ölçeğe gerçekleştirilen D1 (Deneme 3'ün tekrarı) ve D3 kodlu denemelere birebir aktarılmıştır. Amacımız, orta ölçeğe elde edilen optimum verimin pilot ölçeğe elde edilip edilemeyeceğini tespit etmektir. Çizelge 5.12'de elde edilen analiz sonuçlarına bakıldığında küçük ve orta ölçeğe elde edilen en yüksek verime kıyasla pilot ölçek denemelerinde bu verimin tam olarak elde edilemediği ancak ortalama verime (% 0.518) paralel bir sonuç (% 0.484 g/g) alındığı gözlenmiştir.

Bunun nedeni olarak kontrol edilemeyen diğer faktörlerin sistemi etkilediği sonucuna varılmıştır. Bu reaksiyonlarda Ast IV'ün neredeyse tamamının tükendiği şekil 5.27'de sayısal olarak gözlenmesine rağmen CG veriminin % 0.649'larda kaldığı gözlenmiştir. Her ne kadar orta ölçeğe büyük ölçeğe geçilirken verim kaybı gözlenirse de bu durum çalışılan bitkisel materyalin iki farklı partiden gelmesi olarak yorumlanmıştır. Pilot ölçeğe uzun süreli gerçekleşen hidroliz reaksiyonunda solvent kaçağının çok olması durumunda doğabilecek riskler büyük olduğu için 0.5 bar hava reaksiyon ortamına verilebilmiştir. Havanın debisinin azalması ve ekstraktör hacminin büyümesi nedeniyle ekstraksiyon hızı yavaşlamıştır. Ancak reaksiyonlar 30 saat içinde tamamlanmış ve en yüksek CG konsantrasyonu 700 g bitki materyalinin kullanıldığı, 480g NaOH ile 16L n-BuOH ortamında gerçekleştirilen PÖ_D3_30h denemesinde % 0.649 olarak elde edilmiştir.

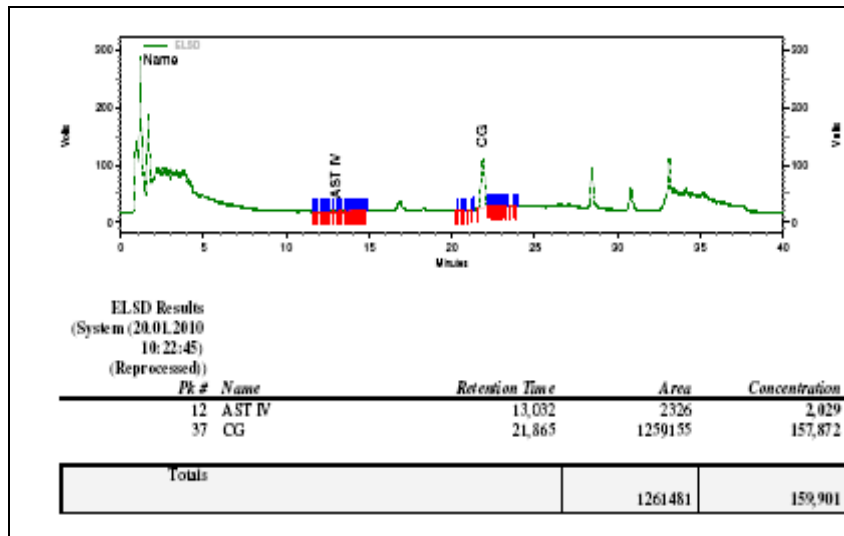
Elde edilen tüm veriler 'design expert' istatistiksel programıyla değerlendirildiğinde reaksiyon süresinin artmasıyla CG konsantrasyonunda artış gözlenirken, bitki miktarının artmasıyla verimin çok fazla değişmediği sonucuna varılmıştır.



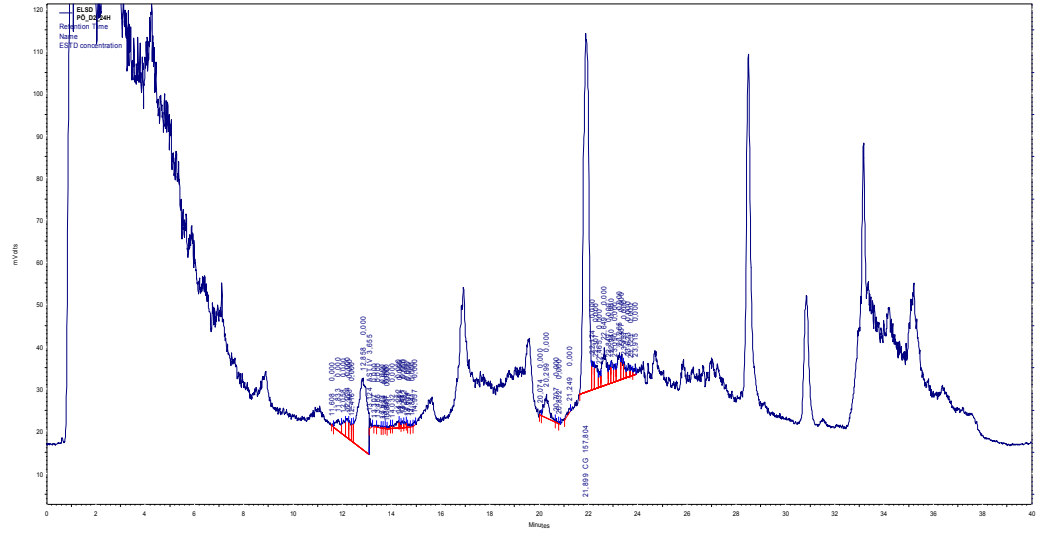
Şekil 5.25 Pilot ölçek denemelerinin analiz grafiği



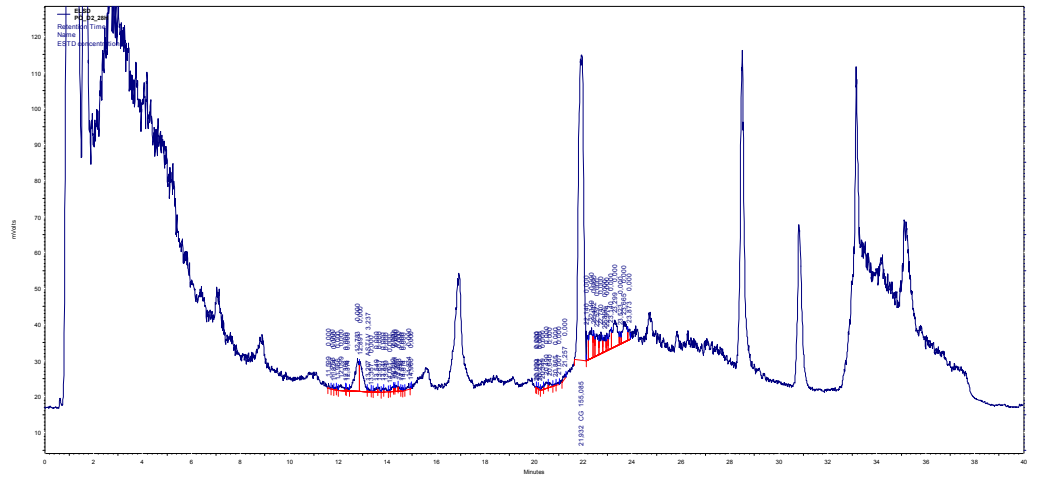
Şekil 5.26 PÖ_D3_30h denemesinin ELSD kromatogramı



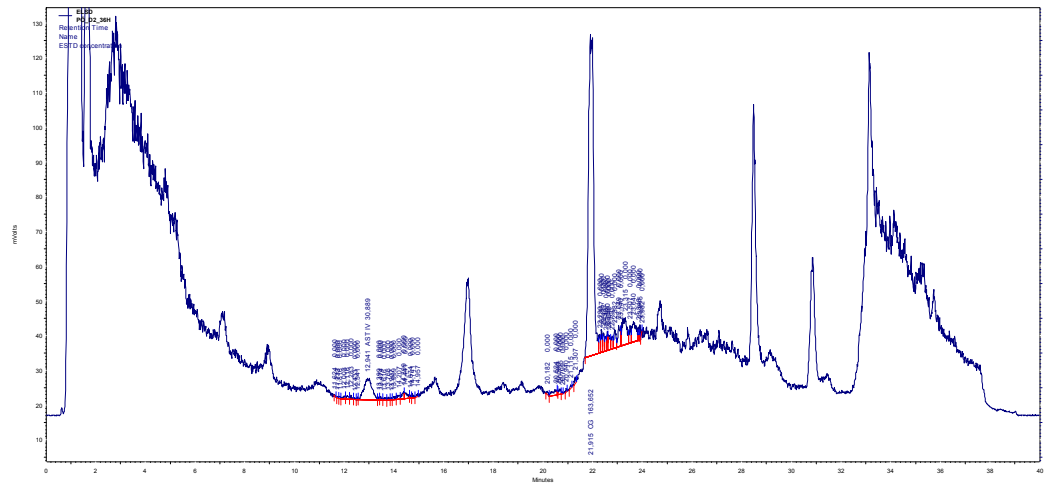
Şekil 5.27 PÖ_D3_30h denemesinin ELSD analiz raporu



Şekil 5.28 PÖ_D2_24h denemesinin ELSD kromatogramı



Şekil 5.29 PÖ_D2_28h denemesinin ELSD kromatogramı



Şekil 5.30 PÖ_D2_30h denemesinin ELSD kromatogramı

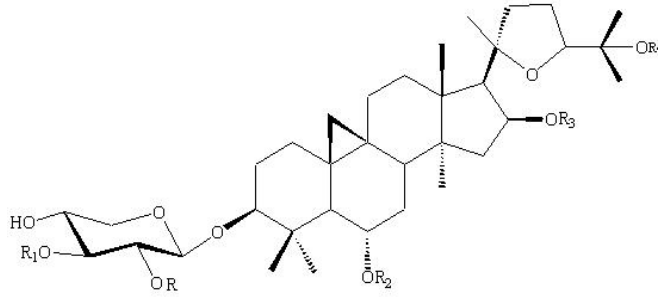
6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Daha önce kullanılmakta olan inorganik asitlerle yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz çalışmaları esnasında katma değeri yüksek olan saponinlerin bazıları düşük stabilitelerinden dolayı siklizasyon, epimerizasyon, hidroksilasyon ve/veya sikloartanlarda olduğu gibi halka açılması reaksiyonlarından kaynaklanan artifaktları meydana getirmekte ve sonuç olarak verimlilik büyük oranda azalmaktadır.

Bu nedenle daha ılımlı metotlar ile yan ürün oluşumu gerçekleşmeden çok daha etkin ve hızlı bir şekilde alt ayırım işlemlerini asgariye indirgeyen hidroliz işlemlerinin geliştirilmesi endüstriyel açıdan büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla yapılan literatür araştırması sonunda yukarıda bahsedilen avantajları sağlayacak bir hidroliz metodunun varolduğu ve bunun pilot ölçeğe uygun hale getirilebileceği yargısına varılmıştır. 1990'lı yıllarda Cui ve ark. tarafından yapılan bu çalışmalarda *Panax ginseng* bitkisinde biyolojik etkiden sorumlu ve ticari öneme sahip ginsenosit grubu triterpenik glikozitlerin glikozidik bağlarının laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilen alkali ortamda oksidatif açılma yöntemi ile başarılı bir şekilde kırıldığı ve hiçbir yan ürün oluşmadığı bildirilmiştir.

Bu tez kapsamında taşımış olduğu gergin siklopropan halkası nedeniyle asidik hidrolize çok hassas olan astragalozit isimli sikloartan grubu saponin glikozitlerin aglikonu olan sikloastragenol'un elde edilebilmesi için Cui ve ark. tarafından geliştirilen metodun uygun olup olmadığı üç farklı ölçekte çalışılmıştır.

İlk olarak yapılan bir çalışmada *Astragalus trojanus* türü köklerinden çizelge 5.12'de görülen astrasiyeversiyenin I, astrasiyeversiyenin II, astragalozit I, astragalozit IV, astragalozit VII isimli sekonder metabolitlerinin izole edildiği bilinmektedir (Bedir, 1998). Bu bileşiklerin tamamı aglikon olarak sikloastragenol taşıyan sikloartanlardır. Bu bilgiler ışığında *A. trojanus* türü köklerinden bu tez kapsamında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu ile ekstraksiyon sonucu elde edilen metabolitlerin şekerlerini kaybederek sikloastragenol iskeletine dönüştüğü İ.T.K ve HPLC ile yapılan kontroller sonucunda doğrulanmıştır.



Çizelge 5.12 Astragalus trojanus köklerinden elde edilen sekonder metabolitler [Bedir, 1998]

	R	R₁	R₂	R₃	R₄
Astragalozit VII	H	H	β -D-Glu	H	β -D-Glu
Astragalozit IV	H	H	β -D-Glu	H	H
Astragalozit II	Ac	H	β -D-Glu	H	H
Astragalozit I	Ac	Ac	β -D-Glu	H	H
Astrasiyaversiyanin II	Ac	Ac	β -D-Xyl	H	H
Astrasiyaversiyanin X	H	H	β -D-Xyl	H	H
Astragalozit VI	β -D-Glu	H	β -D-Glu	H	H
Trojanozit A	H	H	β -D-Glu	Ac	H

Bu çalışmanın amacı sadece başarılı bir şekilde sikloastragenol'ün elde edilmesi değil aynı zamanda entegre bir ekstraksiyon ve reaksiyon ünitesinin dizayn edilerek aynı sistem içinde etkin bir şekilde hem ekstraksiyon hemde hidrolizin uygulanabilmesi olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarla tasarlanan sistemde başarı ile her iki prosesin bir arada gerçekleşebileceği doğrulanırken, aynı zamanda sistemi etkileyen önemli parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır.

Sistemi etkileyen parametreler, bitki/solvent oranı, alkali derişimi, zaman olarak belirlenmiştir. Elde edilen en optimum sikloastragenol verimleri küçük ölçekte 0.033 bitki/solvent (g/mL) oranı, 9 saatlik reaksiyon süresi ve 15g NaOH (0.5M) kullanıldığında %1.44 (g/g), orta ölçekte 0.044 bitki/solvent oranı, 30 saatlik reaksiyon süresi ve 135g NaOH (0.75M) kullanıldığında %1.35 (g/g), pilot ölçekte ise 0.044 bitki/solvent oranı, 30 saatlik reaksiyon süresi ve 480g (0.75M) NaOH kullanıldığında %0.65 (g/g) olarak saptanmıştır.

Geliştirilen tasarımla yalnız sikloastragenol değil asidik hidrolize hassas birçok sekonder metabolitin hidrolizinin hızlı ve ekonomik bir şekilde gerçekleştirilebileceği bir yöntem kazanılmıştır. Bunun yanı sıra şu ana kadar ki çalışmalarda uygulanan ekstraksiyon, uçurma ve devamında inorganik asit içeren alkolik solüsyonlarda hidroliz ile devam eden ve nötürleştirmeyi takiben çözgen partisiyonu ve ayırma-safılaştırma işlemleri ile süren prosesin çok daha az basamakla tamamlanabilmesi mümkün kılınmıştır. Bunun temel nedeni sadece aynı sistem içinde ekstraksiyon ve hidrolizin gerçekleştiriliyor olması değil, kullanılan proses sonunda elde edilen karışımın asidik hidroliz sonucu elde edilen karışıma oranla çok daha temiz olması (az metabolit ve kirlilik içermesi) ve ayırma-safılaştırmanın çok daha kolay sağlanabilecek olmasıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ath K., Bozcuk N., 2002,** Telomer and cellular ageing, Turkish Journal of Geriatrics, Geriatri 5 (3): 111-114
- Akgün I. H., 2006,** Sikloastragenolden Hareketle Kimyasal Modifikasyonlar Yapılarak Sitotoksik Etkinliği Yüksek Yarı-Sentetik Moleküllerin Hazırlanması, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., 2002,** Bitki Biyoteknolojisi, Selçuk Üniversitesi, Genetik Mühendisliği, Uğurer yayınları 211-214, 374 s
- Bedir E., 1998,** Bazı *Astragalus* türlerinin sikloartan triterpenik saponozitleri üzerinde farmakognozik araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı, Doktora Tezi
- Bedir E., Çalis I., Aquino R., Piacente S., and Pizza C., 1998,** Secondary Metabolites from the Roots of *Astragalus trojanus*, *J. Nat. Prod.*, 62, 563–568 pp
- Bedir, E., Pugh, N., Calis, I., Pasco, D., Khan, I.A. Biol. Pharm. Bull. 2000, 23,** 834-837
- Butler, S. M., 2008,** Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials, Natural Product Reports, 25, 475–516pp.
- Calış I., Zor M., Saracoglu I., Isimer A., Rüegger H., J. Nat. Prod., 59, 1019-1023 (1996)**
- Calış I., Yusufoglu H., Zerbe O., Sticher O., Phytochemistry, 50, 843-847 (1999)**
- Calış I., Yürüker A., Tasdemir D., Wright A. D., Sticher O., Luo Y. D., Pezzuto J.M., Planta Med., 63, 183-186 (1997).**
- Cui, J. F., Garle, M., Lund, E., Bjorkhem, I. and Eneroth, P., 1993,** Analysis of Ginsenosides by Chromatography and Mass Spectrometry: Release of 20 S-Protopanaxadiol and 20 S-Protopanaxatriol for Quantitation, *Analytical Biochemistry*, 210 (2) 411-417 pp.
- Cui, J. F., Bystrom, S., Bjorkhem, I. and Eneroth, P., 1994,** Novel Mechanism for Oxidative Cleavage of Glycosidic Bonds: Evidence for an Oxygen Dependent Reaction, *J. Org. Chem.*, 59 8251-8255pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Davis P.H.**, “*Flora of Turkey and East Aegean Islands*” Vol.4, University Press:Edinburgh 1970; pp 49-254
- E.Dikmen, M.Kara, G.Dikmen, H.Çakmak ve P.Doğan, 2003**, “Detection of telomerase activity in bronchial lavage as an adjunct to cytological diagnosis in lung cancer”, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 194-199,
- Hayashi, T., Kubo, M.**, 1980, Antitumor Compositions Comprising Saponins, *Chem. Abstr.*, 4: 7771pp.
- Hemscheidt, T. K.**, 2004, Semi-Synthesis and In-vitro Anticancer Evaluation of Derivatives of a New Microtubule Poison with a Taxol-Like Mechanism, *U.S. Army Medical Research and Materiel Command*, Fort Detrick.
- Honda, T., Gribble, G. W., Suh, N., Finlay, H. J.**, Novel Synthetic Oleanane and Ursane Triterpenoids with Various Enone Functionalities in Ring A as Inhibitors Of Nitric Oxide Production in Mouse Macrophages, 2000, *J. Med. Chem.*, 43: 1866-1877pp.
- Hostetmann, K., Marston, A.**, 1995, Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Saponins, *University Press, Cambridge*, 177-195, 548pp
- Inoue, O., Takeda, T. and Ogihara, Y.**, 1978. Carbonhydrate structures of the three new saponins from the root bark of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1289-1293pp
- Ireland and Dziedzic**, 1986a. Effect of hydrolysis on saponin release in soya. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 1037-1041pp.
- Ito, Y., Pandey P., Sporn, M. B., Datta, R., Kharbanda, S., Kufe, D.**, 2001, The Novel Triterpenoid CDDO Induces Apoptosis and Differentiation of Human Osteosarcoma Cells by a Caspase-8 Dependent Mechanism, *Molecular Pharmacology*, 59 (5): 1094-1099pp.
- Ito Y., Pandey P., Place A., Sporn M.B., Gribble G.W., Honda T. Kharbanda S., Kufe D.**, 2000, The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid induces apoptosis of human myeloid leukemia cells by a

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

caspase-8-dependent mechanism, *Cell Growth & Differentiation*, 261-267pp.

Japan Paten Office, 1983 Registration Number: 58-059921.

Japan Paten Office, 1984 Registration Number: 58-072523

Jung, M. E., Duclos, B. A., 2006, Synthetic approach to analogues of betulinic acid *Tetrahedron*, 62: 9321–9334 pp.

Kitagawa, I., 1981. Cleavage glycoside linkages. In *advances in Natural Product Chemistry*, eds. S. Natori, N. Ikekawa and M. Suzuki, pp. 310-326. John Wiley, New York

Kuboto, T., Kitatani H. And Hinoh, H. (1969). Isomerization of quillaic acid and echinocystic acid with hydrochloric acid. *Tetrahedron Lett.*, 303-306 pp

Lapillonne H, Konopleva M., Tsao T., Gold D., Mcqueen T., Madden T., Andreeff M., 2003, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by a novel synthetic triterpenoid CDDO induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells, *Experimental Hematology*, 31 (7): 66-69 pp.

Mayaux, J.F., Bousseau, A., Pauwels, R., Huet, T., Henin, Y., Dereu, N., Evers. M., 1994, Triterpene Derivatives That Block Entry Of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Into Cells, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 91 (9): 3564-3568 pp.

Montgomery, D.C., 2002, “Design and Analysis of Experiment”, John Wiley&Sons Inc, New York

Nanjoo, S., Yongping, W., Tadashi, H., Gordon, W. G., Ethan D., William F. H., Robert A. M., 1999, A Novel Synthetic Oleanane Triterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic Acid, with Potent Differentiating, Antiproliferative, and Anti-Inflammatory Activity, *Cancer Research* 59: 336-341 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pedersen, I. M. Shinichi, K., Aaron S., Youngsoo K., Juan, M. Z., Lula, C., Laura R., Andreeff, M., Bennett, F., Sporn, M. B., Liotta, L. D. , Kipps, T. J. , Reed, J. C. , 2002, *Blood*, 100(8), 2965-2972 pp.**
- Rao, A.V., Gurfinkel, D.M., 2000, Bioactivity of saponins: Triterpenoids**
- Sarek, J., Urban, M., Klinot, J., Korinkova, G., and Hajdich, M., 2004, Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity *J. Nat. Prod.* 67: 1100-1105 pp.**
- Tschesche, R., Seide, L., Sharma, S.C and Wulff G., 1972, Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, VI. Ueber Lanatigosit und Lanagitosit, zwei bisdesmosidische 22-Hidroxy-Frostanol-Glykoside aus den Blatten von *Convallaria majalis* L. *Chem. Ber.*, 105, 3397-3406 pp.**
- Valenzuela H., Fuller T., Edwards J., Finger D. and Molgora B., 2009, Cycloastragenol extends T cell proliferation by increasing telomerase activity *The Journal of Immunology*, 182 pp**
- Zhanga W., Zhanga C., Liua R., Lia H., Zhange J., Maoc C. and Chenc C., 2005, Quantitative determination of Astragaloside IV, a natural product with cardioprotective activity, in plasma, urine and other biological samples by HPLC coupled with tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography*, Volume 822, Issues 1-2, Pages 170-177 pp**

ÖZGEÇMİŞ**TUĞBA TIRPANMAN**

1725 sok. No:24 35530 Karşıyaka/İzmir

Cep Tel: +90 505 744 85 37

tugbatirpanman@yahoo.com

Doğum Tarihi: 10.09.1985

Doğum Yeri: Bursa

Uyruğu: T. C.

Medeni Hali: Bekar

Ehliyet: B sınıfı- 2005

EĞİTİM BİLGİLERİ

- **09.2007 – Ege Üniversitesi/İzmir**
Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Yüksek Lisans
- **09.2003 - 06.2007 Ege Üniversitesi/İzmir**
Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (ort: 82,38 / 100)
- **1996 - 06.2003 Bursa Gazi Anadolu Lisesi**
Fen Bilimleri (ort: 4.77/ 5)

BİLGİSAYAR

- Windows 95, 98, XP, Vista
- Tüm MS Office Programları, İnternet
- Shimadzu Class-VP
- Statistica, Design Expert, ACD Labs

TEZLER:

LİSANS TEZİ (2007) - DANIŞMANI: 1,3-Dibenzilimidazolinyum Tuzlarında P-Süstitüeyentin Elektronik Etkisi, Prof. Dr. Bekir ÇETİNKAYA (Anorganik Kimya-Kimya Bölümü)

YÜKSEK LİSANS TEZİ (2010) - DANIŞMANI: Saponin Glikozitlerinin Ekstraksiyonu ve Oksidatif Açılma Yöntemi ile Hidrolizinin Gerçekleştiği Entegre Bir Sistemin Kurulması ve Metot Optimizasyonu, Prof. Dr. Erdal BEDİR (Doğal Ürün Kimyası-Biyomühendislik)

İŞ DENEYİMLERİ

(06.2005-07.2005)	Özdilek-Kimyager	Bursa
(06.2006-07.2006)	Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü Eşya ve Levazım Laboratuvarı-Kimyager	İzmir
(2008-2009)	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Temel Laboratuvar Deney Sorumlusu	İzmir
(15.01.2009-01.09.2009)	Ege Üni. Biyomüh. -Tübitak Proje Asistanlığı	İzmir
(01.09.2009-....)	Kuantum CRO Ltd. Sti.- Klinik Araştırma Asistanı	İzmir

ALMIŞ OLDUĞU EĞİTİMLER

- **İyi üretim uygulamaları (GMP)**, 28.04.2007-29.04.2007 (18Saat), Kimyagerler derneği 5324 sayılı kozmetik kanunu, ilgili yönetmelik ve kozmetik sektöründe GMP uygulama eğitimi
- **Laboratuar güvenliği** sempozyumu katılım belgesi, 18.05.2007, E.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma Eğitim Lab.(AREL)
- **HACCP** (Tehlike analizi ve kritik noktaları eğitimi) eğitimi, 24.02.2008, (TS EN ISO 22000), Ebiltem ve Kırmacı Mühendislik ve Danışmanlık
- **Toplam Kalite Eğitimi Sertifikası (ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi)**, 25.05.2008, BAMER Danışmanlık Özel Eğitim Ltd. Şti
- **IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi** Katılım Belgesi 15-18 Ekim 2008 (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, TMMOB Kimya Müh. Odası)
- **Oryantasyon Eğitimi**, 01-02 Eylül 2009 Kuantum Klinik Araş. Ltd. Şti
- **‘Terminology in Clinical Research’** eğitimi, 22.10.2009, Kuantum Klinik Araş. Ltd. Şti
- **Kuantum SOPs** (Standart Operating Prosedures), 28.10.2009, Kuantum Klinik Araş. Ltd. Şti
- **ICH-GCP** (İyi Klinik Uygulamaları eğitimi), 08.11.2009, Kuantum Klinik Araş. Ltd. Şti.