



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FINDIK KABUĞUNDAN PAKLİTAKSEL SAFLAŞTIRILMASI

ELİF SİNE AKSOY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL İBRAHİM UĞRAŞ**

DÜZCE, 2017

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FINDIK KABUĞUNDAN PAKLİTAKSEL SAFLAŞTIRILMASI

Elif Sine AKSOY tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Ümit ÇAKIR
Balıkesir Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ersin ORHAN
Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 03/02/2017

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03 Şubat 2017

Elif Sine Aksoy



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Halil İbrahim Uğraş'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Serpil Uğraş'a şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve özellikle manevi destekteklarini esirgemedен gösteren çok değerli dostlarım Ayşegül Akbaş, Buşra Beşir, Fulya Özgül, Merve Karşlıoğlu, Tuğçe Ölmez, Meral Özdemir, Gözde Yeşildağ, Sercan Erdođan, Soner Kobaş, Fadime Ođuz, Yasin Güreşir, Semih Elçik, Ünal Düvenci, Ecem Tunç'a; desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Merve Kambur, Melike Yazıcı, Sinem Ergen, Mert Dönmez, Güven Yazıcı ve Ali Kaval'a ve ilk çalışma arkadaşım Bora Karagül'e, Esra Kütük, Merve Can, Pınar Aydın, Sevim Kılıçarslan, Sultan Ülger, Şebnem Üzmez ve özellikle hem ekip çalışma arkadaşım hem de yakın arkadaşım olan Ayşe Uzun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardıma ihtiyacım olan her an yanımda bulunan sevgili kuzenlerim Burak Aksoy, İrem Aksoy, Tuğba Demirtaş, Neris Taymaz ve Nefne Taymaz'a; canım kardeşlerim Sena ve Serda Aksoy'a ve son olarak bana maddi manevi gerçek anlamda sonsuz destek olan, her zaman eğitime önem veren ve beni yüreklendiren her an yanımda olan saygıdeğer annem Ayşe Aksoy ve saygıdeğer babam Feridun Aksoy'a sonsuz minnetlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, TUBİTAK tarafından TBAG-114Z233 nolu proje kapsamında desteklenmiş ve ayrıca Düzce Üniversitesi BAP-2014.05.03.276 numaralı yüksek lisans tez projesi kapsamında desteklenmiştir. Her iki kuruma da desteklerinden dolayı çok teşekkür ederiz.

03 Şubat 2017

Elif Sine AKSOY

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	XI
KISALTMALAR.....	XII
ÖZET.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
1.1 GENEL BİLGİLER.....	1
1.2 KANSER NEDİR ?.....	1
1.3 KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ.....	2
1.4 KEMOTERAPİ YÖNTEMİ VE KULLANILAN İLAÇLAR.....	3
1.5 ALKALOİDLER.....	6
1.5.1 Bitkisel Alkaloidler.....	8
<i>1.5.1.1 Vinka Alkaloidleri.....</i>	<i>8</i>
<i>1.5.1.2 Taksanlar.....</i>	<i>8</i>
1.6 DOĞAL ÜRÜNLER.....	9
1.6.1 Bitkisel Kökenli İlaç.....	9
1.6.2 Doğal Ürünlerde Taksanların Varlığı ve Paklitakselin Keşfi.....	10
1.6.3 Porsuk Ağacından Paklitaksel'in Saflaştırılması.....	10
1.7 FINDIK (CORYLUS AVELLANA) SERT KABUĞU YAPISI VE PAKLİTAKSEL (1) GÖZLENMESİ.....	11
1.8 KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE PAKLİTAKSEL (1) TAYİNİ KRONOLOJİSİ.....	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
3.1 NORMAL FAZ KOLON UYGULAMALARI.....	20
3.1.1 SİLİKA 60 KOLON UYGULAMALRIVE HPLC ANALİZ SONUÇLARI.....	20
<i>3.1.1.1 Aseton/ Hekzan (35:65) Denemesi (İzokratik Yöntem).....</i>	<i>20</i>
<i>3.1.1.2 Aseton/ Hekzan (35:65) Denemesi (İzokratik Yöntem, İç Standart Eklenmesi).....</i>	<i>21</i>

3.1.1.3 Aseton/ Hekzan Denemesi (Gradient Yöntem).....	26
3.1.1.4 Aseton/ Hekzan Denemesi (Gradient Yöntem).....	29
3.1.1.5 DCM/ Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)	31
3.1.1.6 Aseton/ DCM Denemesi (Gradient Yöntem).....	33
3.1.1.7 Etilasetat/ Hekzan Denemesi (İzokratik Yöntem)	37
3.1.1.8 Etilasetat/ Hekzan Denemesi (Gradient Yöntem)	38
3.1.2 SİLİKA 30 KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI	41
3.1.2.1 DCM: Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)	41
3.1.2.2 Aseton: Hekzan Denemesi (İzokratik Yöntem).....	42
3.1.2.3 Aseton: Hekzan 0,1ml - 1 ml Ekstereli Deneme (İzokratik Yöntem).....	46
3.1.3 FLORİSİL KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI	51
3.1.3.1 Etilasetat: Hekzan Deneme (İzokratik Yöntem).....	51
3.1.3.2 DCM: Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)	53
3.1.3.3 Aseton: Hekzan Denemesi (İzokratik Yöntem).....	54
3.1.4 ALUMİNYUM OKSİT KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI.....	60
3.1.4.1 DCM: Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)	60
3.1.4.2 Etilasetat: Heksan Denemesi (İzokratik Yöntem)	61
3.2 TERS FAZ KOLON UYGULAMALARI	62
3.2.1 C8 KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI ...	62
3.2.1.1 Aseton: Toluen Denemesi (İzokratik Yöntem)	62
3.2.1.2 Metanol: Su Denemesi (İzokratik Yöntem)	63
3.2.2 C18 KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI .	65
3.2.2.1 Aseton: Toluen Denemesi (İzokratik Yöntem)	65
3.2.2.2 Aseton: Toluen Denemesi (İzokratik Yöntem)	67
3.2.2.3 Metanol: Su Denemesi (İzokratik Yöntem)	68
4. SONUÇ VE ÖNERİ	70
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1 Vinblastin.....	4
Şekil 1.2 Vinkristin.....	4
Şekil 1.3 Vindesin.....	5
Şekil 1.4 Topotekan.....	5
Şekil 1.5 Paklitaksel (1).....	5
Şekil 2.1 Optimize ekstraksiyon koşulunun belirlenmesi.....	16
Şekil 2.2 Kromatografik çalışma genel şeması.....	17
Şekil 2.3 Standartlar kromatogramı (paklitaksel, sefalomannin, bakkatin III ve 10-deasetil bakkatin III) HPLC kromatogramı.....	19
Şekil 3.1 1 nolu (pembe), 5 nolu (mavi), 16 nolu (kahverengi), 25 nolu (lacivert), 30 nolu (koyu sarı), 37 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	21
Şekil 3.2 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (siyah- 4 nolu fraksiyon; mavi- 5 nolu fraksiyon; pembe- standart).....	22
Şekil 3.3 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (siyah- 5 nolu fraksiyon; mavi- 6 nolu fraksiyon; pembe- standart).....	23
Şekil 3.4 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (mavi- 6 nolu fraksiyon; kahverengi- 5 nolu fraksiyon; pembe- standart).....	23
Şekil 3.5 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (mavi- 7 nolu fraksiyon; yeşil- 8 nolu fraksiyon; pembe- standart).....	24
Şekil 3.6 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (kahverengi- 8 nolu fraksiyon; siyah- 9 nolu fraksiyon; pembe- standart).....	24
Şekil 3.7 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (kahverengi- 8 nolu fraksiyon; siyah- 9 nolu fraksiyon; mavi- 10 nolu fraksiyon; pembe- standart).....	25
Şekil 3.8 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (mavi- 10 nolu fraksiyon; siyah- 15 nolu fraksiyon; pembe- standart).....	25
Şekil 3.9 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (siyah- 4 nolu fraksiyon; mavi- 15 nolu fraksiyon; standart gelmeden önceki ve standart geçtikten sonraki kromatogram kıyaslamansı).....	26
Şekil 3.10 7 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	27
Şekil 3.11 15 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	28
Şekil 3.12 23 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	28
Şekil 3.13 28 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	29
Şekil 3.14 35 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	29
Şekil 3.15 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	30
Şekil 3.16 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	31
Şekil 3.17 3 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	31

Şekil 3.18 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	32
Şekil 3.19 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	32
Şekil 3.20 3 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	33
Şekil 3.21 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	34
Şekil 3.22 6 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	34
Şekil 3.23 8 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	35
Şekil 3.24 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	35
Şekil 3.25 6 nolu (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	36
Şekil 3.26 8 nolu (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	36
Şekil 3.27 34 nolu (pembe), 35 nolu (mavi), 36 nolu (kahverengi), 38 nolu (yeşil), 40 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	37
Şekil 3.28 41 nolu (pembe), 42 nolu (mavi), 43 nolu (kahverengi), 45 nolu (yeşil), 48 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	38
Şekil 3.29 56 nolu (pembe), 60 nolu (mavi), 61 nolu (kahverengi), 63 nolu (yeşil), 64 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	39
Şekil 3.30 56 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	40
Şekil 3.31 60 nolu (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	40
Şekil 3.32 63 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	41
Şekil 3.33 64 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	41
Şekil 3.34 1 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	42
Şekil 3.35 1 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	43
Şekil 3.36 1 nolu metanolle viallenen (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	43
Şekil 3.37 1 nolu (siyah), metanolle viallenmiş 1 nolu (mavi) eluantların ve standart bileşiklerin (mavi) HPLC kromatogramları.....	44
Şekil 3.38 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları. kodlu fraksiyon kromatogramı.....	44
Şekil 3.39 2 nolu metanolle viallenen (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	45
Şekil 3.40 2 nolu (siyah), metanolle viallenmiş 2 nolu (mavi) eluantların ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	45
3.41 1 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	46
Şekil 3.42 1 nolu (pembe), 2 nolu (mavi), 3 nolu (kahverengi), 4 nolu (yeşil), 5 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	46
Şekil 3.43 1 nolu (pembe), 2 nolu (mavi), 3 nolu (kahverengi), 4 nolu (yeşil), 5 nolu	

(lacivert), 6 nolu (koyu sarı), 7 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	47
Şekil 3.44 8 nolu (pembe), 9 nolu (mavi), 10 nolu (kahverengi), 11 nolu (yeşil), 12 nolu (lacivert), 13 nolu (koyu sarı), 14 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	47
Şekil 3.45 15 nolu (pembe), 16 nolu (mavi), 17 nolu (kahverengi), 18 nolu (yeşil), 19 nolu (lacivert), 20 nolu (koyu sarı), 21 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	48
Şekil 3.46 22 nolu (pembe), 23 nolu (mavi), 24 nolu (kahverengi), 25 nolu (yeşil), 26 nolu (lacivert), 27 nolu (koyu sarı) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	48
Şekil 3.47 28 nolu (pembe), 29 nolu (mavi), 30 nolu (kahverengi), 31 nolu (yeşil), 32 nolu (lacivert), 33 nolu (koyu sarı), 34 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	49
Şekil 3.48 35 nolu (pembe), 36 nolu (mavi), 37 nolu (kahverengi), 38 nolu (yeşil), 39 nolu (lacivert), 40 nolu (koyu sarı), 41 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	49
Şekil 3.49 42 nolu (pembe), 43 nolu (mavi), 44 nolu (kahverengi), 45 nolu (yeşil), 46 nolu (lacivert), 47 nolu (koyu sarı), 48 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	50
Şekil 3.50 49 nolu (pembe), 50 nolu (mavi), 51 nolu (kahverengi), 52 nolu (yeşil), 53 nolu (lacivert), 54 nolu (koyu sarı) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	50
Şekil 3.51 3 nolu (pembe) eluanın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	51
Şekil 3.52 7 nolu (pembe) eluanın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	51
Şekil 3.53 10 nolu (pembe) eluanın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	52
Şekil 3.54 13 nolu (siyah) eluanın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	52
Şekil 3.55 15 nolu (mavi) eluanın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	53
Şekil 3.56 10 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	53
Şekil 3.57 10 nolu metanolle viallenen (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.	54
Şekil 3.58 Aseton:Hekzan 10 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.	55
Şekil 3.59 Aseton: Hekzan 10 nolu metanolle viallenen (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.	55
Şekil 3.60 55 nolu (pembe), 57 nolu (kahverengi), 58 nolu (yeşil), 59 nolu (lacivert), 60 nolu (koyu sarı), 61 nolu (gri) 10 nolu (siyah) eluanlatların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	56
Şekil 3.61 62 nolu (pembe), 63 nolu (mavi), 64 nolu (kahverengi), 65 nolu (yeşil), 66 nolu (lacivert), 67 (koyu sarı), 68 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	56
Şekil 3.62 69 nolu (pembe), 70 nolu (mavi), 71 (kahverengi), 72 nolu (yeşil), 73 nolu (lacivert), 74 nolu (koyu sarı), 75 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	57

Şekil 3.63 76 nolu (pembe), 77 nolu (mavi), 78 nolu (kahverengi), 79 nolu (yeşil) 10 eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	57
Şekil 3.64 80 nolu (pembe), 81 nolu (mavi), 82 nolu (kahverengi), 83 nolu (yeşil), 84 nolu (lacivert), 85 nolu (koyu sarı), 86 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	58
Şekil 3.65 87 nolu (pembe), 88 nolu (mavi), 89 nolu (kahverengi), 90 nolu (yeşil), 91 nolu (lacivert), 92 nolu (koyu sarı), 93 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	58
Şekil 3.66 94 nolu (pembe), 95 nolu (mavi), 96 nolu (kahverengi), 97 (yeşil), 98 (lacivert), 99 nolu (koyu sarı), 100 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	59
Şekil 3.67 101 nolu (pembe), 102 nolu (mavi), 103 nolu (kahverengi), 104 nolu (yeşil), 105 nolu (lacivert), 106 nolu (koyu sarı) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	59
Şekil 3.68 10 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	60
Şekil 3.69 10 nolu metanolle viallenen (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.	61
Şekil 3.70 69 nolu (pembe), 72 nolu (mavi), 74 nolu (kahverengi), 76 nolu (yeşil), 77 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	61
Şekil 3.71 80 nolu (pembe), 82 nolu (mavi), 85 nolu (kahverengi), 88 nolu (yeşil), 90 nolu (lacivert), 93 nolu (koyu sarı), 96 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.	62
Şekil 3.72 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	63
Şekil 3.73 3 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	63
Şekil 3.74 1 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	64
Şekil 3.75 2 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	64
Şekil 3.76 4 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	65
Şekil 3.77 6 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.....	65
Şekil 3.78 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	66
Şekil 3.79 2 (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.	67
Şekil 3.80 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	68
Şekil 3.81 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	68
Şekil 3.82 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	69
Şekil 3.83 5 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.....	69

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1 Kemotröpic ajan sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2 Alkaloid örnekleri	7
Çizelge 1.3 Bitkisel ilaçlar	9
Çizelge 1.4 Paklitaksel tayin ve elde çalışmaları.....	10
Çizelge 2.1 Stok çözelti verim (ppm)- saflık (%) değerleri.....	18
Çizelge 3.1 Aseton/ heksan denemesi geri kazanım (ppm) değerleri.....	20
Çizelge 3.2 İç standart eklenmesi ile elde edilen geri kazanım (ppm) değerleri.....	22
Çizelge 3.3 Aseton/ hekzan gradient denemesi ile elde edilen geri kazanım (ppm) değerleri.....	27
Çizelge 3.4 Aseton/ hekzan gradient yöntem birleştirilmiş fraksiyon geri kazanım (ppm) değerleri.....	30
Çizelge 3.5 Aseton/ diklorometan gradient yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.....	34
Çizelge 3.6 Etilasetat/ hekzan gradient yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.....	37
Çizelge 3.7 Etilasetat/ hekzan gradient yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.....	39
Çizelge 3.8 Aseton/ toluen izokratik yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.....	62
Çizelge 3.9 Aseton/ toluen izokratik yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.....	66
Çizelge 3.10 Aseton/ toluen izokratik yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.....	67

KISALTMALAR

A	Aseton
ATM	Atmosfer basıncı
B	Bakkatin III
BMS	Bristol Mayer Squibb
C	Karbon
Ceph	Sefalomannin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DCM	Diklorometan
G	Gram
H	Hekzan
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer)
M-fazı	Mitozis
ml	Mililitre
M.Ö.	Milattan Önce
N	Azot
NCCAM	National Center for Complementary and Alternative Medicine
NCI	Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü
nm	Nanometre
RNA	Ribonükleoik asit
Rp	Ters Faz (Revers Phase)
S	Kükürt
STD	Standart
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
10-DAB III	10 deasetil bakkatin III

ÖZET

FINDIK KABUĞUNDAN PAKLİTAKSEL SAFLAŞTIRILMASI

Elif Sine AKSOY
Düzce Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Şubat 2017, 78 sayfa

Kalp hastalıklarından sonra dünya genelinde yaygın olan ve ölümlü sonuçlanan hastalıklardan biri olan kanser günümüz sağlık problemlerinin başında geldiği, yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır. Birçok tedavi şekli olan kanser hastalığında en çok kullanılan yöntem kemoterapidir ve bu yöntem için çok sayıda ilaç geliştirilmiştir. Çalışmamızda bunlardan biri olan paklitaksel üzerine izolasyon çalışmaları amaçlanmıştır. Paklitakselin fındık kabuğundan izolasyonu kromatografik saflaştırma çalışmaları; farklı çözücüler ve farklı kolon dolgu maddeleri kullanarak ters faz ve normal faz kolon uygulamaları yapılarak optimizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Paklitakselin fındık kabuğunda varlığı yapılan analizlerle kanıtlanmıştır. Denemelerde olumlu, olumsuz ve geliştirilebilecek durumlar belirlenmiştir. Fındık kabuğunda; önemli bir anti kanser ilacı olan paklitakselin varlığı bize ülkemizde oldukça fazla üretilen ve sürekliliği olan aynı zamanda çoğunlukla atık olarak kullanılan kabuğun çok daha değerli hale getirilebileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Kromatografi, Fındık kabuğu, Paklitaksel.

ABSTRACT

ISOLATION OF PACLITAXEL FROM NUT SHELL

Elif Sine AKSOY

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

February 2017, 78 pages

Cancer, one of the most common and fatal diseases worldwide after heart disease, has proven to be the leading health problems nowadays. Chemotherapy is the most commonly used method of cancer therapy in many forms of therapy and many chemotherapeutic agents have been developed for this method. In our study, the aim is to study isolation of paclitaxel, which is one of the chemotherapeutic agents. Paclitaxel was isolated from hazelnut shells by isolation and chromatographic purification using different solvents and different column filling materials. Optimization experiments were carried out by reverse phase and normal phase column applications in refinement processes. Paclitaxel has been proven by analysis of its presence in hazelnut shells. Positive, negative and improvable situations were determined in the experiments. In hazelnut shell; the presence of paclitaxelin, an important anti-cancer drug, has shown us that the shell, which is often produced and sustained in our country as well as being mostly used as waste, can also be made much more valuable.

Keywords: Choromotography, Nut shell, Paclitaxel.

1. GİRİŞ

1.1 GENEL BİLGİLER

İnsanlık, tarih boyunca pek çok ölümcül hastalıkla karşı karşıya kalmıştır. Kanser de günümüzde yaygın ve öldürücü etkisi yüksek olan hastalıklardan birisidir. Başta kalp-damar hastalıkları bulunmakla beraber sonrasında kansere bağlı ölümler yer almaktadır [1]. Amerikan Kanser Topluluğu'na göre sadece Amerika'da tahmini 1,5 milyon yeni kanser vakası bulunmaktadır. Bunun yanında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2008 yılında kanser temelli ölümlerin tüm ölümler içerisinde %13' lük paya sahip olarak kanserin dünya çapında ciddi bir hastalık olduğunu göstermiş oldu [2].

1.2 KANSER NEDİR ?

Kanser hastalığıyla ilgili ilk kanıtlara Eski Mısır dönemindeki mumyalarda rastlandığı saptandı. O dönemdeki kanserli hastalara tedavi yöntemi olarak ise kanserli bölgeyi yakma işlemini uyguladıkları gözlemlendi. M.Ö. 300'lü yıllara gelindiğinde ise ilk defa kanser tanım olarak Hipokrat tarafından kullanıldı. Tedavisi üzerinde zorlandığı ve farklı görünümdeki şişliklere 'karkinos' adını verdi [3], [4]. Günümüzde kullandığımız kanser adı ise ilk olarak Hipokrat'tan sonra gelen ve tıp dünyasına büyük katkıları olan Galenos tarafından kullanıldı. Galenos hastalığın yayılımını ve şeklini yengece benzetmiştir dolayısıyla kanser olarak kullanmasının amacı ise kelime anlamı olarak yengece denk gelmesidir [4]. Türk tıp tarihine baktığımızda ise kanser seretan adı ile tanınmaktaydı [5]. Kanser, eski dönemlerden günümüze gelene kadar üzerinde araştırmaların yoğunlukla devam ettiği sayılı hastalıklardan birisidir. Günümüzde de bu hastalığın aydınlatılma çalışmalarına devam edilmektedir.

Kanser hastalarının hücrelerde kontrolsüz bir şekilde çoğalma gözlenir ve tümörler oluşur. Bu çoğalma sırasında hastalıklı hücrelerde normal hücrelere göre yapısal farklılıklar gösterir [6].

Genellikle genetik sebeplerden dolayı oluşan bu tümör komşu hücrelere etki ederek yok etme özelliğini gösterir. Metastaz yoluyla diğer dokulara da yayılarak öldürücü etkisini gösterebilir [7]. Adı konulan, tanısı ve tedavisi üzerinde çalışmaları devam eden birçok kanser türü vardır. Başlıcaları; akciğer, kolon, meme, prostat, rahim, over, cilt, bağırsak, böbrek, mide kanseri ve beyin tümörleridir.

Hücrelerdeki mutasyona sebep olan birçok etken vardır ve kanser oluşumu basamaklı bir olgudur. Kalıtım, yetersiz beslenme, mikroplar, alkol tüketimi, güneşten yayılan ışınlar, hareketsizlik, alkilleyici ajanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sigara, nitrozaminler, azo boyaları, asbest, krom, nikel, benzen, RNA (Ribonükleik asit) virüsleri, DNA (Deoksiribonükleik asit) virüsleri bu sebeplerden sadece birkaçıdır [8].

1.3 KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Kanser hastalıkları tedavisinde günümüzde uygulanan birçok yöntem vardır. Tedavi yönteminin seçimi ve doğru yöntemin uygulanabilmesi için tanı önemli maddelerden birisidir. Tanı süreci hastanın bazı rahatsızlıklarından dolayı doktor muayenesine ihtiyaç duymasıyla başlar. Tanı ve evreleme oldukça önemlidir. Konulan tanı ve belirlenen evre sonrasında tedavi gereksinimleri belirlenir. Tanı yöntemleri arasında hastanın öyküsünün dinlenmesi, fiziki muayene, görüntüleme yöntemleri (ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, mamografi, pozitron emisyon tomografisi vb.), tümör belirleyicileri, kan sayımları, biyokimyasal analizler, vardır. Klinik, patolojik laboratuvar ve tanısal veriler incelenir uygun görülen tedavi yöntemi seçilir ve tedavi başlanır [8].

Kanser, evresi belirlenmesi tedavi seçiminde ve izlenecek yolda en önemli basamaklardan birisidir. Evreleme işlemi TNM sistemi olarak adlandırılır ve üç önemli başlık vardır [9] :

1.T: Başlangıç tümör evresi

2.N: Bölgesel lenf nodları yayılımı

3.M: Diğer bölgelere yayılımı [10].

Kanser tedavi yöntemleri üzerine geçmişten günümüze birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Bunlardan başlıcaları; cerrahi yöntemler, kemoterapi olarak bilinen ilaç tedavileri ve ışın tedavisidir. Tümörlü hücrelere öncelikle cerrahi işlemler uygulanır bunun yanında gerekli görüldüğünde radyasyon tedavisi sayesinde hastalıklı hücreler azaltılır. Devamında kemoterapi, immunoterapi yöntemlerine başvurulur [11]. Bu yöntemlerin içerisinde en etkilisi ve en çok kullanılan yöntem kemoterapidir. Alman kimyager Paul Ehrlich bulaşıcı hastalıkların tedavisi üzerine 1900'lerde çalışmalar yürütüyordu. Kemoterapinin icadında büyük rol üstlendi. Hastalığa karşı hayvanlar üzerinde bir dizi kimyasalın potansiyel aktivitesini araştırdı ve kanser ilacı geliştirme adına ilk adımları büyük ölçüde katetti [12], [13].

1.4 KEMOTERAPİ YÖNTEMİ VE KULLANILAN İLAÇLAR

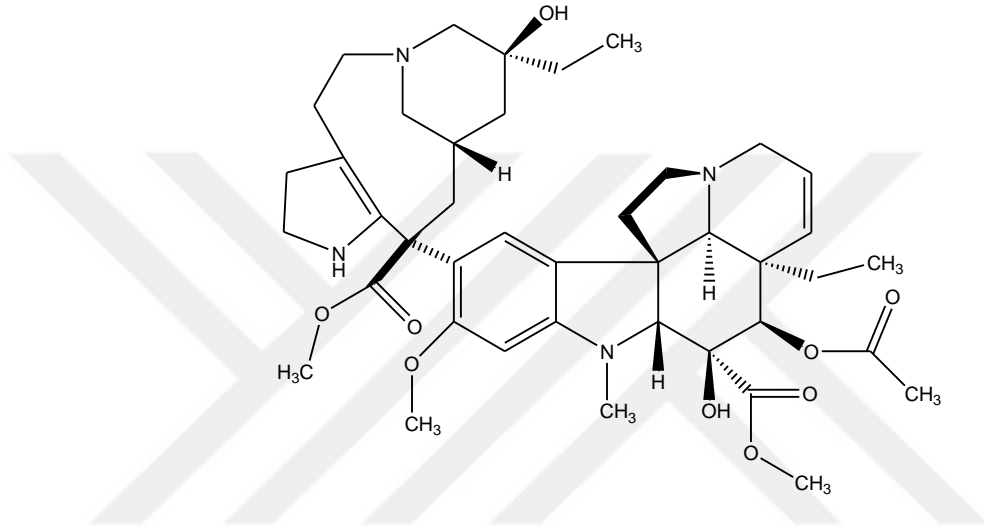
Kemoterapide doğal yapılı veya sentetik anti-kanser ilaçları kullanılarak kanser hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasının engellenmesi amaçlanır. Bu tip ilaçlara sitotoksik (kemoterapötik) ilaç denir. Kemoterapinin en önemli özelliği metastaz durumlarında uygulanabilmesidir. Bu tedavinin tam amacı tümörlü hücrenin gelişimini yavaşlatmak ve yayılmasını engellemektir [14].

Kemoterapi yönteminde kullanılan birçok ilaç vardır. Çeşit bakımından sentetik veya doğal ürün destekli çok sayıda ilaç bulunmaktadır. Alkilleyici ilaçlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, vinka alkaloidler ve doğal kaynaklı ürünler olmak üzere sınıflandırılabilir [15]. Bunlardan bazıları sisplatin, karboplatin, metotreksat, mitomisin, streptozosin, siklosporin vb.'dir [16].

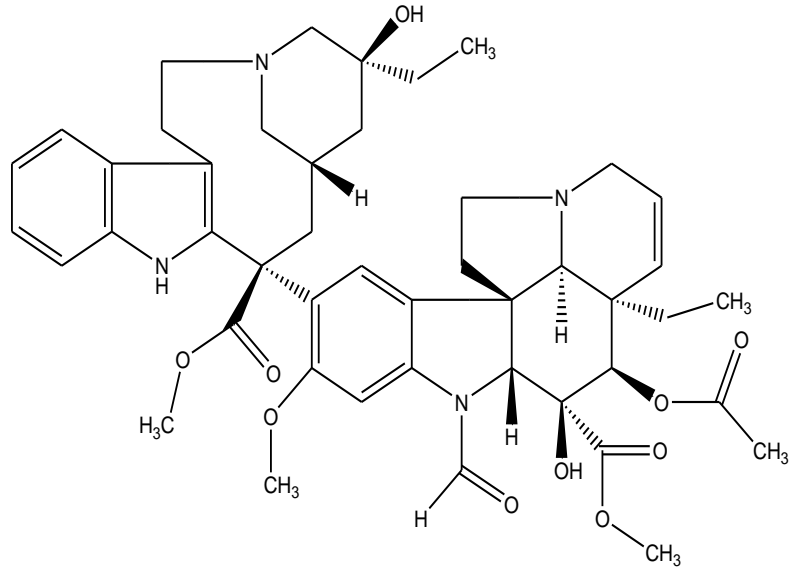
Çizelge 1.1 Kemotröfik ajan sınıflandırılması [11], [17].

SINIF	KEMOTRÖPİK AJANLAR
Alkilleyici ajanlar	Busulfan, sisplatin, karboplatin, tiyotepa, ifosfamide
Antimetabolitler	Sitarabin, kapasitabin, metotreksat, floksiridine,
AntitümörAntibiyotikler	Bleomisin, daktinomisin, doksorubisin
Nitrosurealar	Karmustine, lomustin, semustin, streptozosin
Vinka (Bitki) Alkaloidleri	Vinblastin, vinkristin, topotekan, paclitaksiel, dosetaksiel
Hormonlar	Androjen, östrojen, östrojen antagonistler

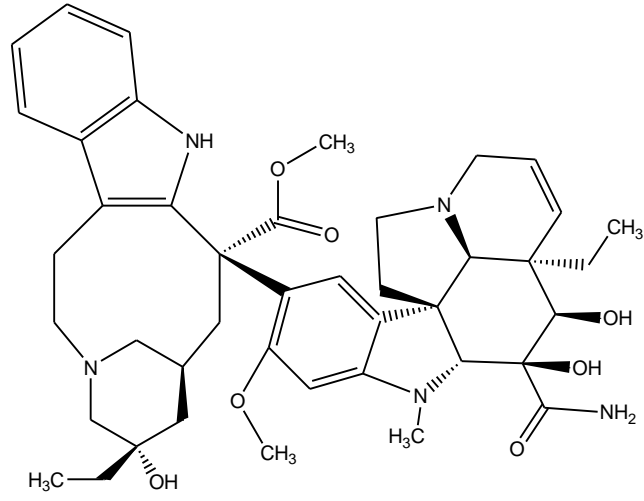
Kemoterapötik ilaçlar döngüye özgü ve döngüye özgü olmayanlar olarak ayrılır. Çoğalmakta olan hücreler için döngüye özgü ilaçlar kullanılır. Büyüme hızı yavaş olan tümörler için ise döngüye özgü olmayan ilaçlar kullanılır. Tedavide kullanılan ilaçların farklı etki mekanizmaları bulunmaktadır. Bir kısım ilaç DNA fonksiyonlarını bozarak etki gösterirken başka bir kısım ilaç ise hormon uyarısı yöntemiyle sitoplazmik reseptörlere bağlanır ve kanserin büyüme hızını düşürür. Bunların yanında nükleofilik gruplarla kovalent bağ yaparak etki eden ilaçlar ve mikrotübüllerin polimerize-depolimerize arasındaki dengeyi bozarak etki eden ilaçlar da bulunmaktadır [11].



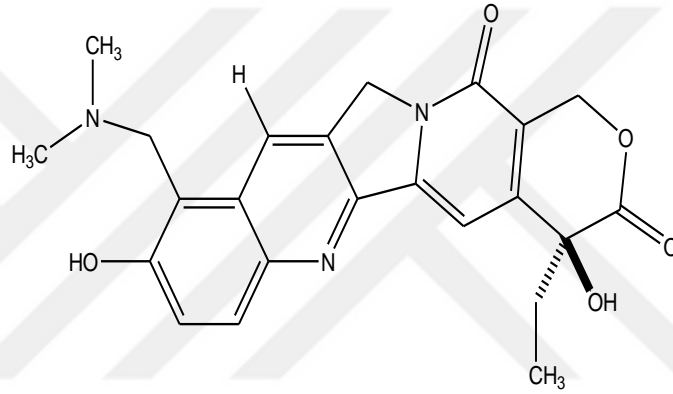
Şekil 1.1 Vinblastin.



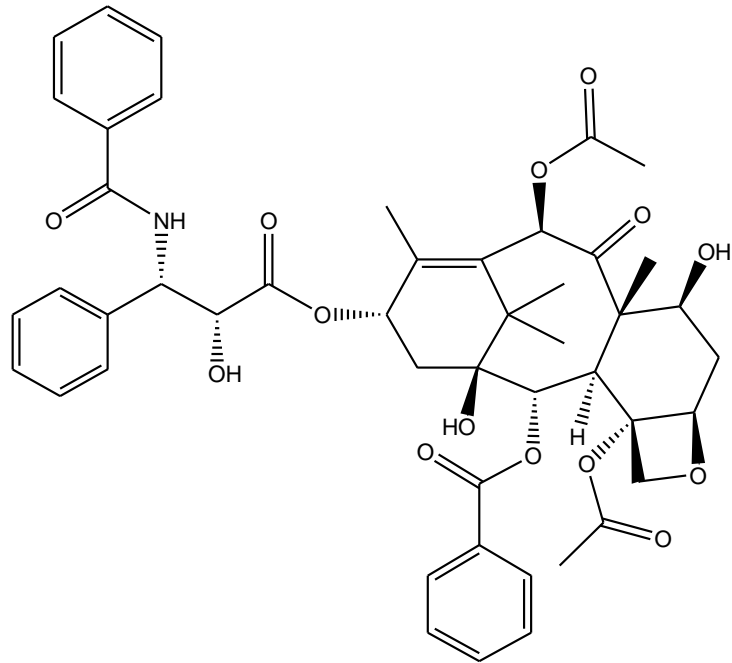
Şekil 1.2 Vinkristin.



Şekil 1.3 Vindesin.



Şekil 1.4 Topotekan.



Şekil 1.5 Paklitaksel (1).

1.5 ALKALOİDLER

Sertüner 1805 yılında afyon bitkisinden morfin izolasyonu yapmıştır ve bu izolasyonla alkaloidler araştırılmaya başlanmıştır. Alkaloid adı alkalimsi anlamına gelir ve 1819'da Meissner alkali benzeri bu azotlu bileşikler alkaloid olarak isimlendirmiştir [17].

Alkaloidler genellikle bitkilerden elde edilir. Bunun yanında hayvansal kaynaklı olan alkaloidler de mevcuttur fakat sayısal olarak azdır. Kimyasal yapılarında bir azot atomu bulunduran alkaloidlerin insanlar üzerinde belli fizyolojik etkileri vardır. Günlük hayatta çokça duyduğumuz morfin, kafein, kokain, efedrin, nikotin vb. yapılar alkaloidler sınıfında yer alırlar [18].

Bu sınıfın çoğu renksiz, kristalik yapılı ve uçucu olmayan katılardan meydana gelmektedir bunun yanında nikotin gibi az bir kısmı sıvıdır. Suda çözünmezler, organik çözücülerde çözünürlükleri iyidir ve çoğu optikçe aktif maddelerdir. Alkaloidlerin çoğu tedavi amaçlı kullanılır ve bu yüzden ilaç üretiminde önemli yer kaplarlar. Bunların yanında oldukça zehirlidirler [18].

Alkaloidler özellikle biyoloji, tıp, kimya alanlarında incelenmiştir. Doğal bileşikler sınıfındadırlar ve moleküller karmaşık yapıya sahiptir. Çoğu optikçe aktiftir ve birden fazla asimetric merkeze sahiptirler. Üretimi canlı organizmalar tarafından yapılır. Yeryüzüne dağılımları oldukça fazladır. Alkaloid sınıfının büyük çoğunluğu ilaç olarak kullanılır [19].

Çizelge 1.2 Alkaloid örnekleri [20].

ADI	KAYNAĞI
Akonitin	<i>Aconitum napellus</i>
Ajmalin	<i>Catharanthus roseus</i>
Atropin	<i>Atropa belladonna</i>
Berberin	<i>Berberis vulgaris</i>
Boldin	<i>Peumus boldo</i>
Kafein	<i>Coffea spp.</i> , <i>Cola spp.</i>
Kokain	<i>Erythroxylon coca</i>
Kodein	<i>Papaver somniferum</i>
Kolşisin	<i>Colchicum autumnale</i>
Emetin	<i>Cephaelis acuminata</i>
Efedrin	<i>Ephedra sinica</i>
Lobelin	<i>Lobelia inflata</i>
Morfin	<i>Papaver somniferum</i>
Narsein	<i>Papaver somniferum</i>
Nikotin	<i>Nicotiana spp.</i>
Noskapines	<i>Papaver somniferum</i>
Papaverin	<i>Papaver somniferum</i>
Paklitaksel	<i>Taxus brevifolia</i>
Vinblastin	<i>Catharanthus roseus</i>
Vinkamin	<i>Vinca minör</i>
Vinkristin	<i>Catharanthus roseus</i>

Aynı tür bitkilerde yüksek veya düşük olacak şekilde alkaloidler bulunur [20]. Alkaloidleri sınıflandırırken heterosiklik sistemlere bakılır. Kimyasal yapılarına bakılarak sınıflandırma yapılırken halkalar ve bağlı gruplar dikkate alınır [17], [18].

Çizelge 1.2' de gösterildiği gibi birçok alkaloid örneği vardır. Kanser tedavilerinde kullanılmalarından dolayı önemli yere sahip olan alkaloidler mevcuttur. Örneğin *Catharanthus roseus* bitkisinden izole vinkristin eldesi veya *Taxus brevifolia*'dan izole paklitaksel (**1**) eldesi ile kanser tedavisinde önemli olan bu ilaçlar alkaloid sınıfı bitkilerinden izole edilmiştir [19].

1.5.1 Bitkisel Alkaloidler

1.5.1.1 Vinka Alkaloidleri

Vinka alkaloid grubundaki antineoplastik ilaçlar genelde önceleri *Vinca rosea* diye bilinen Cezayir menekşesi bitkisinden elde edilmişlerdir. Çizelge 1.2' de gösterildiği gibi kemotröpatik ilaçlar arasında vinka alkaloidleri de bulunmaktadır. Örneğin; vinkristin ve vinblastin heterosiklik yapılı vinka alkaloidleridir [17]. Bu ilaçlar M-faza yani mitozis fazına özgüdürler. Görevleri tübiline bağlanarak mikrotübül polimerizasyonunu inhibe etmektir [21]. Mitoz dönemine bu özgü ilaçlardır ve DNA yapısını veya sentez bölümünü bozmazlar. Bunların yanında bu ilaçların nörotoksit tesirleri de vardır [17].

1.5.1.2 Taksanlar

Paklitaksel (1) ve yarı sentetik olarak üretilen dosetaksel taksan grubu bitkisel kaynaklı ilaçlardır. Paklitaksel porsuk ağacı kabuğundan ve yapraklarından izole edilerek kanser tedavisinde kullanılan ilaç türüdür. Taksanlar diterpenoid sınıfında yer alırlar. Vinka alkaloidlerinde olduğu gibi bu tip ilaçlar da M- faza özgüdürler. Vinka alkaloidlerin askine mikrotübül polimerizasyonunu artırırılar. Depolimerizasyonu engelleyerek tubilin-mikrotübül dengesini bozarlar. Taksanlar suda çözünmezler ve genellikle renksizlerdir [22].

Bitki özelliklerine bakıldığında birincil ve ikincil olarak ayrılırlar. Birincil metabolitler hücre metabolizmasına doğrudan katılır ve doğada yaygın bulunur. Örnek olarak karbonhidrat, yağ, protein verilebilir. İkincil metabolitler ise alkaloid, terpenoid, fenolik grupları kapsamaktadır. Özellikleri ise böcek, mikroorganizma vb. durumlara karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynar. Her bitkide farklı özellikler gösteren ikincil metabolitlerin sitotoksik etkilerine bakıldığında bir çoğunun antimikrobiyal madde olarak kullanıldığı gözlenmiştir. Taksanlar alkaloid grubu bileşikleri olduklarından dolayı ikincil metabolit sınıfında yer alırlar [23], [24].

1.6 DOĞAL ÜRÜNLER

1.6.1 Bitkisel Kökenli İlaç

Tedavi amacıyla kullanılan bitkileri doğal ürünler sınıfında olarak görebiliriz ve bitkilerle tedavi yöntemlerine baktığımızda tarihte çok gerilere gidebiliriz. Bu durum antik çağdan günümüze hızla gelişerek gelmiştir. Mısır, Hitit, Yunan, Roma, Selçuklu ve Osmanlı vb. birçok medeniyet tedavi amacıyla bitkisel ilaçlara oldukça önem vermiştir. Bu sayede bitkisel kaynaklı ilaçların gelişi sağlanmıştır. Biyokimya alanındaki bu gelişmeler sayesinde ilaç sanayii büyük bir hızla gelişmiştir. Farmakolojik ve klinik çalışmalar sonucu laboratuvarlarda tıbbın tedavi ihtiyacını karşılayabilecek ilaçlar üretilmiştir [25]. Günümüzde kullanılan ilaçların %25'inin bitkisel köken içerdiği tahmin edilmektedir [26].

Çizelge 1.3 Bitkisel ilaçlar [27].

Yıl	İlaç	Kaynağı	Kullanım Alanı	Şirket
1826	Morfin	Doğal Bileşiklerden	Analjezik	E.Merck
1899	Aspirin	Analoğundan sentezlenerek	Analjezik	Bayer
1941	Penisilin	Doğal Bileşiklerden	Antibakteriyel	Merck
1964	Sefalosporin	Türevlerinden yarı sentetik	Antibakteriyel	Lilly
1983	Siklosporin A	Doğal Bileşiklerden	Bağışıklık sistemi destekleme	Sandoz
1987	Artemisinin	Doğal bileşiklerden	Sıtma ilacı	Baiyunshan
1987	Lovastatin	Doğal Bileşiklerden	Lipid düşürme	Merck
1988	Simvastatin	Türevlerinden yarı sentetik	Lipid düşürme	Merck
1989	Provastatin	Türevlerinden yarı sentetik	Lipid düşürme	Sankyo/BMS
1990	Akarbose	Doğal Bileşiklerden	Anti-diyabetik	Bayer
1993	Paklitaksel	Doğal Bileşiklerden- yarı-sentetik	Anti-kanser	BMS
11993	FK506 (Takrolimus)	Doğal bileşiklerden	Bağışıklık sistemi destekleme	Fujisawa
1994	Fluvastatin	Analoğundan sentezlenerek	Lipid düşürme	Sandoz
1995	Dosetaksel (Taksoter)	Yarı sentetik	Anti-kanser	Rhône-PR
1996	Topotekan Irinotekan	Yarı sentetik	Anti-kanser	SKB, Pharmacia & Upjohn
1996	Miglitol	Analoğundan sentezlenerek	Anti-diyabetik	Bayer

1.6.2 Doğal Ürünlerde Taksanların Varlığı ve Paklitakselin Keşfi

Taksanlar taksus familyası üyesi olan porsuk ağacından izole edilen diterpenlerdir. Binlerce bitki ekstraktının anti kanser özelliği gösterip göstermediği NCI tarafından incelenmiştir. Taksanlar da bu incelenen grup içerisinde [28]. Yapılan çalışmalarla taksanların biyolojik aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Alman bir eczacı olan Lucas taksanlar üzerine çalışmalar yapmıştır. 1856 yılında başladığı çalışmada bu metabolitlerin karakterizasyonları üzerinde durmuştur fakat o yıllardaki fiziksel şartlardan ötürü çalışması uzun bir süreç almıştır. Yaptığı yapı analizleri sonucunda bunlara Taksin (Taxine) adını vermiştir [24], [27], [29].

Wani ve Wall 1971 yılında yaptıkları çalışmalar sonucunda paklitakseli (1) keşfetmişlerdir. Paklitakselin (1) oldukça aktif bir anti-tümör ajanı olduğunu açıklamışlardır. İlaç sektöründe oldukça değerli olabileceğini düşünen birçok bilim insanı Paklitaksel (1) üzerine çalışmaları başlatmıştır. Bu durum porsuk ağacı türünden birçok taksan tür elde edilmesini sağlamıştır [17], [24], [30].

Çizelge 1.4 Paklitaksel tayin ve elde çalışmaları [31]–[33].

YIL	BAŞARI
1856	<i>T.Baccata</i> 'dan Taksin eldesi
1971	<i>T.Bevifolia</i> 'dan elde edilen paklitakselin yapısının aydınlatılması
1974	Hücre bitki kültürü denemeleri
1979	Mikrotübüllerin mekanizmasının keşfi
1989	Klinik çalışmaların sonuçların yayınlaması
1989	Hücre süspansiyon kültürü ve <i>T.Bevifolia</i> hücre bitkisinden üretilen paklitaksel
1991	<i>T.Bevifolia</i> hücre kültüründen paklitaksel üretimi üzerine patent alınması
1992	<i>Taxus Cuspidata</i> 'dan paklitaksel eldesi
1993	Paklitaksel eldesinde patent çalışmaları devamı
1996	<i>T. Media</i> üzerine hücre kültürü çalışmaları
2002	Hücre kültüründen taksoid eldesi

1.6.3 Porsuk Ağacından Paklitaksel'in Saflaştırılması

Avrupa farmakopesine göre bitkisel ilaca uygulanan mekanik ve fiziksel işlemler vardır. Mekanik işlemin kapsamında; ufalama ve toz haline getirme vardır. Fiziksel işlemin kapsamında ise ekstraksiyon, distilasyon, sıkma, fraksiyonlama, saflaştırma fermantasyon, yoğunlaştırmadır [34].

Bitkilerden ilaç eldesinde bazı temel basamaklar vardır ki bunlardan en önemlisi bitki ekstresinin hazırlanmasıdır. Öncelikle bitki örneği gölgede kurutulur. Etki yüzeyini artırmak amacıyla kurutulan bitki ufalanarak toz haline getirilir. Ekstre işleminin önemli basamaklarından birisi uygun ekstraksiyon koşullarının ve yönteminin belirlenmesidir [35], [36]. Ekstraksiyon işlemi sonrasında genellikle evaporasyon ile bitki ekstresi toz halinde ya da şurup halinde elde edilir.

Paklitaksel (1) çizelge 1.4'te gösterildiği gibi yıllar içerisinde gelişim etkili bir gelişim göstermiştir. Paklitakselin (1) saflaştırılmasında ilk olarak *T. Beviifolia*'dan elde edilmiştir. Pasifik porsuk ağacı olarak adlandırılan *T. Beviifolia*'dan Paklitaksel eldesinin yanında Avrupa Porsuğundan (*T. baccata*) taksol türevi olan bakkatin III elde edilir [27], [28], [32].

Porsuk ağacı yapısal farklılıklar içerecek şekilde dünyanın farklı bölgelerinde bulunmaktadır. 20 metre uzunluğa sahip türleri bulunduğu gibi çalı formuna da rastladığımız bu tür ülkemizde de bulunmaktadır. Gövde kabukları kızıl kahvedir ve kabuğun çatlayarak dökülme özelliği vardır [37]. Bu familyadaki ağaçlar uzun yıllar yaşamaktadır. Haziran ayında Zonguldak bölgesinde 4112 yaşında olduğu belirlenen *T. Baccata* türüne rastlanmıştır [38].

Porsuk ağacının yetişmesinin uzun sürmesi ve dünya üzerinde yayılımının yeterince olmamasından dolayı paklitaksel (1) sentezi için alternatif yollar aranmasının yolunu açmıştır. Hücre kültüründen paklitaksel (1) eldesi üzerine son senelerde çalışmalar yapılmıştır. Bunun yanında başka bitkilerde paklitaksel (1) incelenmiş ve adi fındık olarak bildiğimiz *Corylus avellana L.*' de varlığı tespit edilmiştir [39]–[41].

1.7 FINDIK (*Corylus avellana*) SERT KABUĞU YAPISI ve PAKLİTAKSEL (1) GÖZLENMESİ

Fındık, Fagales takımında bulunur, alt familyası *Coryleae*' dir ve *Corylus* cinsine sahiptir. Tür olarak *Corylus* için 25'ten fazla tür olduğu saptanmıştır. Dünyada Adi Fındık (*Corylus avellana L.*) olarak bilinen tür ve Türk Fındığı (*Corylus colurna L.*) ülkemizde mevcuttur. Gelişimi için Kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerini tercih etmektedir. Şubat-Mart aylarında çiçeklenme başlar, Ağustos-Eylül tohumun olgunlaşması ve toplanması başlar. Yapıları iç ve dış tehditlere göre oldukça

dayanıklıdır bu sebeple uzun yıllar yaşayabilmektedir. Bolu'da 400 yaşında olduğu belirlenen fındık ağaç anıt ağaç kategorisine girmiştir. Kuraklığa dayanma kabiliyeti yüksektir. -30°C soğuklara dayanabildiği düşünülmektedir. Ülkemizde bulunma yerleri genellikle yüksek yerler olduğu söylenebilir [42].

Yapılan bazı çalışmalarda fındık kabuğunun yapısı incelenmiş ve element içerikleri belirlenmiştir. Belirlemelere göre fındık sert kabuğunda yoğunlukla C (karbon), N (azot), O (oksijen), Hidrojen ve S (kükürt) elementleri saptanmıştır. Yüzde oranlar % C 56,34 ; % Hidrojen 5,35 ; % N 0,51 ; % S 0,01 ; % O 36,06 olacak şekilde elementel analiz sonuçları belirlenmiştir [43].

Fındık, Türkiye'nin önemli tarım ürünlerinin başında gelmektedir. Dünya fındık üretimi yüzdesine bakıldığında Türkiye'nin yüzdesel oranı dünya üretiminin çok büyük kısmını kapladığı görülmektedir [44]. Ağacın yetiştirme koşulları göz önüne alınarak hücre kültürü çalışmaları geliştirilmiştir [45]. Bunun yanında fındık sert kabuğunda porsuk ağacına göre çok az miktarda paklitaksel (1) ve türevleri gözlenmiştir. Bu durumda paklitaksel (1) üretiminde alternatif yol olacak şekilde geliştirilebilir. Porsuk ağacının yetiştirme koşullarının zorluğu ve kanser hastalığının dünya üzerindeki hızla artışı fındık kahverengi kabuğunu değerli kılabilir. Çünkü her yıl fındık kabuğu tonlarca elde edilmekte ve çok büyük bir kısmı atık olmakta veya yakıt olarak kullanılmaktadır. Gerek hücre kültürü gerekse ekstraksiyon yöntemini izleyen basamaklı saflaştırma yöntemleri sayesinde paklitaksel tayini çalışmalarına rastlanmaktadır [38]–[40], [46].

Önemli anti kanser ilaçlarından biri olan paklitakselin fındık kabuğunda varlığı yapılan bir çalışmada gün yüzüne çıkarılmıştır [46].

2004 yılında Türkiye'de 'Fındık ve Fındık Yan Ürünlerinde Fitokimyasal Maddeler ve Biyoaktif Bileşikler' adlı çalışma yapılmış ve çalışma sonucuna göre fındık sert kabuğunda paklitaksel ve türev varlığını yaptıkları tablo ile internet sitelerinde yayınlamışlardır. Fındık sert kabuğunda özellikle 10-deasetilbakkatin, sefolamannin ve paklitaksel varlığı gösterilmiştir [47].

Fındık kabuğundan taksan eldesinde bazı avantajlar ve dezavantajlar vardır. Fındık kabuğundaki taksan miktarı ve porsuk ağacındaki miktarı karşılaştırıldığında porsuk ağacında fındık kabuğuna göre daha fazla miktarda bulunduğu gözlenmiştir böylelikle bu durum dezavantaj olarak görülebilir. Bunun yanında porsuk ağacının yetiştirme

koşulları ve fındık ağacının yetiştirme koşulları kıyaslanırsa fındık ağacı kullanımını avantajlıdır hatta günümüzde çoğunlukla yakıt olarak kullanılan fındık kabukları daha değerli hale getirilmiş olacağından artı bir avantajı da bulunmaktadır. Porsuk ağacı 150-200 yıl arasında yetişen bir ağaç türü olduğu bilinmektedir [48].

2007 yılında Miele ve arkadaşları fındık bitki kültüründen taksol eldesi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada *T. baccata* ve *Corrylus Avellena* hücre kültürleri hazırlamışlar ve bu iki kültüre aynı deneysel şartları uygulayarak karşılaştırmalı olarak tayinler yapmışlardır [49].

2008 yılında Ottaggio ve arkadaşları ELİSA yöntemini kullanarak farklı lokasyonlardan toplanan fındık kabukları üzerinde çalışmalar geliştirmişler ve taksanların tayinlerini gerçekleştirmişlerdir [41].

2009 yılında Hoffman ve arkadaşları benzer çalışmalar yönetmişlerdir. Giresun bölgesinden toplanan fındıklardan elde ettikleri sert kabukları katı fazı oluşturacak şekilde hazırlamışlardır; ekstraksiyon çözücüsü olarak etanolü tercih eden Hoffman ve arkadaşları belirli saflaştırma işlemlerinden sonra LC-MS cihazı sonuçlarını yayınlamışlardır. Onların hazırlamış oldukları tabloda da fındık sert kabuğunda paklitaksel, sefalomannin ve 10-deasetil bakkatin varlığı LC-MS ile kanıtlanmıştır [40].

1.8 KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE PAKLİTAKSEL (1) TAYİNİ KRONOLOJİSİ

Cociancich ve arkadaşları bitki materyallerini *Taxus cuspidata hicksii* olarak belirlemişlerdir. Katı ekstraksiyon işlemi için çözücü olarak metanol kullanmışlardır. Devamında ekstraktı vakum altında konsantre etmişler ve kuru ekstraktı su ile seyreltmışlerdir ve sikloheksan -metilen kloridle sıvı sıvı ekstraksiyon uygulamışlardır. Organik fazı alıp tekrar vakum altında kurutmuşlardır. Oluşan ekstrakt kolona yüklencek hale getirmişlerdir. Kolon dolgu maddesini silika jel ve elüentleri sikloheksan: etil asetat (7: 3) olarak belirlemişlerdir [50].

Ramados ve arkadaşları *Taxus baccata* yapraklarını toz haline getirip oda sıcaklığında metanol ile 12 saat boyunca ekstrakte olmasına karar vermişlerdir. Kromatografik saflaştırma basamakları için kolon dolgu maddesini silika ve elüentleri ise heksan

aseton olacak şekilde belirlenmişlerdir. Kolon boyutlarına ve elüent oranlarına ufak değişiklikler uygulayarak denemeler yapmışlardır [51].

Han ve arkadaşları öğütülmüş ve toz haline getirilmiş porsuk ağacı (*Taxus Cuspidata*) yapraklarından paklitaksel (1) elde için çalışma yollarını basamaklar hallerinde belirlemişlerdir. Bu basamaklardan biri olan ekstraksiyon basamağı; karıştırıcı üstünde oda sıcaklığında 3 saat boyunca metanolla karıştırılarak ekstrakte olmasıdır. Bir çok ara basamaktan sonra belirlenen kromatografik yöntem için dolgu maddesi silika jel elüent ise benzen:aseton olarak belirlenmiştir [52].

Bui-Khac ve arkadaşları paklitaksel izolasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalarda öğütülüp toz haline getirilmiş porsuk ağacı iğne ve yapraklarını kullanmışlardır. Örnek ekstraksiyonu için çözücü olarak metanol ekstraksiyonunu tercih edilmiştir. 16 saat devam eden ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Kromatografik saflaştırma için kolon dolgu maddesi olarak silikajel tercih etmişlerdir, eluent olarak aseton heksana karar veren Bui-Khac ve arkadaşları eluent oranlarını 35: 65 ve 40: 60 olmak üzere iki farklı oran belirleyip bu oranlar üzerinden çalışmalarını yürütmüşlerdir [53].

Pyo ve arkadaşları *Taxus chinensis* hücre kültürünü kullanmışlardır. Bitki kültürünü oda sıcaklığında metanolla ekstrakte etmişlerdir. Bu ekstraksiyon işleminin uygulanışını karıştırıcı üzerinde 30 dak olacak şekilde kararlaştırmışlardır. Kromatografi öncesi işlemleri uyguladıktan sonra numuneyi kolona yüklenecek hale getirmişlerdir. Pyo ve arkadaşları kromatografik saflaştırma için hem izokratik hem de gradient sistem uygulamaları üzerinde yoğunlaşmışlardır. İzokratik olarak normal faz kromatografisi için silika jel 60N dolgu maddesi ve elüent olarak metanol:diklorometan (99:1) kullanmışlardır. Belirledikleri gradient sistemlerde ise dolgu maddesi ve elüentler izokratik sistemle aynıdır; elüent oranları kademeli olarak değişmektedir. Bu oranları ise 0,5:99,5; 1:99; 2:98 olacak şekilde belirlemişlerdir. Bu kolon kromatografisi aşamasında saflığı 20-35%, deneysel verimi 95-97% olarak hesaplamışlardır. İlerleyen basamaklarda aseton:heksan; metanol:su çöktürmeleri denemişlerdir ve bundan sonra HPLC analizleri yapmışlardır [54].

Gabetta ve arkadaşları porsuk ağacı üzerine yaptıkları çalışmaları *Taxus media Hicckii* üzerinde yoğunlaştırmayı tercih etmişlerdir. Bitki materyalinin uygun koşullarda

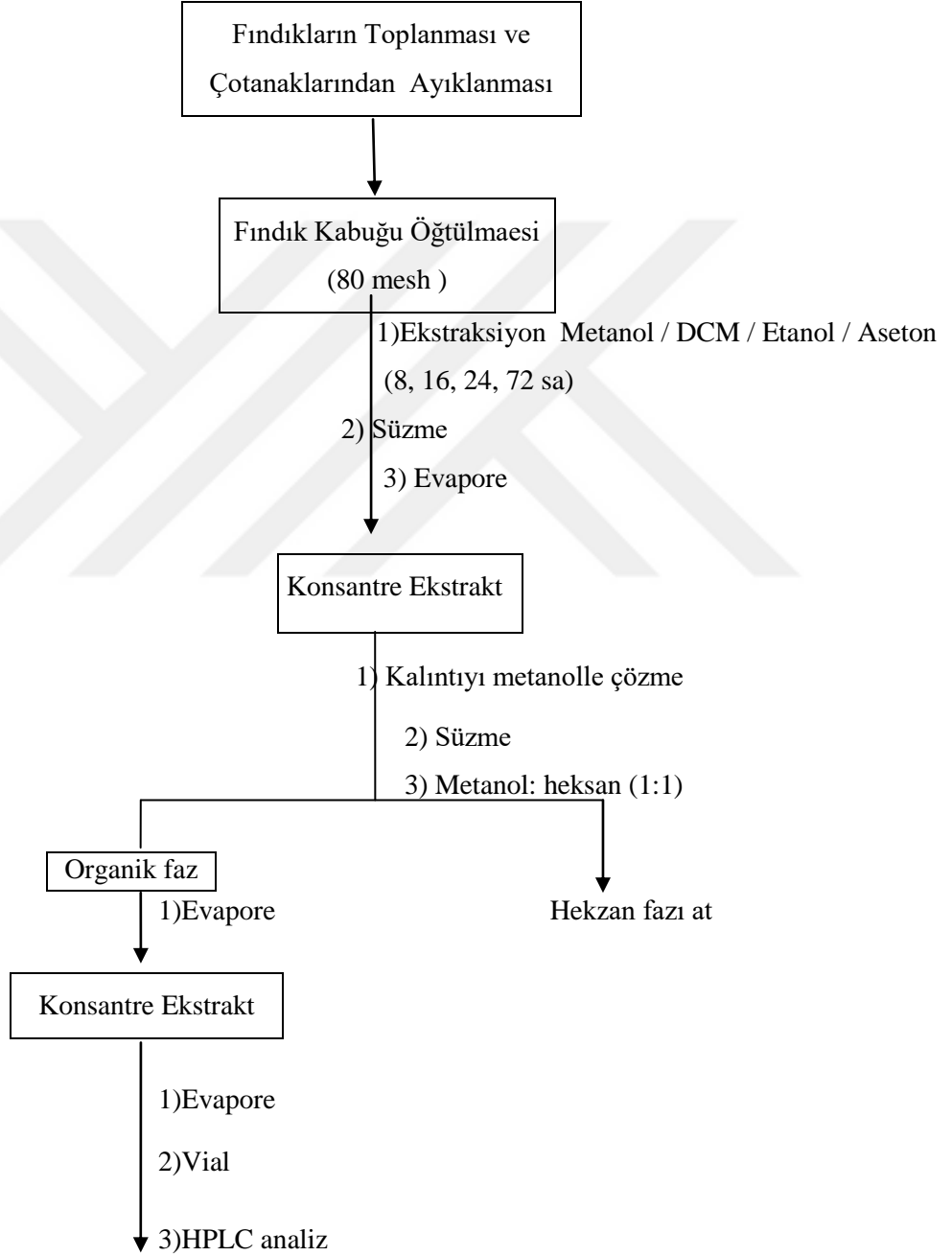
kurutulmasının ardından öğütme işlemini gerçekleştirmişler ve toz halindeki numuneyi sulu aseton ile ekstre etmişlerdir. Ekstreyi belirli işlemlerden geçirdikten sonra kolon kromatografisi uygulamasına uygun hale getirmişlerdir. Kolon dolgu maddesi olarak silika jel, elüent olarak ise 4:1 oranında n-heksan: aseton tercih etmişlerdir [55].

Jian Lui ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda *Taxus canadensis*' in iğne ve yapraklarını kullanmışlardır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak metanolu kullanmışlardır ve çözücü-örnek muamelesi için Bui-Khae ve arkadaşlarına göre daha az sürede 3 saatte ekstraksiyon süresini uygulamışlardır. Sıralı olarak devam eden işlemlerde öncelikle heksan-su ekstraksiyonuyla safsızlıkların bir kısmı daha sonrasında su-diklorometanla istenmeyen diğer safsızlıkların giderilmesini amaçlamışlardır. Devamında diklorometan fazı evapore edilmiştir ve izolasyon işlemine bu fazdan devam etmişlerdir. Kolon çalışmaları için 50-100 mesh partikül boyutlu polystiren-DVB dolgu maddesi kullanmışlardır. Kolon kurulumu için metanol içindeki dolgu maddesi kolona basınç yardımıyla yerleştirmişler ve sonrasında eluent olarak kullanamaya karar verdikleri %30 luk aseton-su kolonda dengeye gelmesini sağlamışlardır. Numuneyi kolona yükleyip eluenti gradient olarak geçirecek şekilde ayarlamışlardır. Gradient sistemi 35, 45, 50, 60, 65, 70 ve 80% aseton –su olacak şekilde belirlemiş ve kolonda yürütme işlemini yapmışlardır [56] .

El-Sholy ve arkadaşları HPLC şartlarını; C18 kolon , metanol: su (65: 35) mobil faz, 1,2 ml/dak akış hızı, 227 nm UV ve 10 mikrolitre enjeksiyon miktarı olarak belirlemişlerdir ve analiz sonuçlarını tablo halinde belirlemişlerdir. Ekstreksiyon işlemleri için ise diğer araştırmacılardan farklı olarak etanol tercih etmişlerdir ve ekstraksiyon süresini 24 saat olarak belirlemişlerdir [57].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Proje grubumuzun yaptığı diğer bir çalışmada fındık kabuğu ekstraksiyon optimizasyonu çalışması ile metodumuz belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi için çeşitli çözücülerle farklı oranlarda ve farklı ekstraksiyon süreleriyle denemeler yapılmıştır.

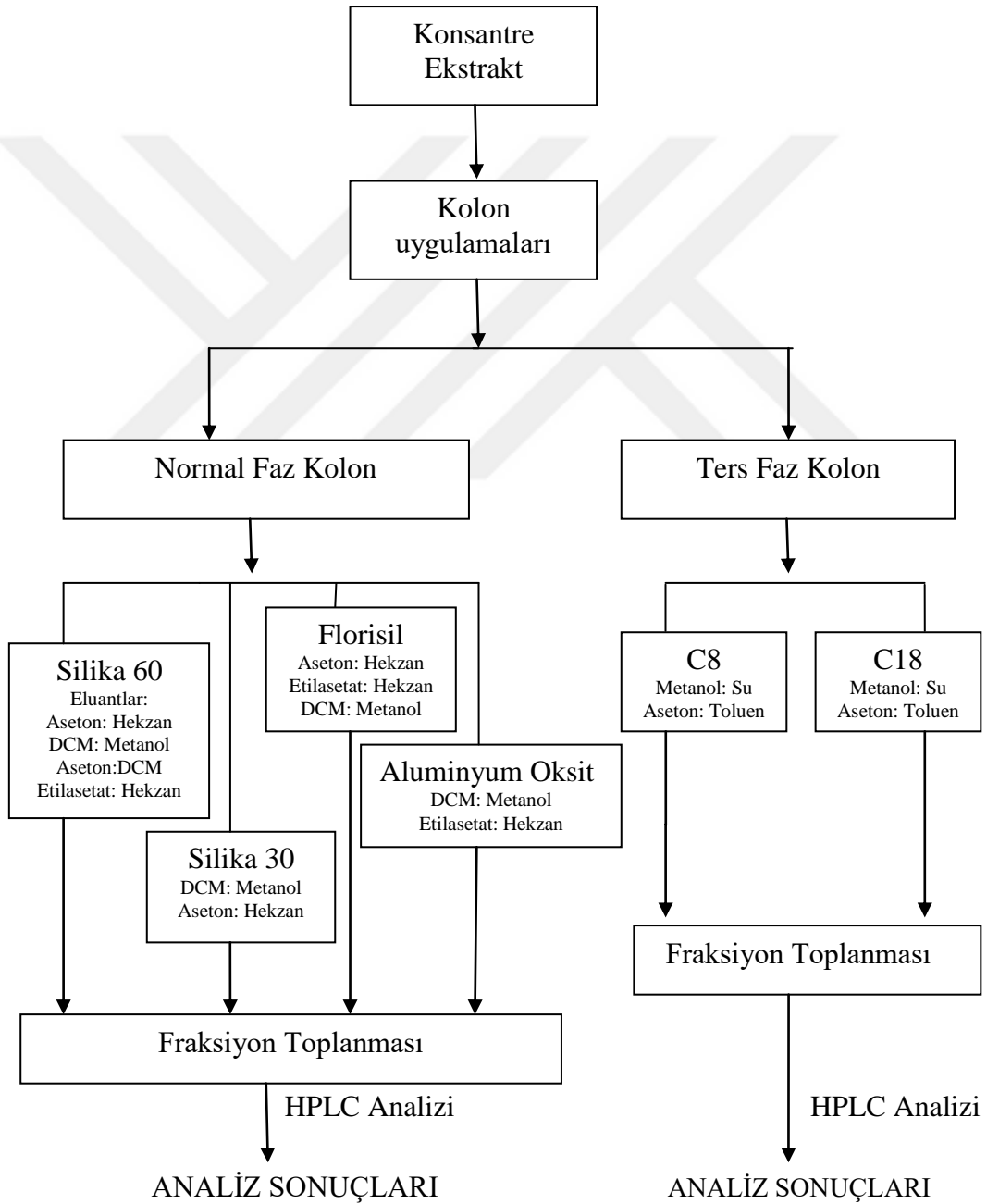


ANALİZ SONUÇLARI

Şekil 2.1 Optimize ekstraksiyon koşulunun belirlenmesi.

Çalışmamızda ekstraksiyon ve analiz işlemleri HPLC grade saflıkta çözücüler ile gerçekleştirilmiştir. Numune öğütme işlemi RETSCH SM 100 marka değirmende gerçekleştirilmiştir. Solvent evaporasyonu Heidolph Hei-Vap Value HL/G1 marka Rotary Evaporatör ile gerçekleştirilmiştir. HPLC analizleri SHIMADZU MARKA LC-20A model cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Ekstaksiyon şartları belirlendikten sonra çalışmamızın devamına kromatografi ile devam edilmiştir. Uygun kromatografi şartlarının belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 2.2 Kromatografik çalışma genel şeması.

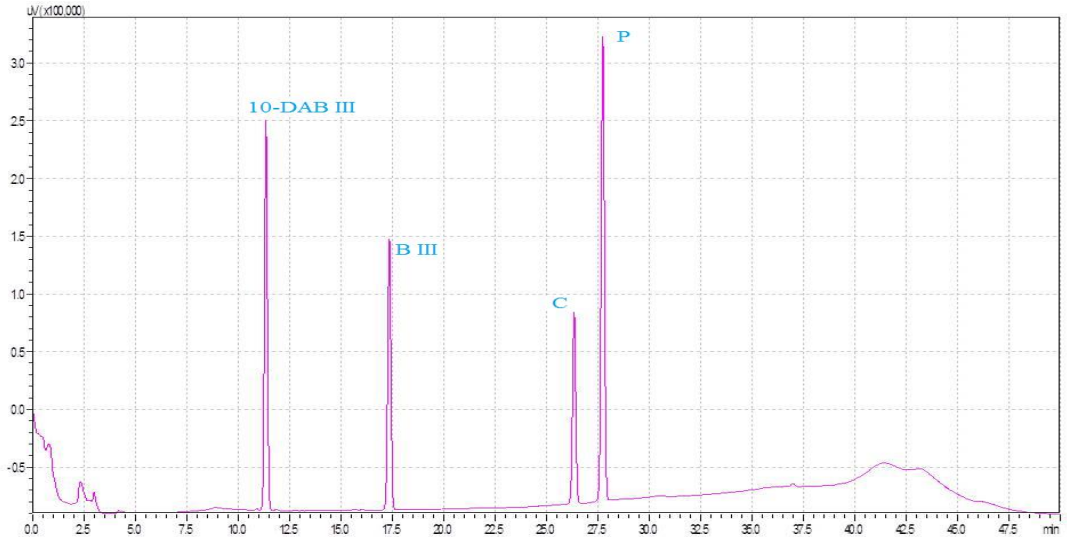
Analizler HPLC ters faz (RP) fenil heksil kolonda (250 x 4.6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü) gerçekleştirilmiştir. Mobil faz gradient programda (asetonitril: su - 25:75, 75:25, 40 dk) 1.00 mL/min akış hızında ve oda sıcaklığındaki kolonda gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL olup UV dedektörde 227 nm’ de pikler tayin edilmiştir. Standart olarak dört adet molekül (paklitaksel (P), sefalomannin (C), bakkatin III (B) ve 10-deasetil bakkatin III (10- DAB III)) kullanılmıştır. HPLC analizleri SHIMADZU MARKA LC-20A model cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik saflaştırma çalışmalarında optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilmiş ekstreler stok olarak kullanılmıştır. Bu stok çözeltiler etanolün 1: 15 (gram katı numune: ml etanol) oranda kullanıldığı ve oda sıcaklığı şartlarında 24 saat süren katı sıvı ekstraksiyon metodu ile elde edilmiş ekstredir. Bu ekstrenin paklitaksel miktarı ve yüzde saflığı aşağıda verilmiştir. Doğrudan kromatografik saflaştırma çalışmalarında kullanılıp izafi olarak en uygun kromatografik metod tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda hem normal faz (silika 60 (Sigma-Aldrich partikül boyutu: 60 A, 200-425 mesh), silika 30 (Sigma-Aldrich, partikül boyutu 30 A, 100-200 mesh), florosil (Fluka, 60-100 mesh) ve alümina (Merck alüminyum oksit 90; 0.063-0.200 mm) adsorbanları hem de ters faz (C8 (Fluka- Silica gel 60 C8 reversed phase) ve C18 (Fluka- Silica gel 60 C18 reversed phase) adsorbanları kullanılmıştır. Çalışmalarda izokratik ve gradient yöntemler denenmiştir. Kromatografik ayırım sonrası eluantlar çalışmanın durumuna göre tek tek veyahut birleştirilerek (Birleştirilmelere tek tek yapılan analizlerde karar verilmiştir.) HPLC ile analiz edilerek hem geri kazanım hem de saflık yönünden metodun verimi tespit edilmiştir.

Çizelge 2.1 Stok çözelti verim (ppm)- saflık (%) değerleri.

		10-DAB	BAK. III	SEF.	PAKLİTAKSEL
Stok Çözelti	Verim (ppm)	4,7391	0,6395	0,0634	0,9890
	Saflık (%)	3,0942	1,4044	0,3355	0,4559

Ayrıca toplanan fraksiyonlarda paklitakselin varlığı kesin teyidi için iç standart eklemesi metodu uygulanmıştır.



Şekil 2.3 Standartlar kromatogramı (paklitaksel, sefalomannin, bakkatin III ve 10-deasetil bakkatin III) HPLC kromatogramı

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 NORMAL FAZ KOLON UYGULAMALARI

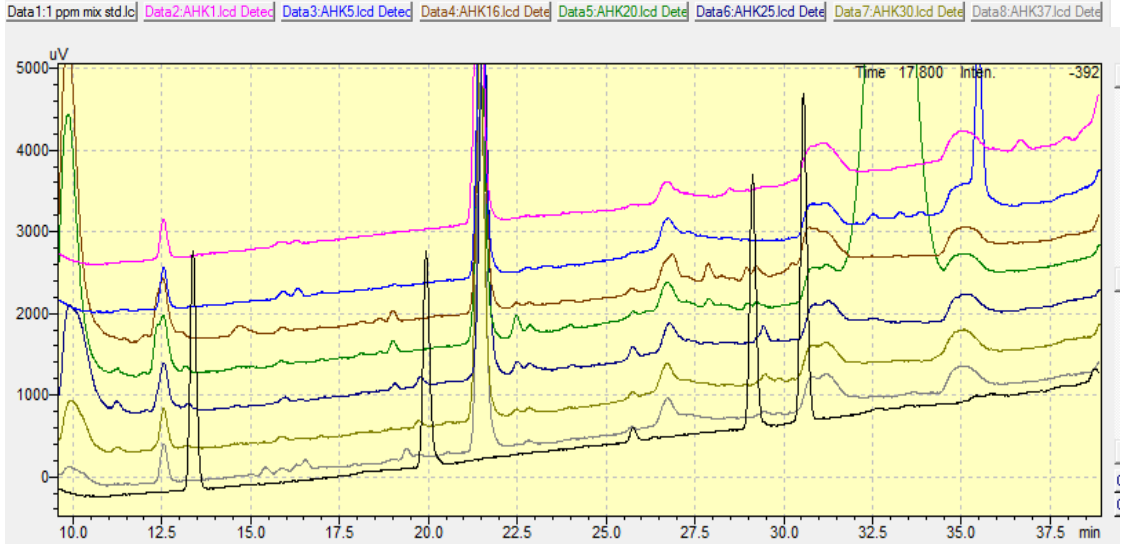
3.1.1 SİLİKA 60 KOLON UYGULAMALRIVE HPLC ANALİZ SONUÇLARI

3.1.1.1 Aseton/ Hekzan (35:65) Denemesi (İzokratik Yöntem)

Hazırlanan stok ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine silika kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune aseton: hekzan (35: 65) ile dengelenen kolona yüklendi ve aynı elüentle izokratik sistem kurularak yürütme işlemi gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 1' er ml olacak şekilde 40 fraksiyon toplandı. Bu 40 fraksiyon tek tek analiz edildi. Fraksiyonlar HPLC analizi yapıldı.

Çizelge 3.1 Aseton/ Heksan denemesi geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
1	0,0720
5	0,0719
16	0,1154
20	0,1915
25	0,0766
30	0,0817
37	0,0676



Şekil 3.1 1 nolu (pembe), 5 nolu (mavi), 16 nolu (kahverengi), 25 nolu (lacivert), 30 nolu (koyu sarı), 37 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları

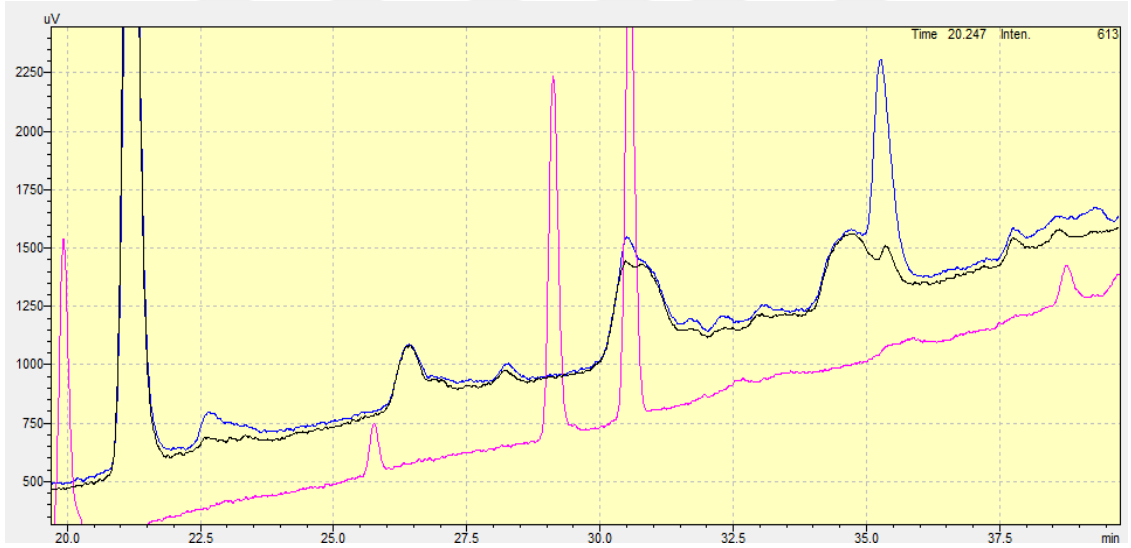
Bu analizde paklitakselin olduğu bölgede paklitakselin yanındaki bileşenler ile birlikte omuzlu olarak geldiği görülmüştür. Paklitakselin miktarının tam olarak belirlenebilmesi için bir sonraki aşamada eluantların içerisine iç standartlar eklenerek ölçümler ve hesaplamalar gerçekleştirildi. Ancak nihayetinde bu kromatografik sistemde paklitaksel ayırımının yeterli olmadığı görülmüştür.

3.1.1.2 Aseton/ Hekzan (35:65) Denemesi (İzokratik Yöntem, İç Standart Eklenmesi)

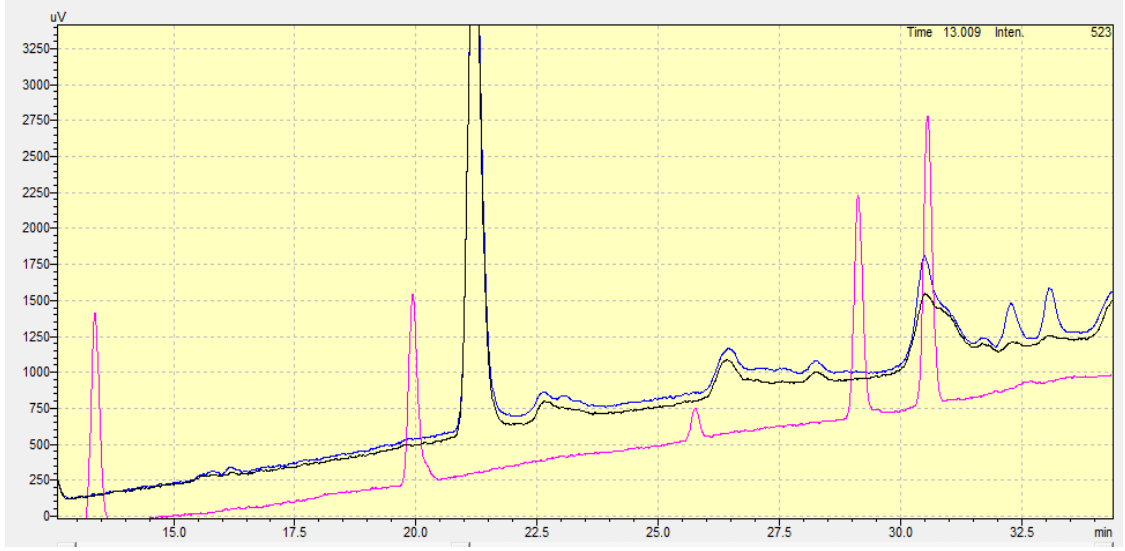
Yukarıda gerçekleştirilen deneme de paklitaksel miktarı hesaplanabilmekle beraber, pikin omuzlu olması ve yanındaki diğer bileşenden ayrılmamış olması hasebiyle yapılan ölçüm tamamıyla hatalı olduğuna kanaat getirdiğimizden dolayı aynı yöntem tekrarlandı. Tekrarlanan bu yöntemde hazırlanan ekstre kolona yüklendi. A: H sisteminde önceden dengelenmiş kolonda yürütme işlemi gerçekleştirildi. 1'er ml olacak şekilde 48 fraksiyon toplandı ve tek tek HPLC analizi yapıldı. HPLC analizinde toplanan eluantların içerisine iç standartlar eklenerek paklitakselin varlığı kesin teyidi yapıldı. Hesaplamalar da bu teyitler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Toplanan fraksiyonlardan 6-14 arası fraksiyonlarda paklitakselin varlığı net olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2 İç standart eklenmesi ile elde edilen geri kazanım (ppm) değerleri.

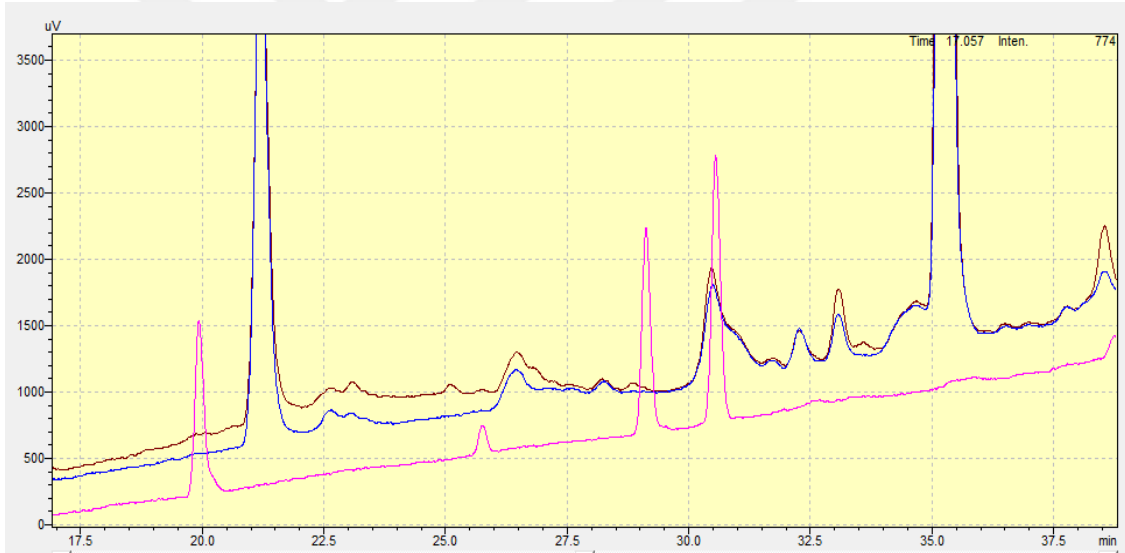
Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
4	0,0776
5	0,1169
6	0,2509
7	0,2952
8	0,2501
9	0,1753
10	0,1227
11	0,1202
12	0,1244
13	0,0958
14	0,0868
15	0,0676



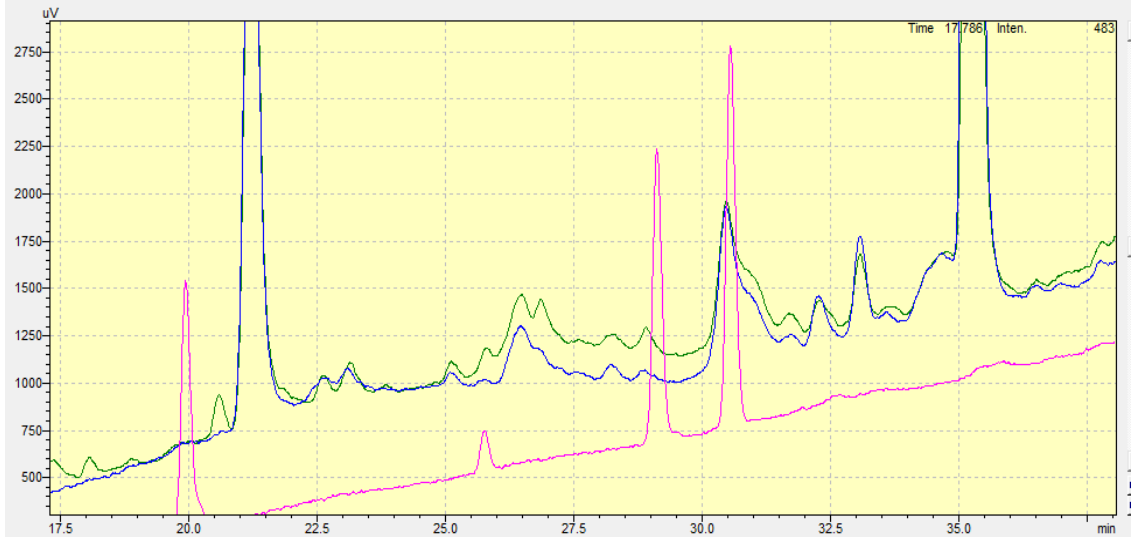
Şekil 3.2 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (siyah- 4 nolu fraksiyon; mavi- 5 nolu fraksiyon; pembe- standart).



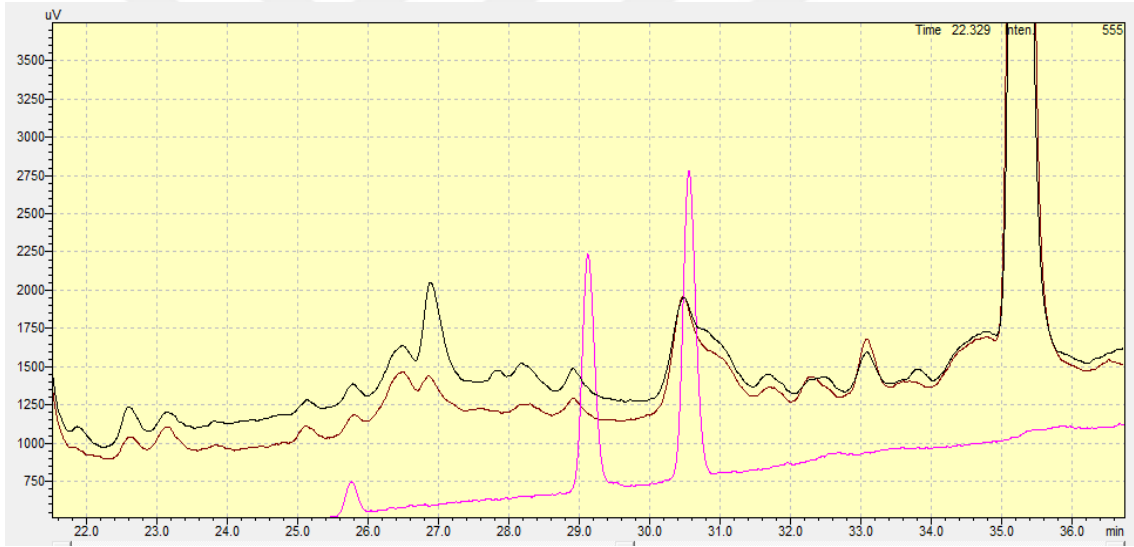
Şekil 3.3 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (siyah- 5 nolu fraksiyon; mavi- 6 nolu fraksiyon; pembe- standart).



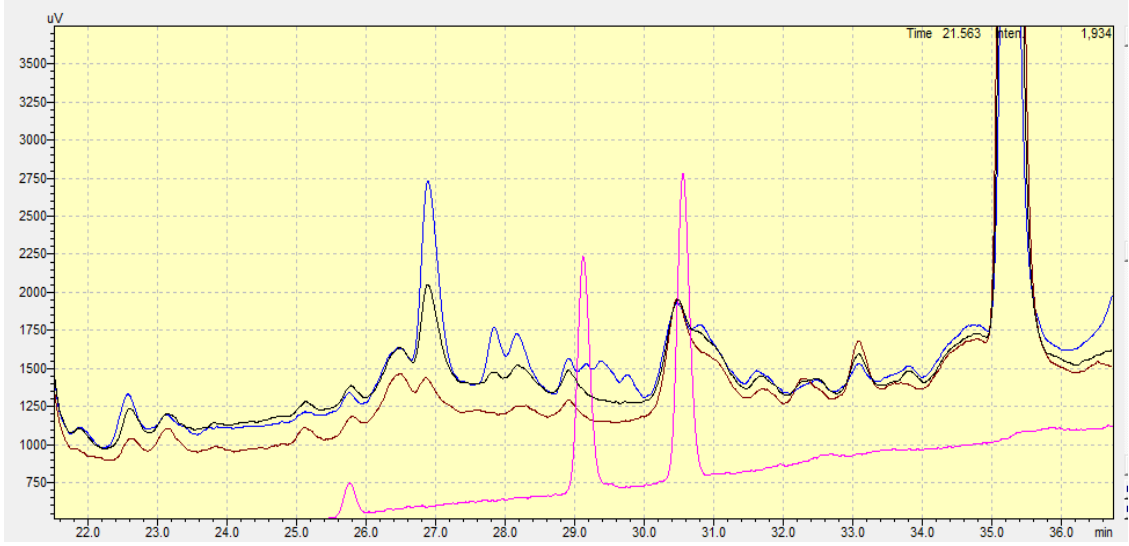
Şekil 3.4 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (mavi- 6 nolu fraksiyon; kahverengi- 5 nolu fraksiyon; pembe- standart).



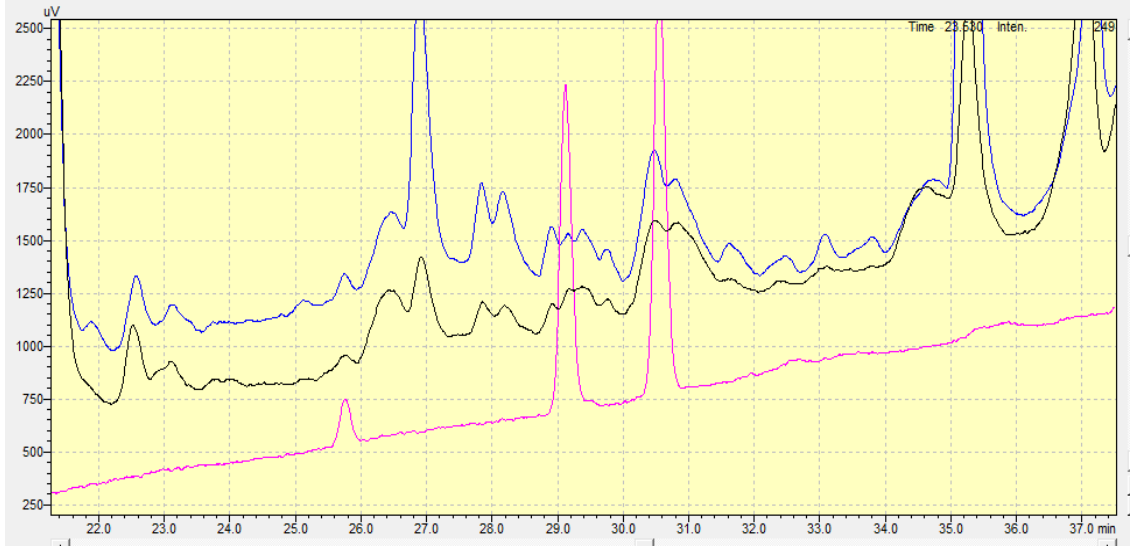
Şekil 3.5 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (mavi- 7 nolu fraksiyon; yeşil- 8 nolu fraksiyon; pembe- standart).



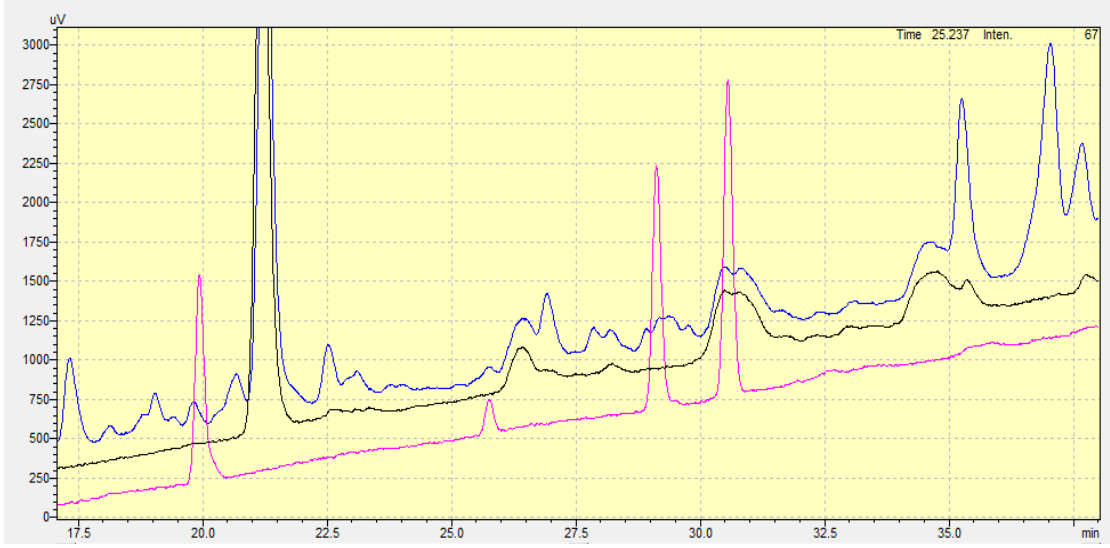
Şekil 3.6 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (kahverengi- 8 nolu fraksiyon; siyah- 9 nolu fraksiyon; pembe- standart).



Şekil 3.7 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (kahverengi- 8 nolu fraksiyon; siyah- 9 nolu fraksiyon; mavi- 10 nolu fraksiyon; pembe- standart).



Şekil 3.8 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (mavi- 10 nolu fraksiyon; siyah- 15 nolu fraksiyon; pembe- standart).



Şekil 3.9 İç standart ekleme denemesi kromatogramı (siyah- 4 nolu fraksiyon; mavi- 15 nolu fraksiyon; standart gelmeden önceki ve standart geçtikten sonraki kromatogram kıyaslamansı).

İç standart eklemesi ile hem paklitakselin yerini hem de ara fraksiyonlarda geldiği gözlenmiştir.

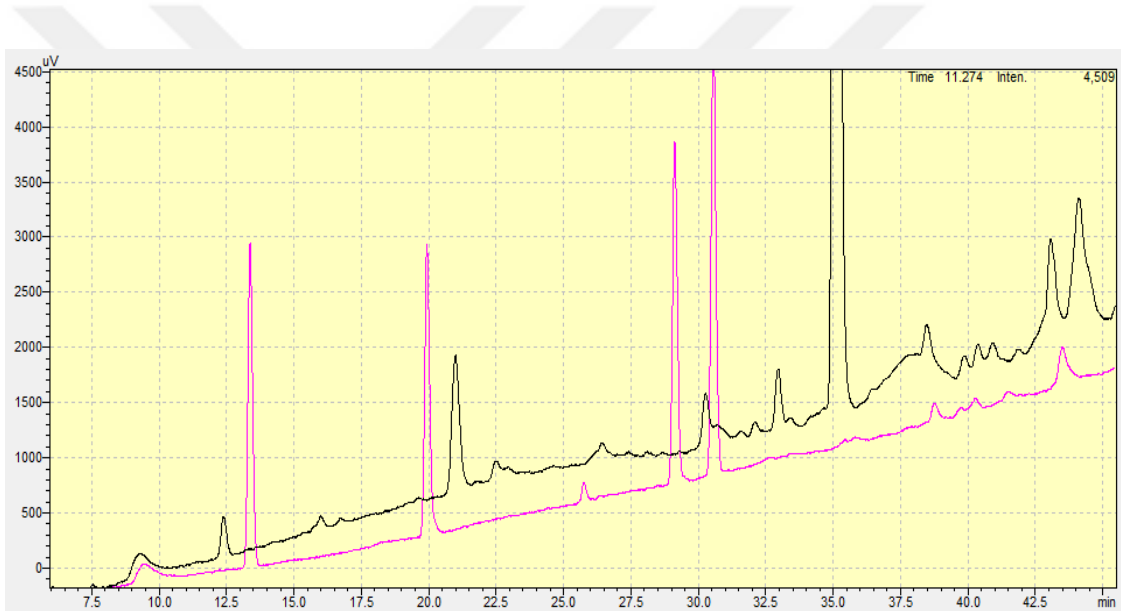
3.1.1.3 Aseton/ Hekzan Denemesi (Gradient Yöntem)

Hazırlanan stok ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine silika kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune kolona yüklendi. Kolonda yürütme işleminde gradient sistem uygulandı. Toplam 40 fraksiyon toplandı. Fraksiyonların toplanması sisteminde aseton/ hekzan oranları, ilk 8 fraksiyon için 20:80; devamındaki fraksiyonlarda 40:60; 50:50; 60:40; şeklinde devam edip en sonda da 80:20 olacak şekilde paklitaksel gelimi durana kadar toplama yapıldı. Bu fraksiyonlarda HPLC analizi yapıldı.

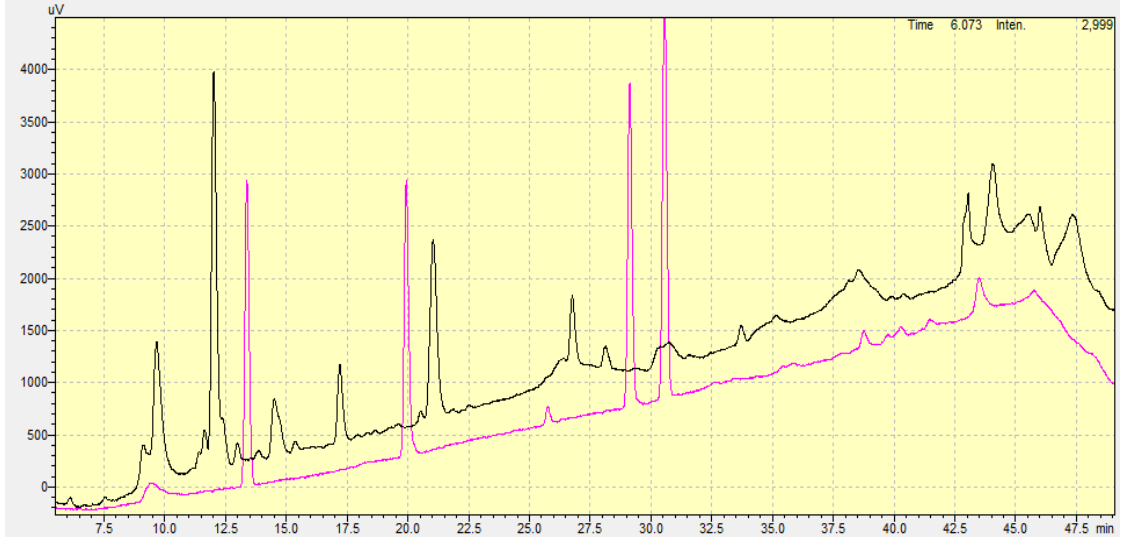
Elde edilen sonuçların HPLC kromatogramları ve elde edilen değerler aşağıda verilmiştir. Elde edilen sonuçlar gösteriyor ki, yöntem de paklitaksel diğer bileşenlerden tam olarak ayrılmamış, bu nedenle ayırım gerçekleşmemiştir. Bu nedenle elde edilen hesaplama değerleri güvenilirliğini kaybetmiştir.

Çizelge 3.3 Aseton/ hekzan gradient denemesi ile elde edilen geri kazanım (ppm) değerleri.

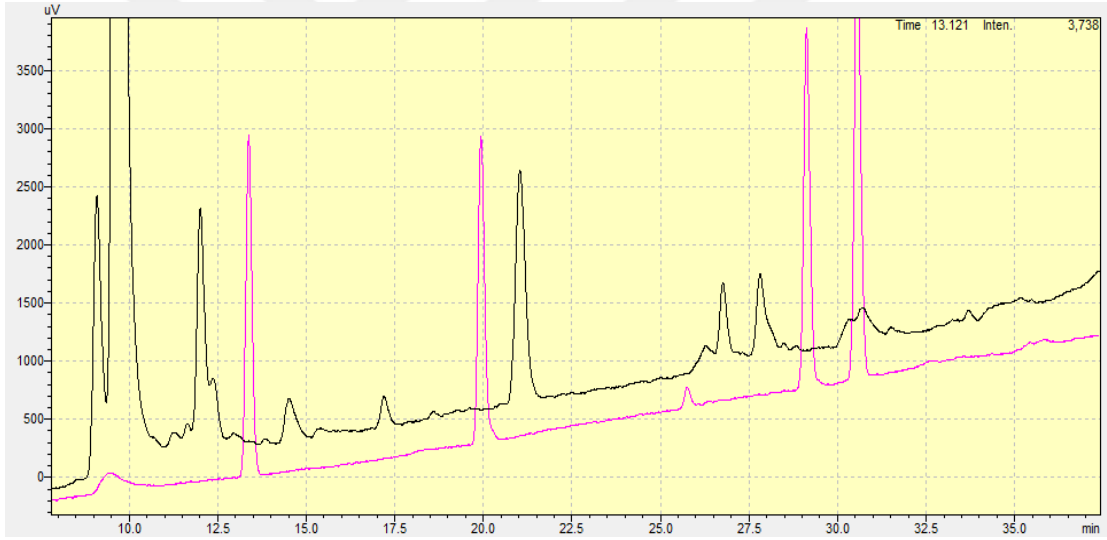
Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
5	0,0990
7	0,0577
11	0,0625
15	0,0223
23	0,0946
28	0,1062
30	0,1035
32	0,0965
35	0,0364



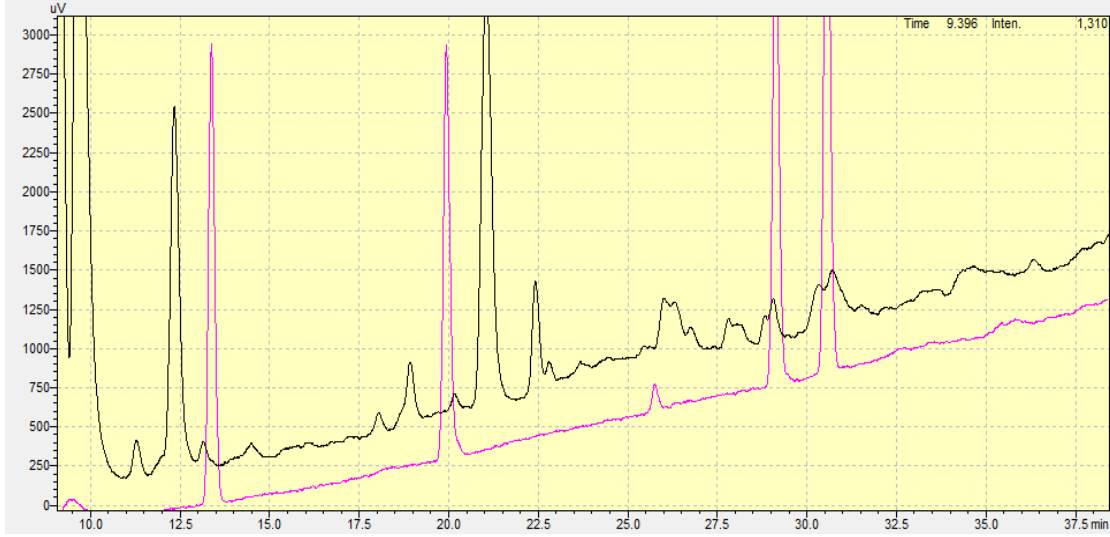
Şekil 3.10 7 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları



Şekil 3.11 15 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.12 23 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.13 28 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.14 35 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

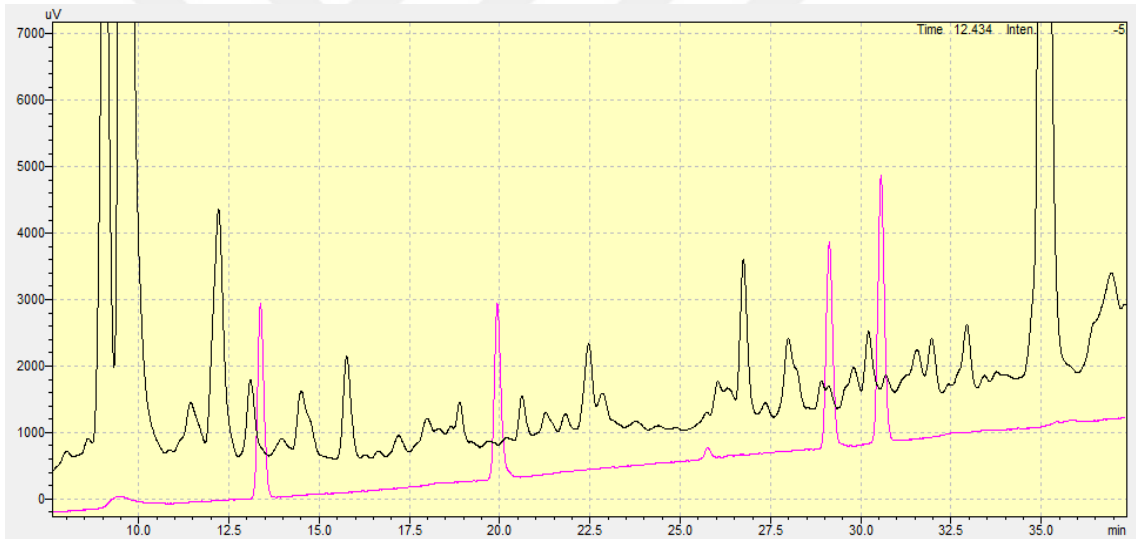
3.1.1.4 Aseton/ Hekzan Denemesi (Gradient Yöntem)

Hazırlanan stok ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine silika kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune kolona yüklendi. Kolonda yürütme işleminde gradient sistem uygulandı. Toplam 40 fraksiyon toplandı. Bu fraksiyonların 1.-19. arası 35:65 (A: H), 20-29 arası 50:50 (A: H) ve 30-40 arası 65:35 (A: H) çözücü karışımlarıyla yürütülerek toplandı. Bu fraksiyonlarda HPLC analizi yapıldı. Elde edilen analiz sonuçlarına göre seçilen fraksiyonların birleştirilmesine karar verildi.

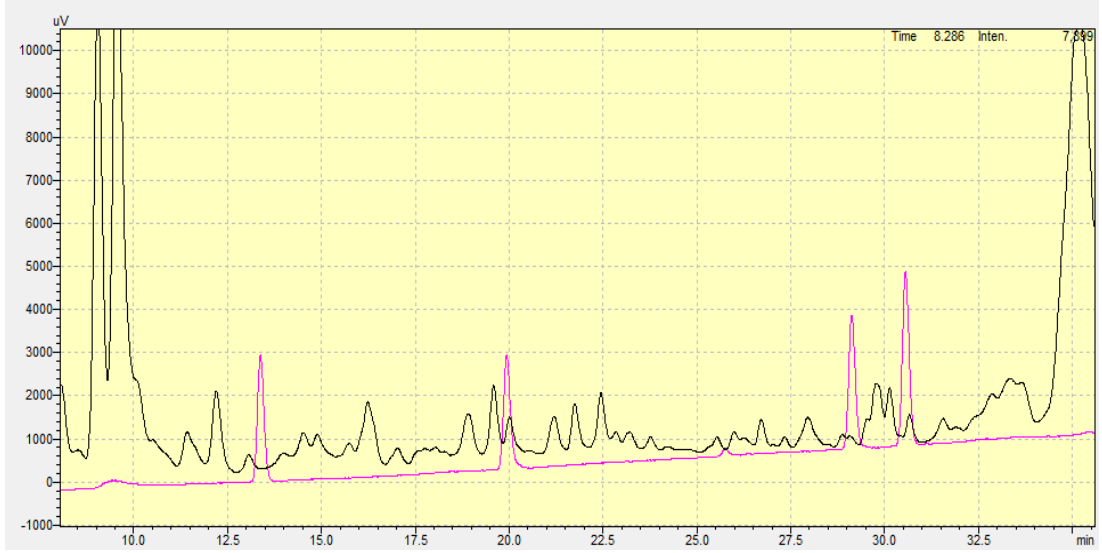
Elde edilen sonuçların HPLC kromatogramları ve elde edilen değerler aşağıda verilmiştir. Bir önceki gradient sistemde tam olarak paklitaksel diğer bileşenden ayrılmamasına rağmen, tekrar denemiş olduğumuz bu gradient yöntemde ayırım daha başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.4 Aseton/ hekzan gradient yöntem birleştirilmiş fraksiyon geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
1	0,0530
2	0,1340
3	0,1178



Şekil 3.15 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



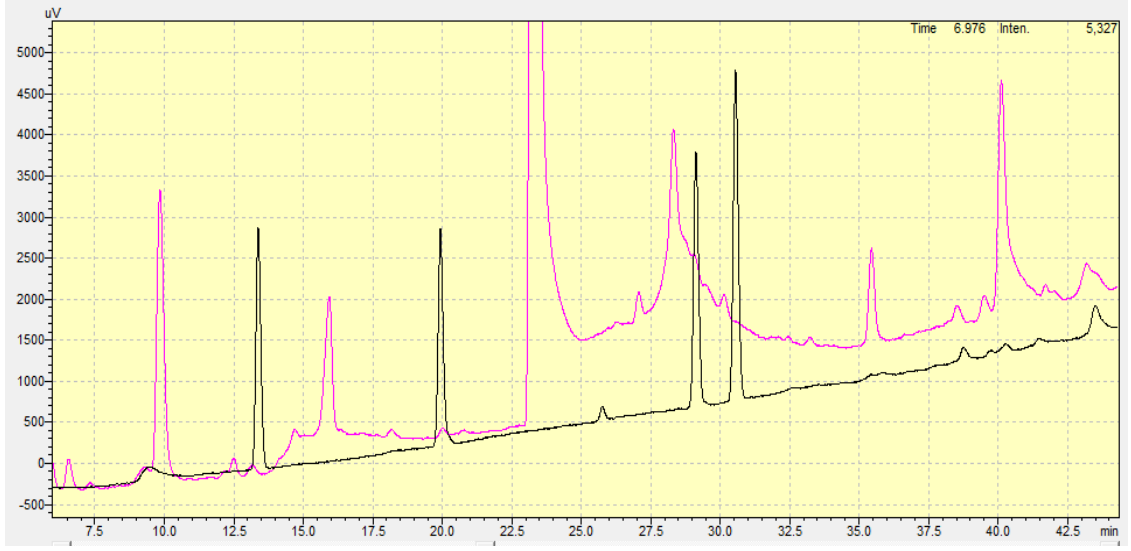
Şekil 3.16 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



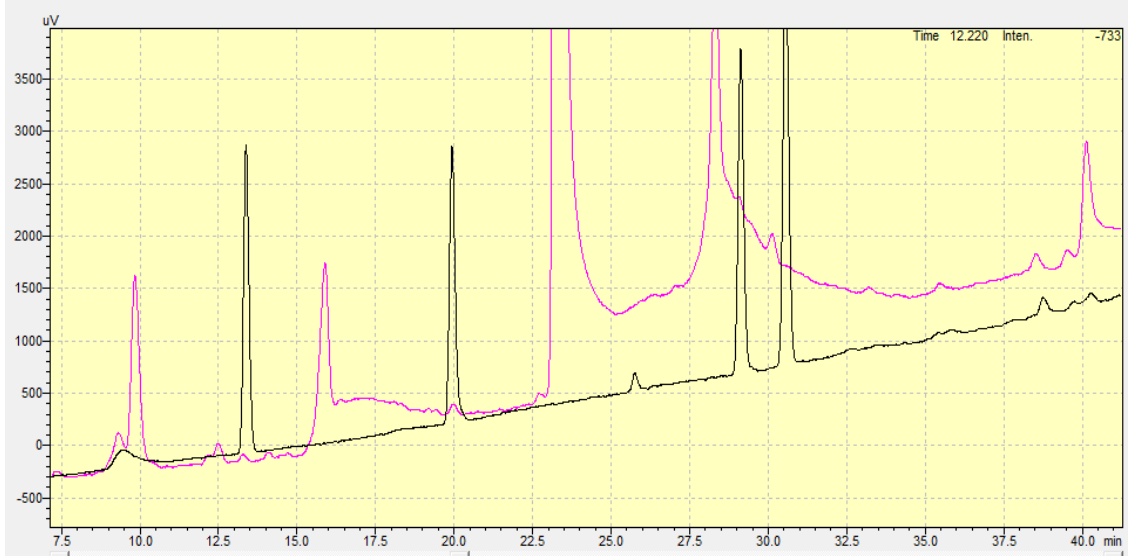
Şekil 3.17 3 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

3.1.1.5 DCM/ Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)

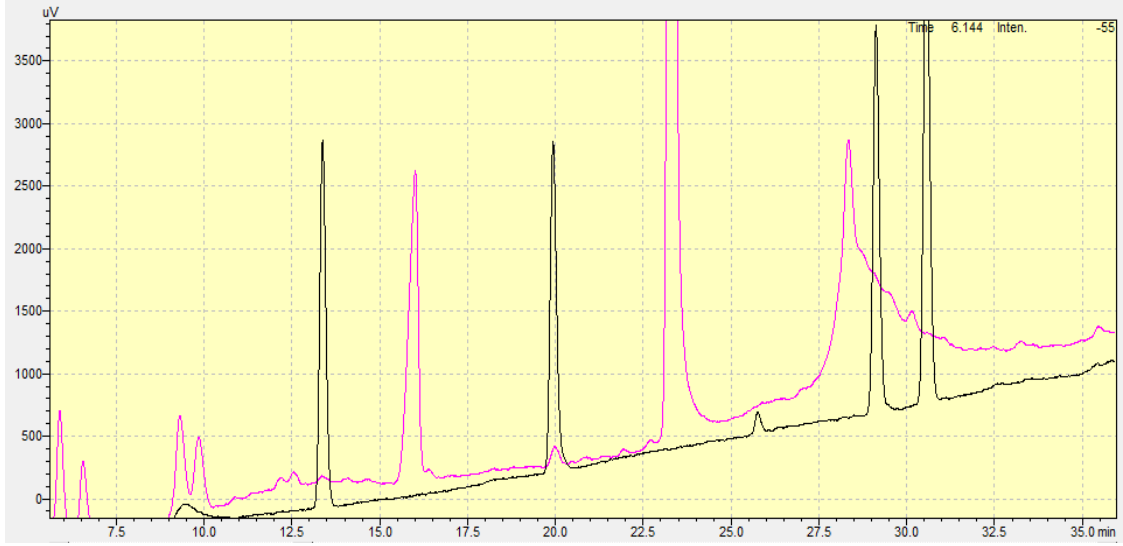
Hazırlanan stok ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine silika kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune DCM: MEOH (98,5:1,5) ile dengelenen kolona yüklendi ve aynı eluantla izokratik sistem kurularak yürütme işlemi gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 1' er ml olacak şekilde toplandı. Yapılan analizler sonucu fraksiyonların birleştirilmesine karar verildi. Bu fraksiyonlar HPLC analizi yapıldı. Elde edilen kromatogramlarda ayırımın iyi gerçekleşmediği görülmektedir.



Şekil 3.18 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.19 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.20 3 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

3.1.1.6 Aseton/ DCM Denemesi (Gradient Yöntem)

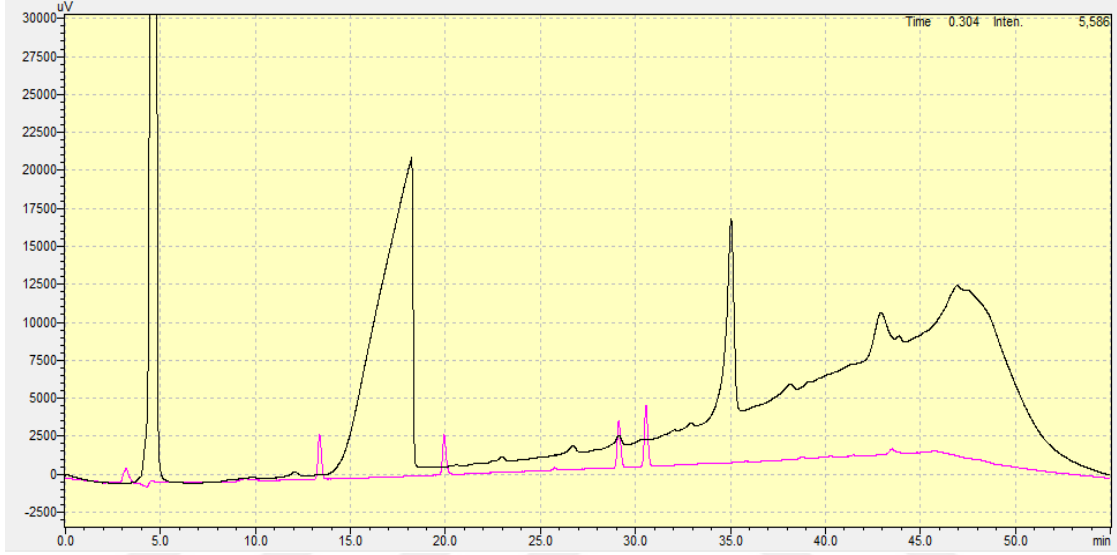
Hazırlanan stok ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine silika kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune A: DCM (20:80) ile dengelenen kolona yüklendi ve aynı elüentle gradient sistemde yürütme işlemi gerçekleştirildi. 15 fraksiyon toplandı. 1- 5 arası fraksiyonlar; 20: 80 (A: DCM), 6-10 arası fraksiyonlar 50:50 (A: DCM), 11-15 arası fraksiyonlar 80:20 (A: DCM) olacak şekilde yürütülen fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde toplandı. Toplanan ilk fraksiyonlar analiz edildiğinde DCM den kaynaklanan kaymalar gözlemlendiği için belirlenen fraksiyonlar evapore edilip metanol ile viallenip HPLC analizi gerçekleştirildi.

Bu yöntemde kromatografik elusyonların direkt olarak HPLC ile kolona verilmesi durumunda çözücü çakışmasından dolayı pikler düzgün görüntülenememiştir. Bu problemi tahmin etmemiz üzerine eluantları evapore edip, metanol ile çözerek HPLC'ye vermemiz üzerine paklitakselin bu kromatografik ayırimda son derece başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

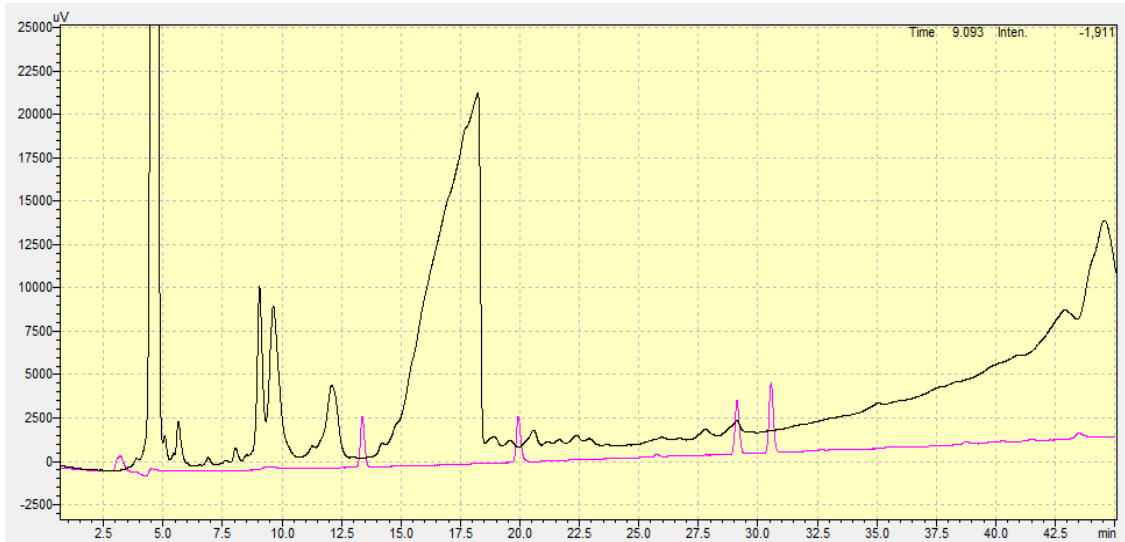
Çizelge 3.5 Aseton/ DCM gradient yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
2	0,1529
6	
8	0,0551

Metanol viallenmesi öncesi HPLC kromatogramları:

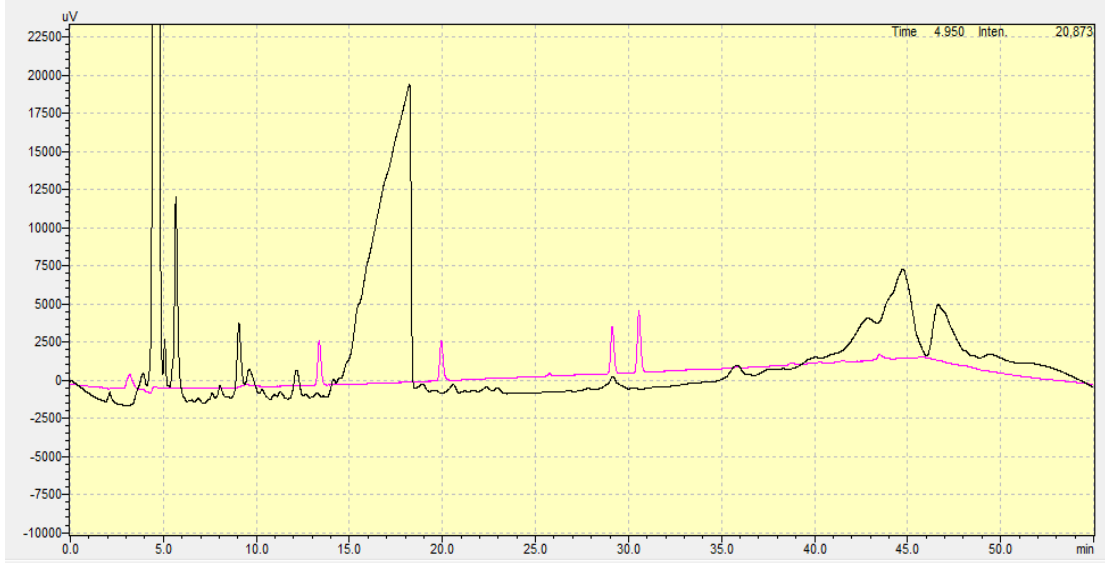


Şekil 3.21 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları..



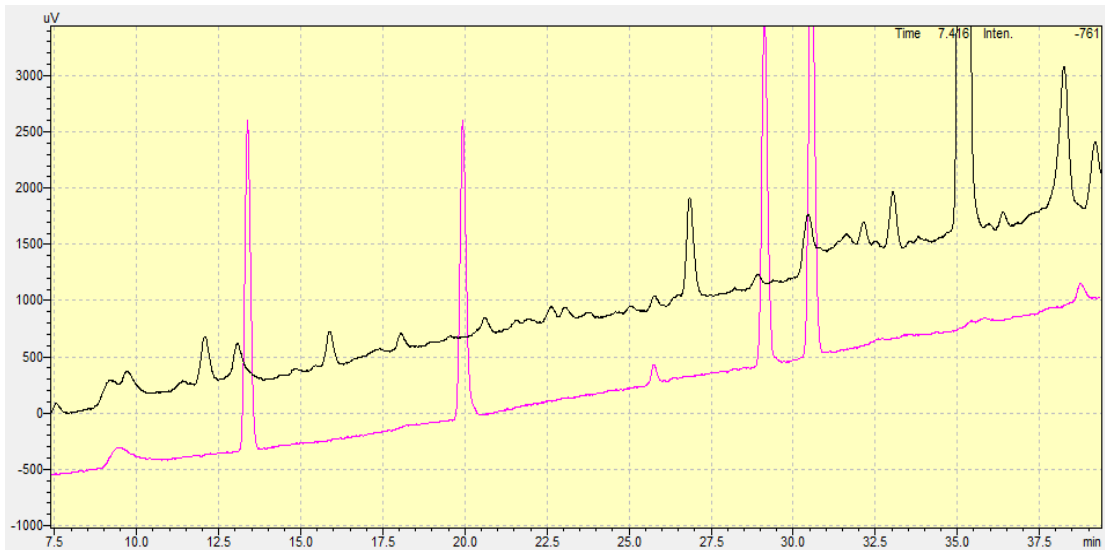
Şekil 3.22 6 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

6 numaralı fraksiyonun data görüntüsünden görüldüğü üzere çözücü faktöründen dolayı HPLC kolonunda ayırım sağlıklı değildir. Bu nedenle ortamdaki çözücünün uzaklaştırılarak aradığımız maddeleri de çözen metanolla tekrar çözündürülüp viallenmesine karar verildi.

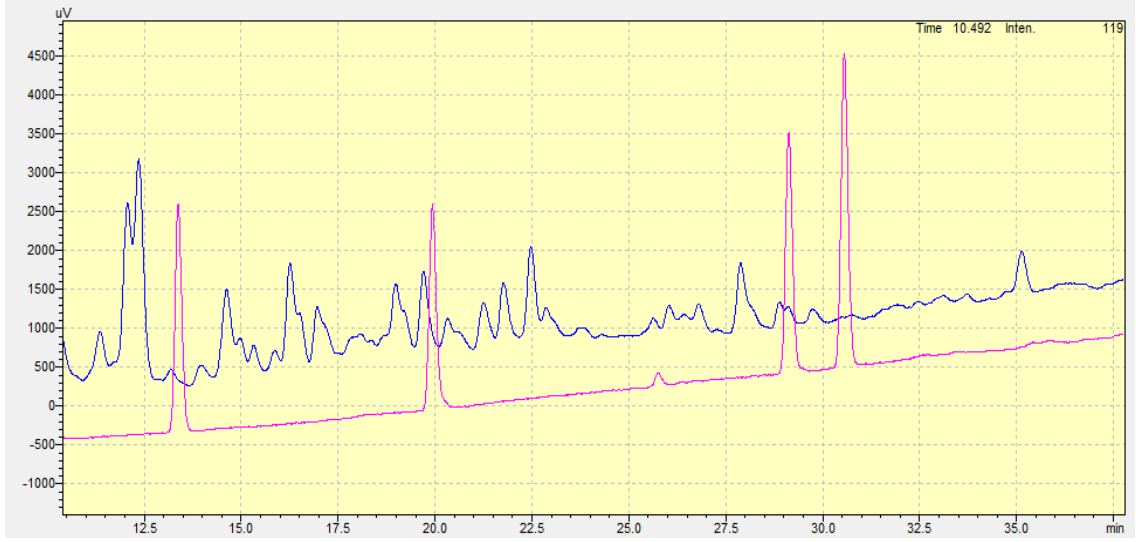


Şekil 3.23 8 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

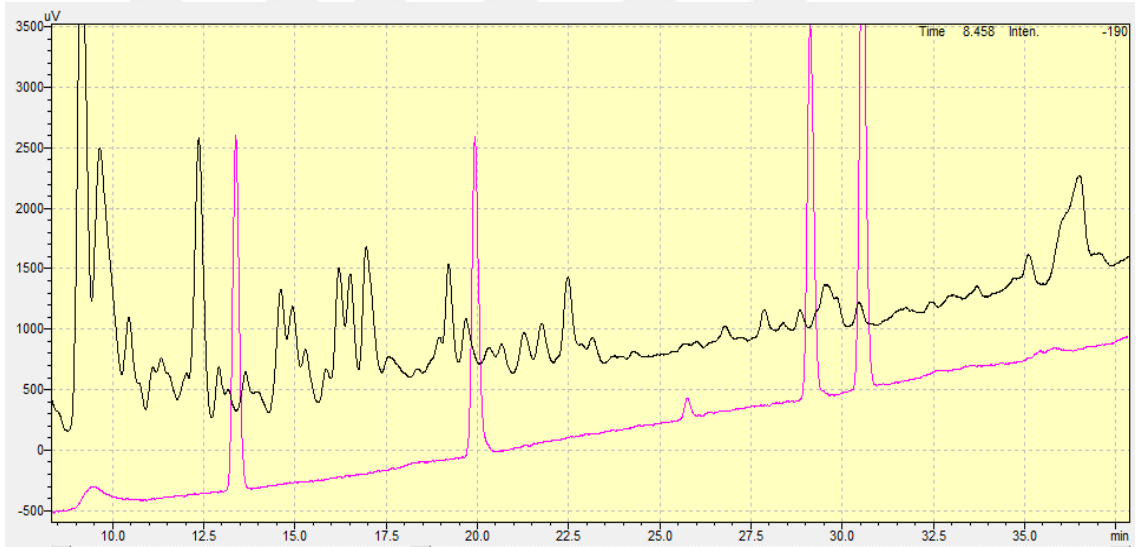
Metanol viallenmesi sonrası elde edilen kromatogramlar:



Şekil 3.24 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.25 6 nolu (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.26 8 nolu (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

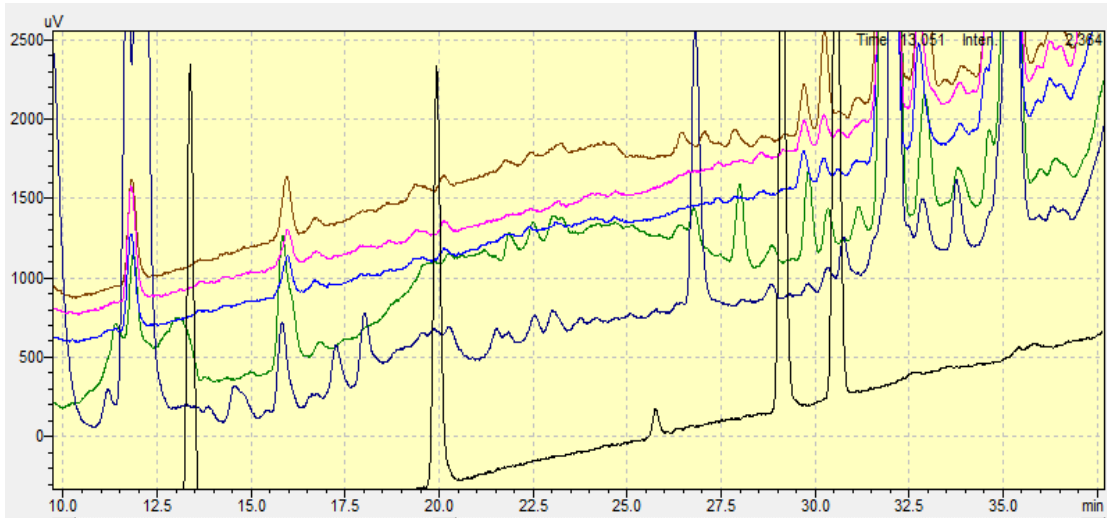
Gradient olarak uyguladığımız bu sistemde 2 nolu eluantta paklitaksel gözlenirken ara eluant olan 6 nolu eluantın data görüntüsüne bakıldığında; bakkatin ve sefalomannin bölgelerinde pozitiflik söz konusudur. 8 nolu eluantın data görüntüsünde görüldüğü üzere ise paklitaksel pik bölgesi belirginleşmiştir.

3.1.1.7 Etilasetat/ Hekzan Denemesi (İzokratik Yöntem)

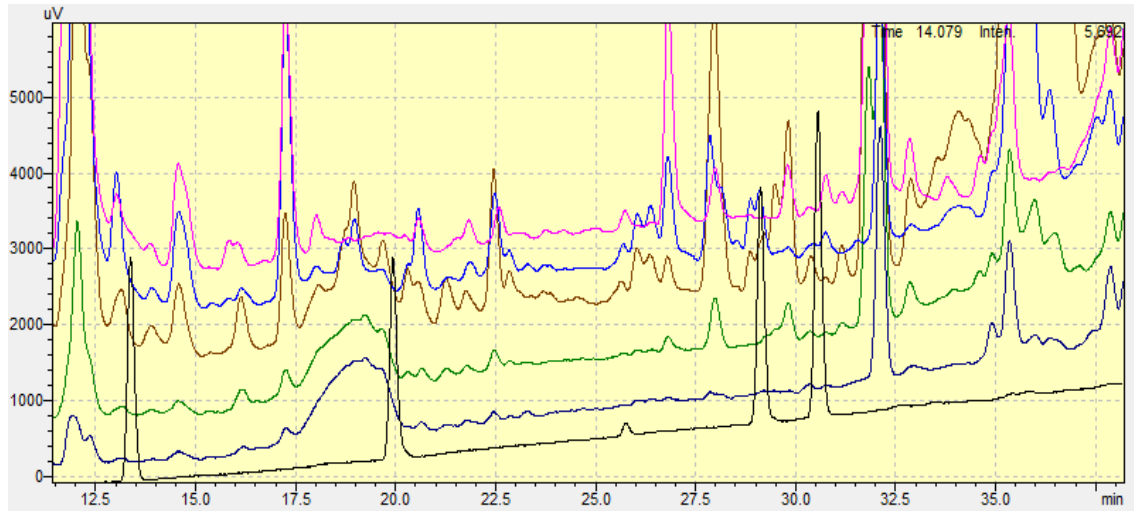
Hazırlanan ekstreden 1 ml alınarak üzerine bir miktar silika 60 dolgu maddesi eklendi ve evaporator yardımıyla toz haline getirildi. Kolon hazırlanmasında kullanılan elüent 30: 70 etilasetat/ hekzandır. Etilasetat: hekzan elüenti ile kolon dengeye getirildikten sonra toz haline getirilen ekstre silika 60 ile doldurulmuş kolona yüklendi. Aynı elüentle yürütme işlemi gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde toplandı. HPLC analizleri yapıldı.

Çizelge 3.6 Etilasetat/ hekzan gradient yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
34	0,0111
35	0,0157
36	0,1714
38	0,0857
40	0,0764
41	0,1120
42	0,0235



Şekil 3.27 34 nolu (pembe), 35 nolu (mavi), 36 nolu (kahverengi), 38 nolu (yeşil), 40 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.28 41 nolu (pembe), 42 nolu (mavi), 43 nolu (kahverengi), 45 nolu (yeşil), 48 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.

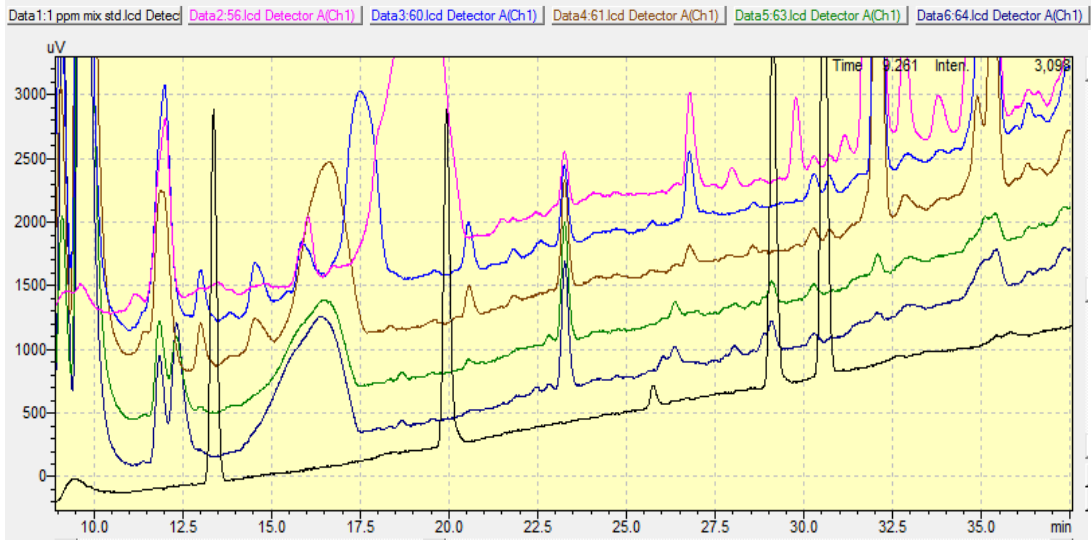
Bu yöntemde 36 ve 41 nolu fraksiyonlarda ayırımın ve verimin son derece yüksek olduğu görülmüştür.

3.1.1.8 Etilasetat/ Hekzan Denemesi (Gradient Yöntem)

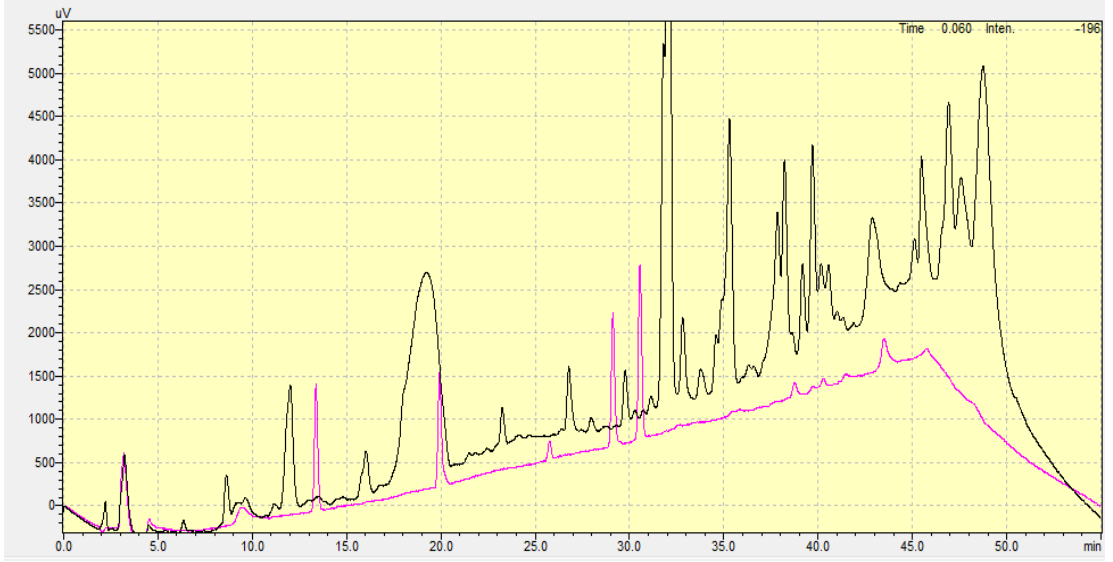
Hazırlanan ekstreden 1 ml alınarak üzerine bir miktar silika 60 dolgu maddesi eklendi ve evaporator yardımıyla toz haline getirildi. Kolon hazırlanmasında kullanılan elüent 30: 70 etilasetat/ heksandır. Etilasetat: heksan elüenti ile kolon dengeye getirildikten sonra toz haline getirilen ekstre silika 60 ile doldurulmuş kolona yüklendi. Aynı elüetle yürütme işlemi gerçekleştirildi. Fraksiyonlar toplanırken 2' şer ml olacak şekilde ve 51-55 nolu fraksiyonlar 30:70; (Etilasetat: Heksan); 56-59 nolu fraksiyonlar 40:60 (Etilasetat: Heksan); 60-63 nolu fraksiyonlar 60:40 (Etilasetat: Heksan); 64-66 nolu fraksiyonlar 70:30 (Etilasetat: Heksan) oranları uygulanacak şekilde denendi. HPLC analizleri yapıldı.

Çizelge 3.7 Etilasetat/ hekzan gradient yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
54	
56	0,0175
58	0,0258
60	0,0374
61	0,0223
62	
63	
64	

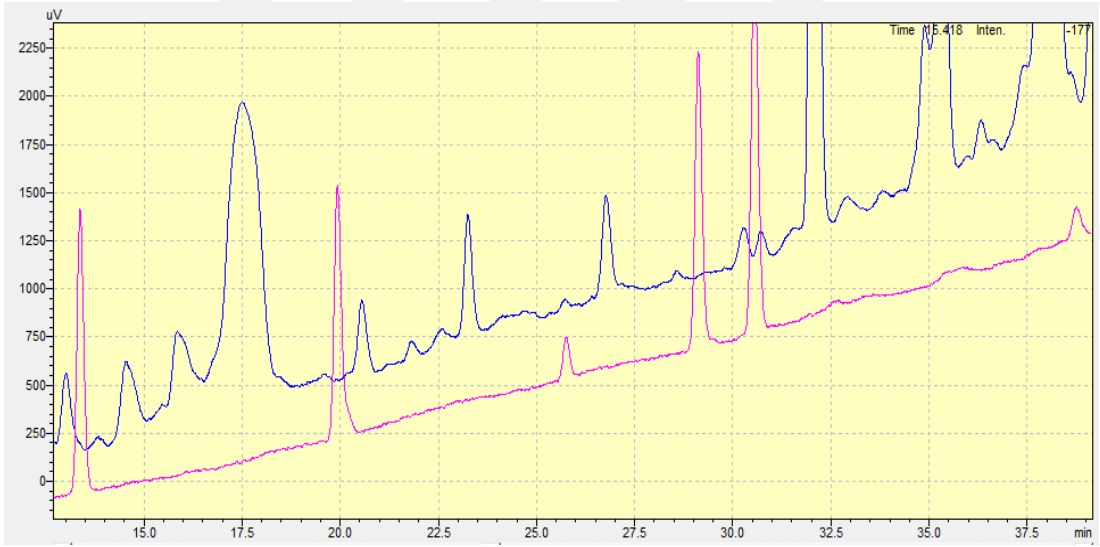


Şekil 3.29 56 nolu (pembe), 60 nolu (mavi), 61 nolu (kahverengi), 63 nolu (yeşil), 64 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.

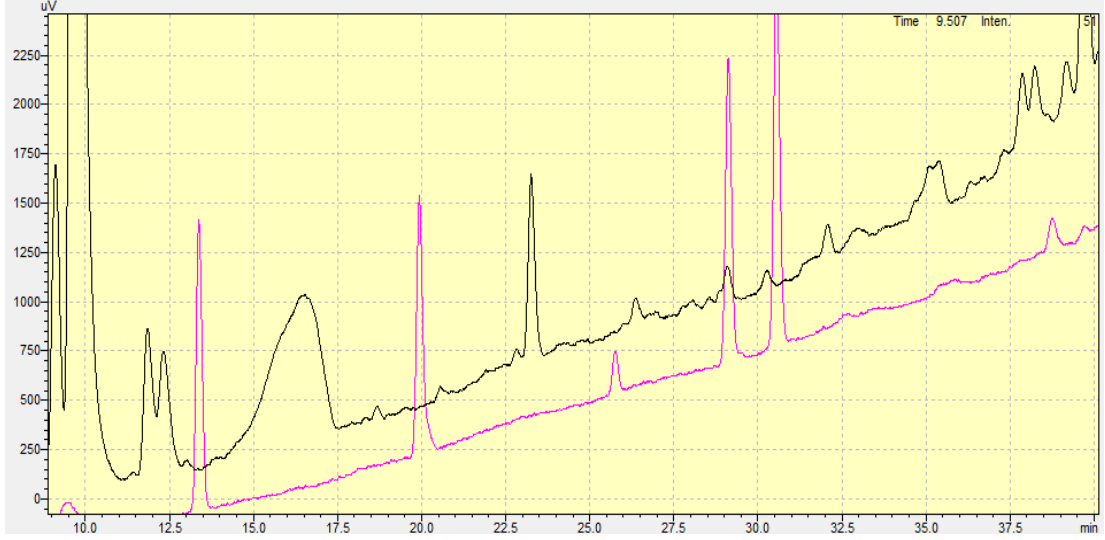


Şekil 3.30 56 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

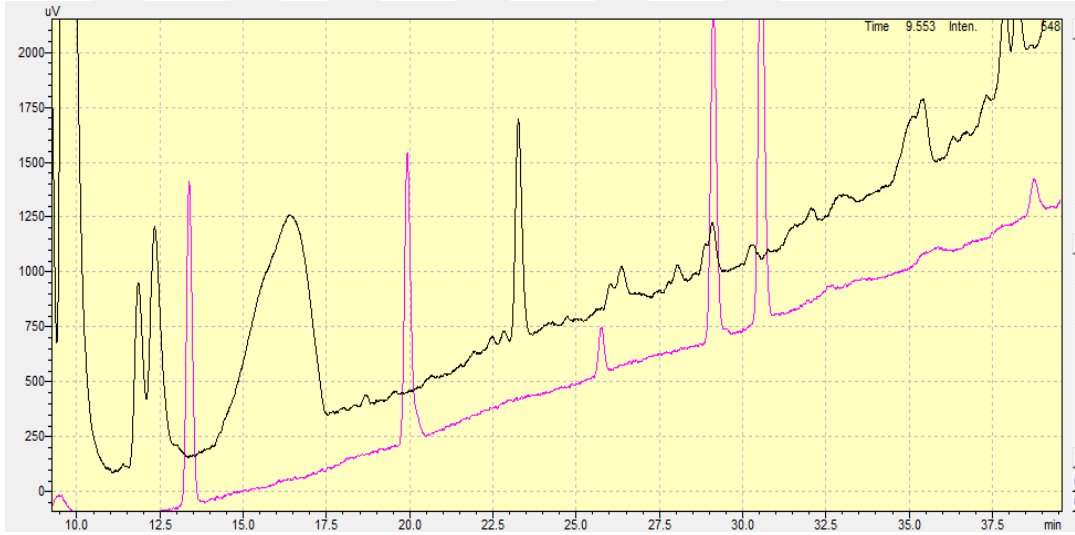
56 kodlu fraksiyonun data görüntüsü bakkatin bölgesinde ayırım kötü olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.3160 nolu (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.32 63 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.33 64 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

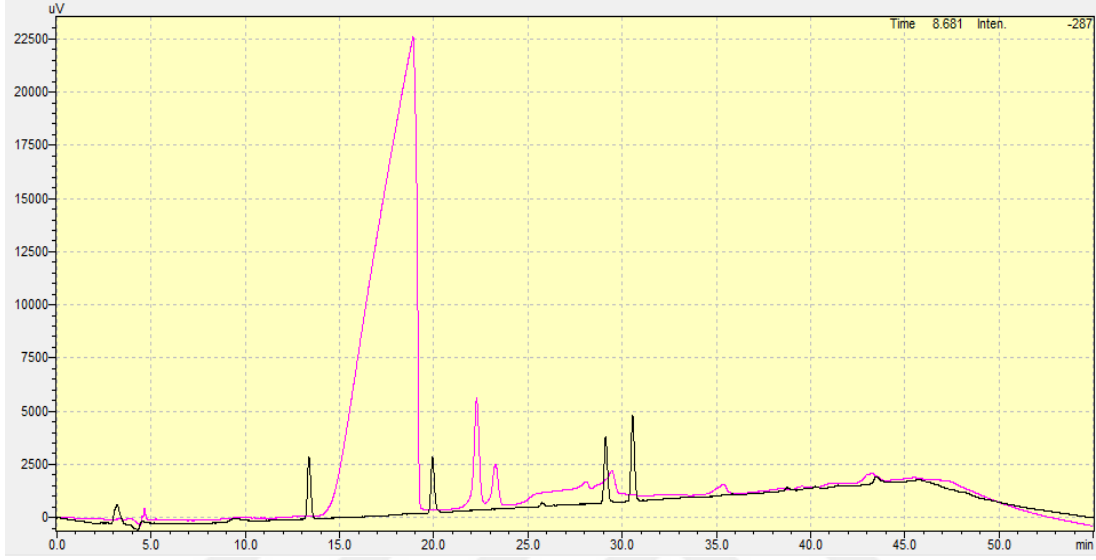
Bu yöntemin izokratik uygulamasında son derece başarılı sonuç alınırken gradient sistemde başarı oranının özellikle verim yani geri kazanımda çok düşük seviyelere gerilediği görülmektedir.

3.1.2 SİLİKA 30 KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI

3.1.2.1 DCM: Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)

Ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine silika 30 kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune hazırlanan silika 30 kolona yüklendi. DCM: metanol

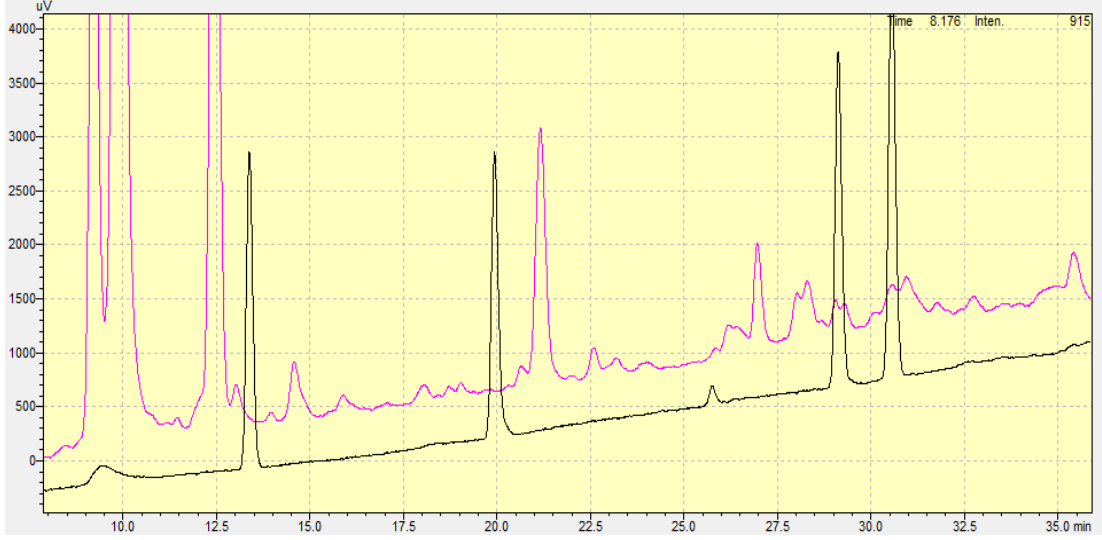
(98,5: 1,5) çözücü karışımı izokratik şekilde uygulandı. Fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde 25 fraksiyon toplandı. HPLC analizi yapıldı. Daha sonrasında DCM' le yapılan fraksiyonların birleştirilmesine karar verildi. Buna göre fraksiyonlar birleştirilmiş ve tekrar analiz yapılmıştır. Aşağıdaki şekillerden de görüleceği üzere bu yöntemde kromatografik ayırım başarısız olmuştur.



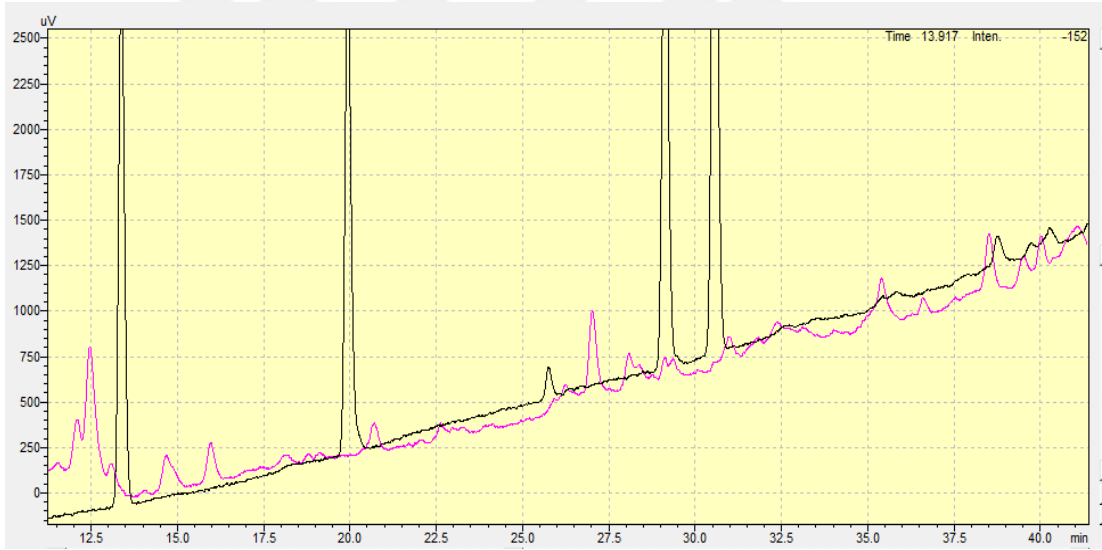
Şekil 3.34 1 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.

3.1.2.2 Aseton: Hekzan Denemesi (İzokratik Yöntem)

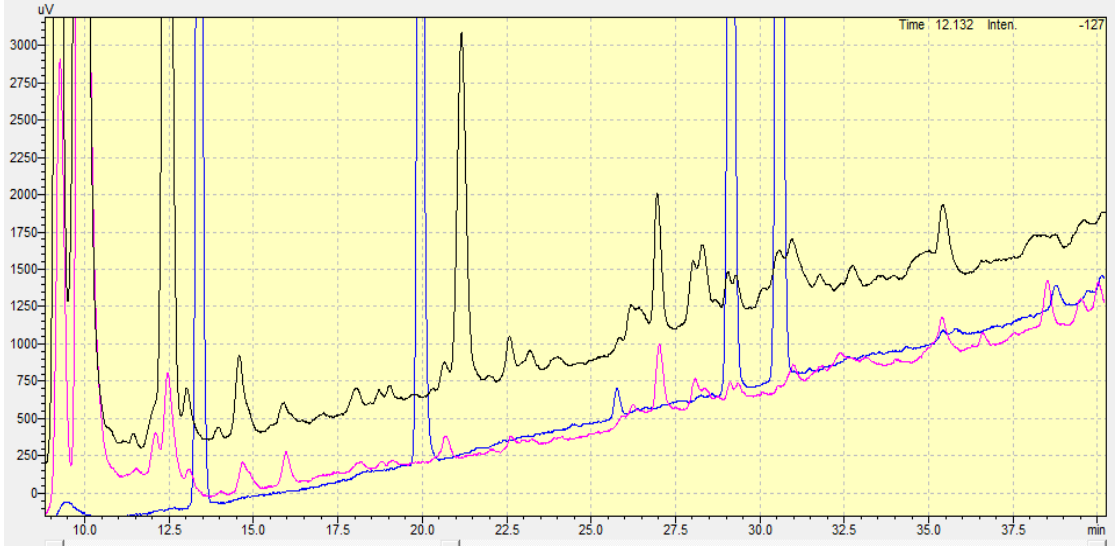
Ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine silika 30 kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune hazırlanan silika 30 kolona yüklendi. Aseton: Hekzan (35: 65) izokratik sistemi ile yürütme işlemi gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde 25 fraksiyon toplandı. Bu 25 fraksiyondan 10. ve 20. Fraksiyon analiz edildi. İlk HPLC analizlerine göre ayırım tam olarak görülemediği için evapore edilip tekrar metaol ile viallenerek analiz tekrarlandı.



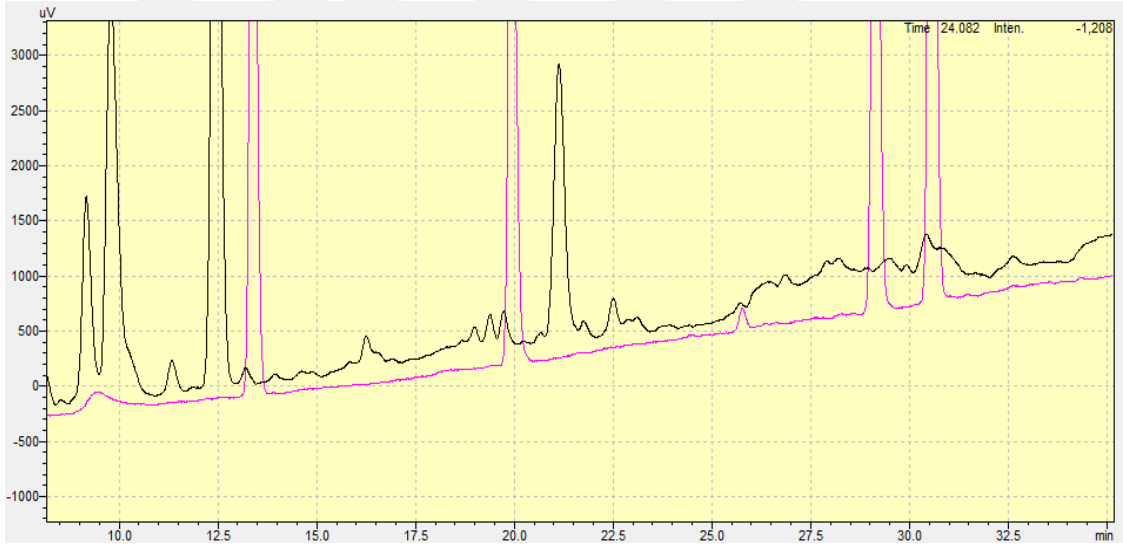
Şekil 3.35 1 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



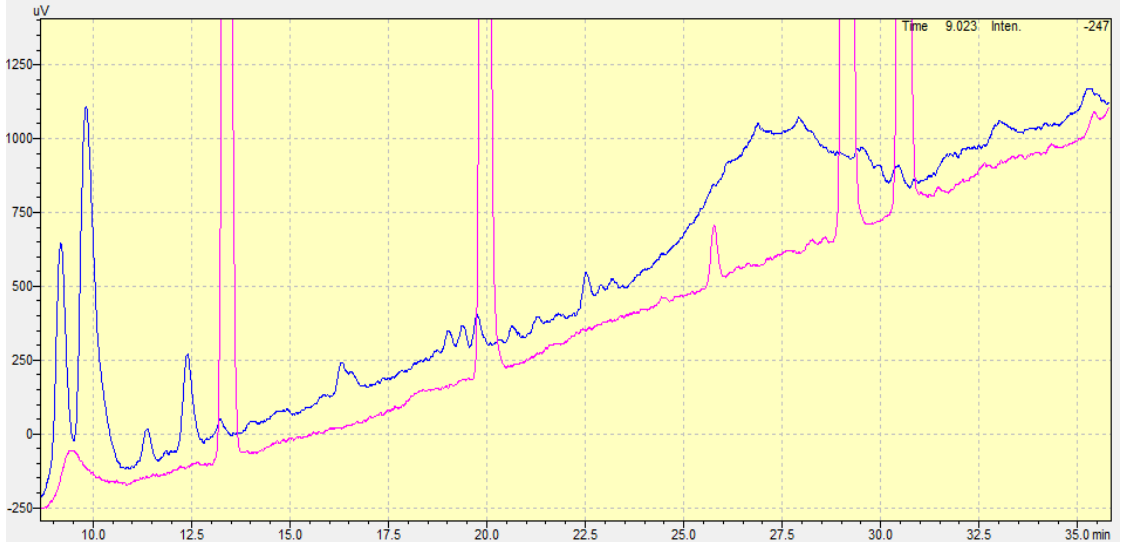
Şekil 3.36 1 nolu metanolla viiallenen (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



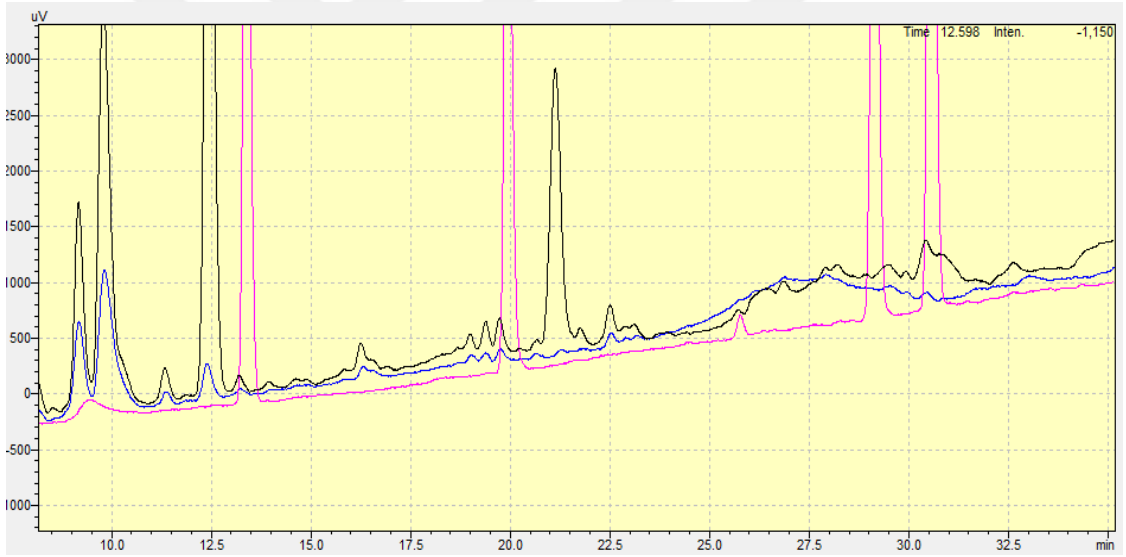
Şekil 3.37 1 nolu (siyah), metanolla viallenmiş 1 nolu (pembe) eluantların ve standart bileşiklerin (mavi) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.38 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları. kodlu fraksiyon kromatogramı.



Şekil 3.39 2 nolu metanolle viallenen (mavi) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

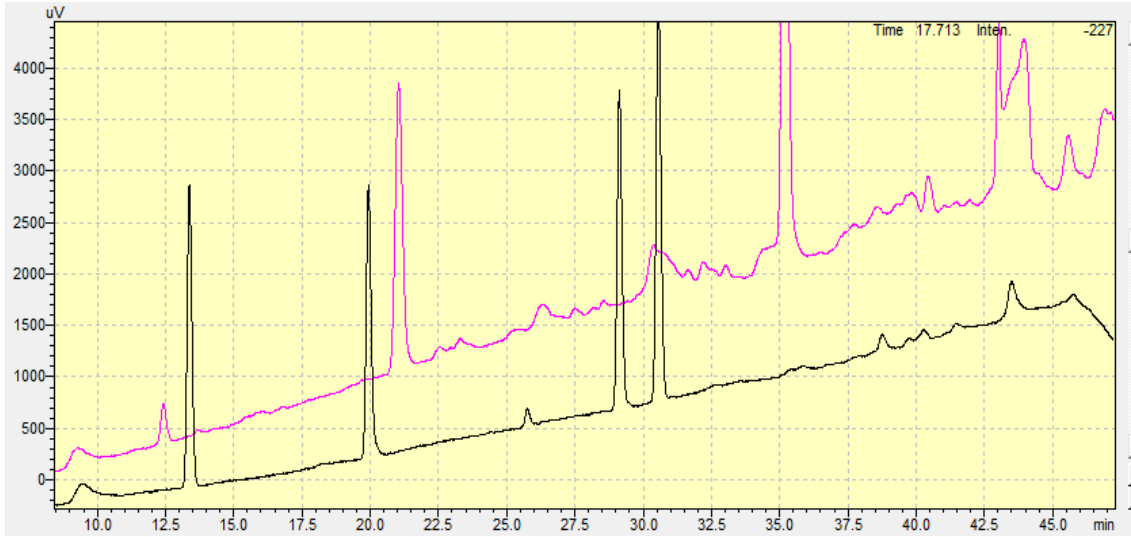


Şekil 3.40 2 nolu (siyah), metanolle viallenmiş 2 nolu (mavi) eluantların ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

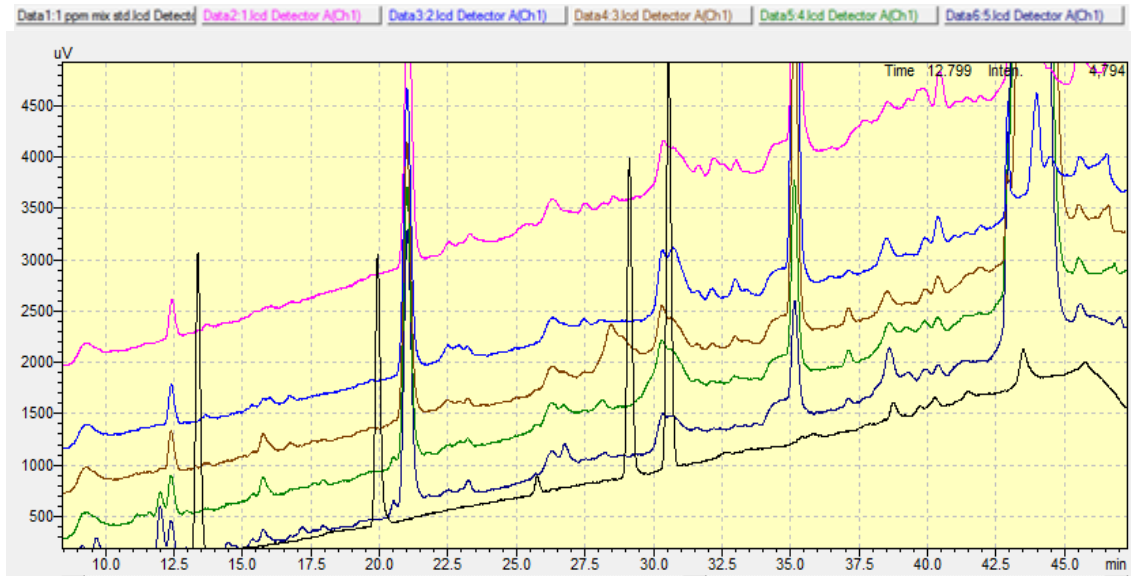
Bu yöntemde paklitaksel bölgesinde paklitaksel piki belirgin olmakla beraber diğer bileşenler ile birlikte omuzlu olarak geldiğinden ayırım iyi gözlenememiştir. Yöntemin başarısız olması üzerine tekrar iki adet deneme daha gerçekleştirilmiş olmasına rağmen yine başarısız sonuç alınmıştır.

3.1.2.3 Aseton: Hekzan 0,1ml - 1 ml Ekstereli Deneme (İzokratik Yöntem)

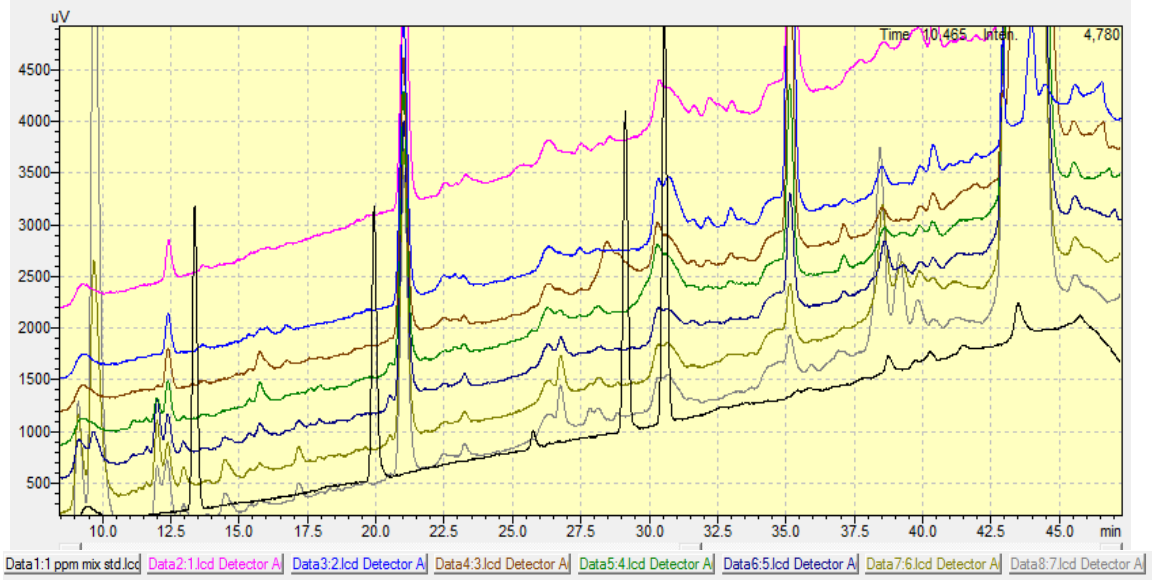
Hazırlanan stok ekstreden 0,1 ml ekstrakt alındı üzerine silika kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune A: H (35: 65) ile dengelenen kolona yüklendi ve aynı eluantla izokratik sistem kurularak yürütme işlemi gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 1 er ml olacak şekilde 54 fraksiyon toplandı. Bu fraksiyonlarda 1-27 arası ekstreden 0,1 ml alınarak 28-54 arası ekstreden 1 ml alınıp kolonda yürütülerek gerçekleştirildi. Bu fraksiyonlara HPLC analizi yapıldı.



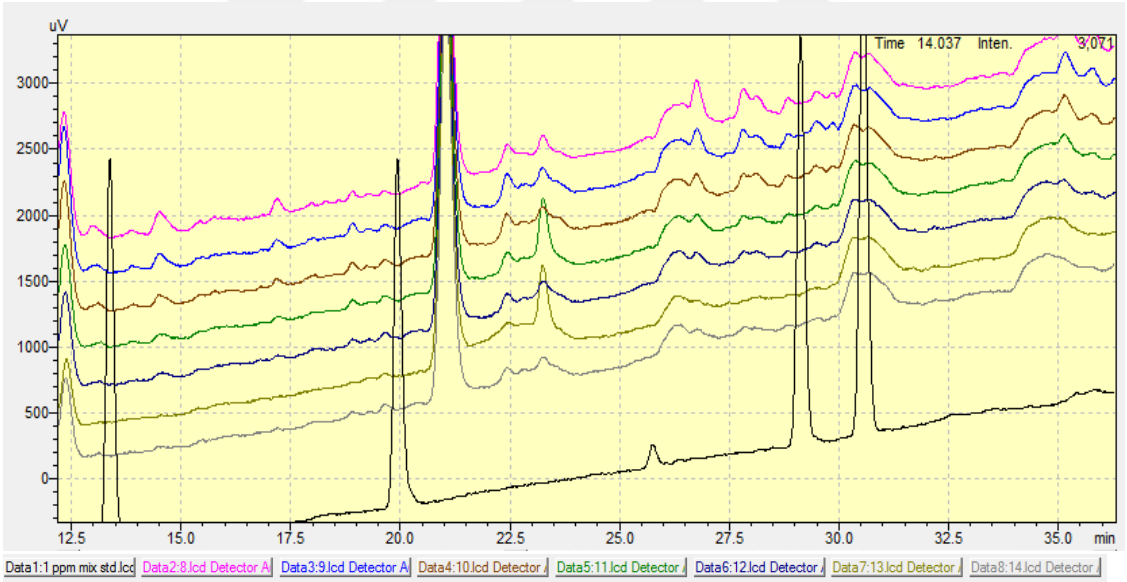
3.411 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



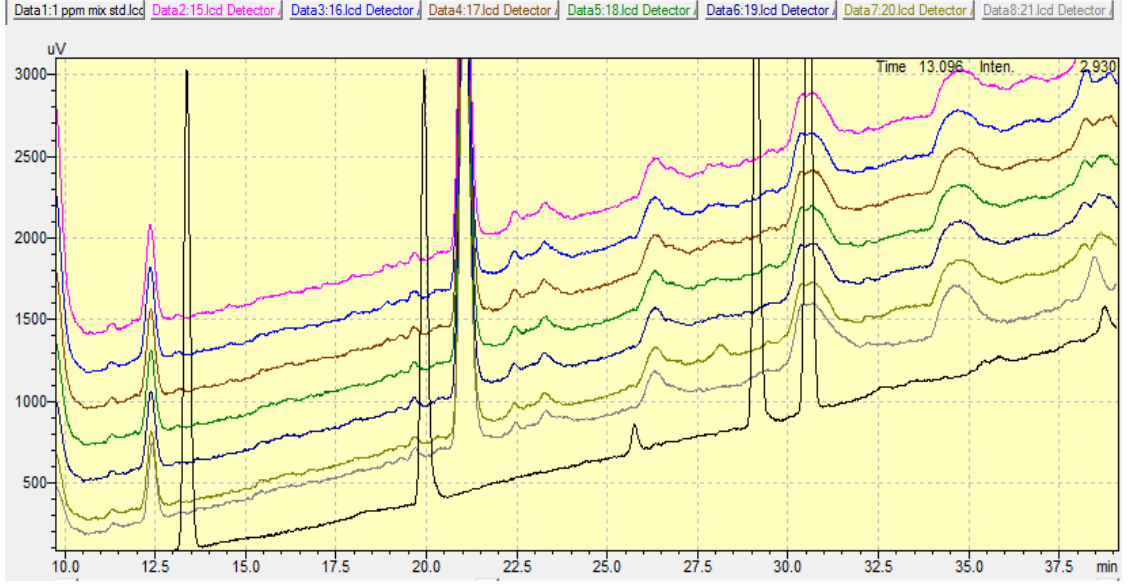
Şekil 3.42 1 nolu (pembe), 2 nolu (mavi), 3 nolu (kahverengi), 4 nolu (yeşil), 5 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



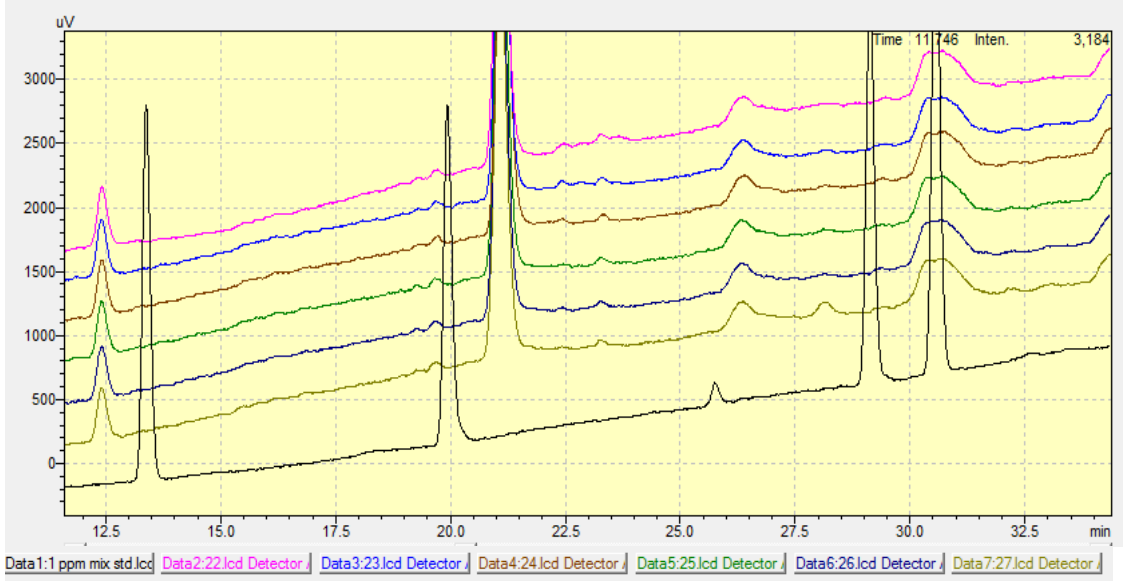
Şekil 3.43 1 nolu (pembe), 2 nolu (mavi), 3 nolu (kahverengi), 4 nolu (yeşil), 5 nolu (lacivert), 6 nolu (koyu sarı), 7 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



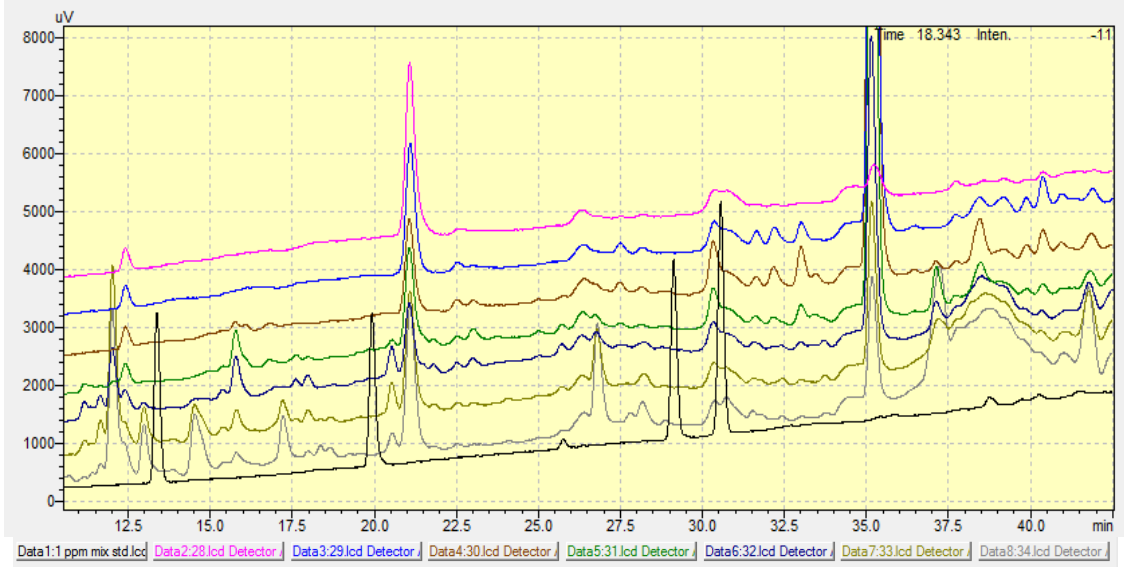
Şekil 3.44 8 nolu (pembe), 9 nolu (mavi), 10 nolu (kahverengi), 11 nolu (yeşil), 12 nolu (lacivert), 13 nolu (koyu sarı), 14 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



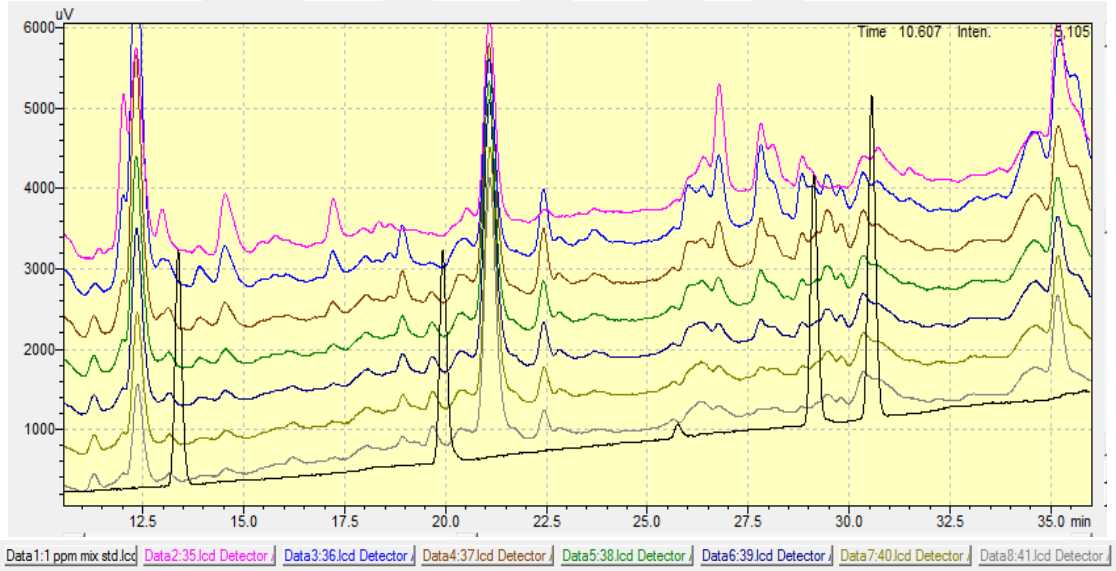
Şekil 3.45 15 nolu (pembe), 16 nolu (mavi), 17 nolu (kahverengi), 18 nolu (yeşil), 19 nolu (lacivert), 20 nolu (koyu sarı), 21 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



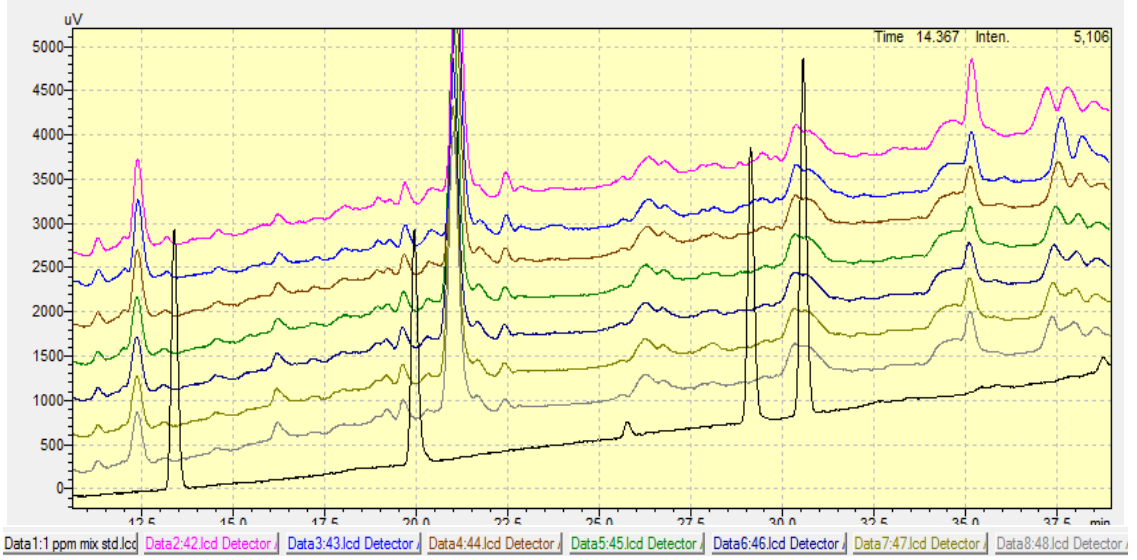
Şekil 3.46 22 nolu (pembe), 23 nolu (mavi), 24 nolu (kahverengi), 25 nolu (yeşil), 26 nolu (lacivert), 27 nolu (koyu sarı) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



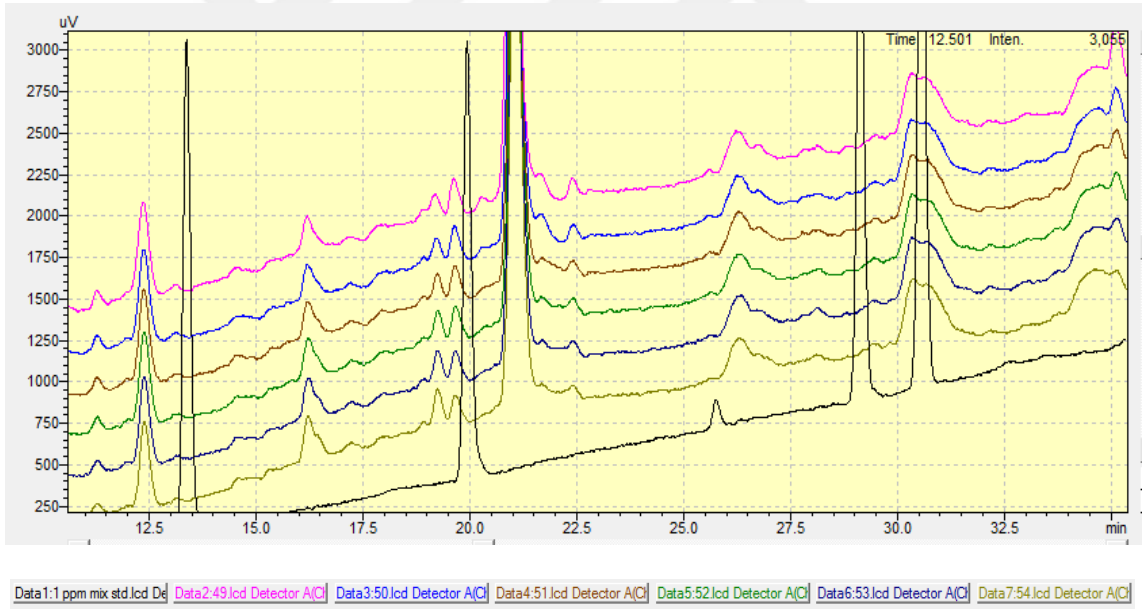
Şekil 3.47 28 nolu (pembe), 29 nolu (mavi), 30 nolu (kahverengi), 31 nolu (yeşil), 32 nolu (lacivert), 33 nolu (koyu sarı), 34 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.48 35 nolu (pembe), 36 nolu (mavi), 37 nolu (kahverengi), 38 nolu (yeşil), 39 nolu (lacivert), 40 nolu (koyu sarı), 41 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.49 42 nolu (pembe), 43 nolu (mavi), 44 nolu (kahverengi), 45 nolu (yeşil), 46 nolu (lacivert), 47 nolu (koyu sarı), 48 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



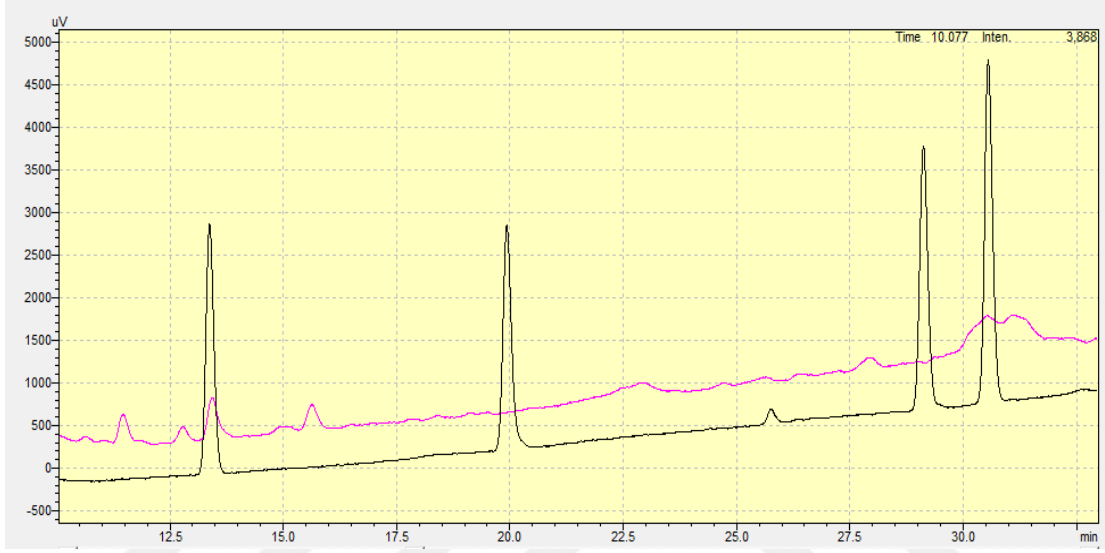
Şekil 3.50 49 nolu (pembe), 50 nolu (mavi), 51 nolu (kahverengi), 52 nolu (yeşil), 53 nolu (lacivert), 54 nolu (koyu sarı) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.

Tüm fraksiyonların analizlerinde paklitaksel yanındaki bileşenden tam olarak ayrılmadığı için bu yöntemin başarısız olduğuna kanaat getirilmiştir.

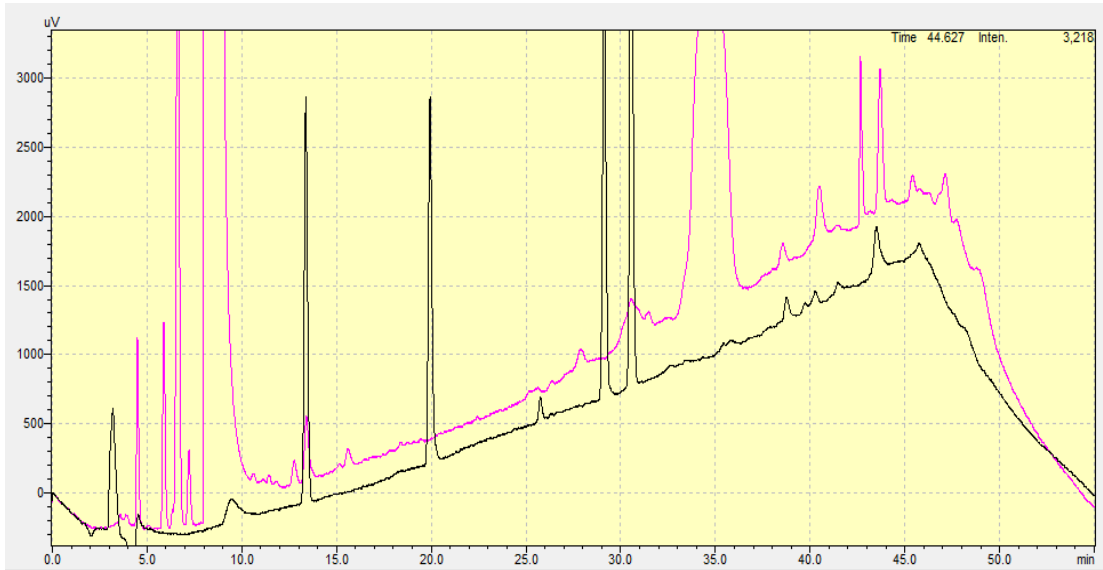
3.1.3 FLORİSİL KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI

3.1.3.1 Etilasetat: Hekzan Deneme (İzokratik Yöntem)

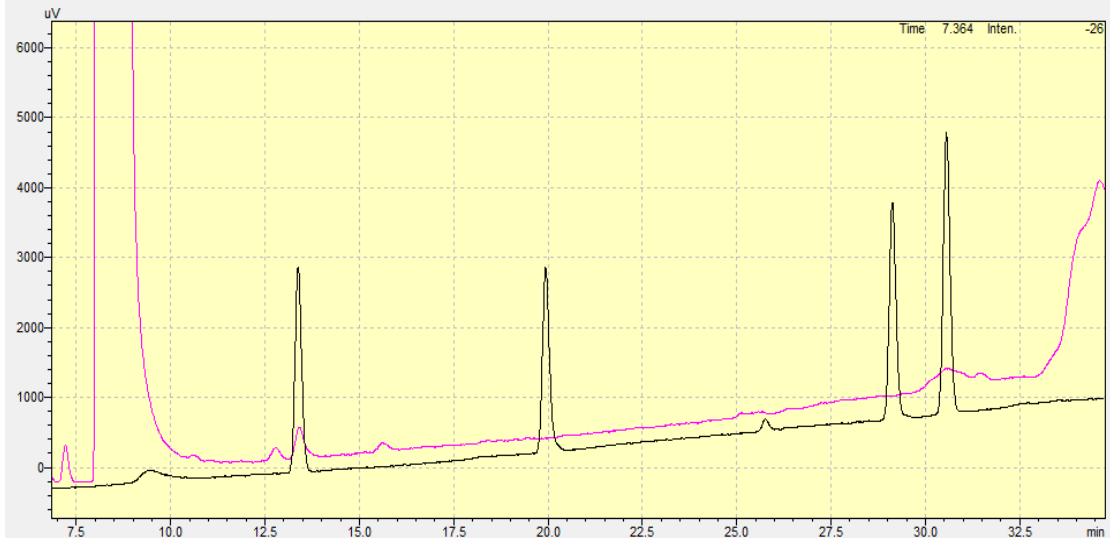
Hazırlanan ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine florisil kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune hazırlanan florisil kolonuna yüklendi. Elüent olarak etilasetat: hekzan (30:70) kullanıldı. İzokratik yöntemle fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde toplandı. Fraksiyonlar analiz edildi.



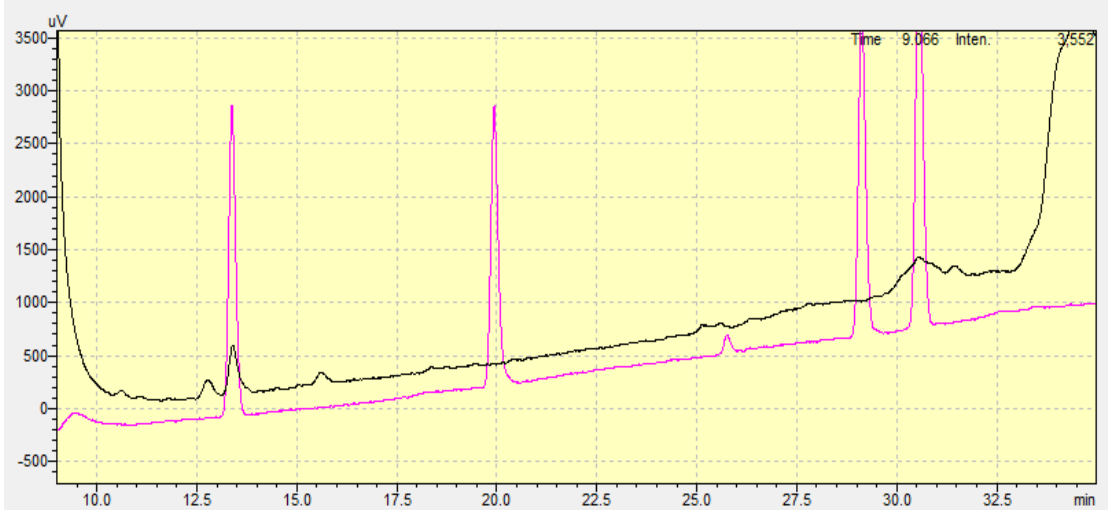
Şekil 3.51 3 nolu (pembe) eluanın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



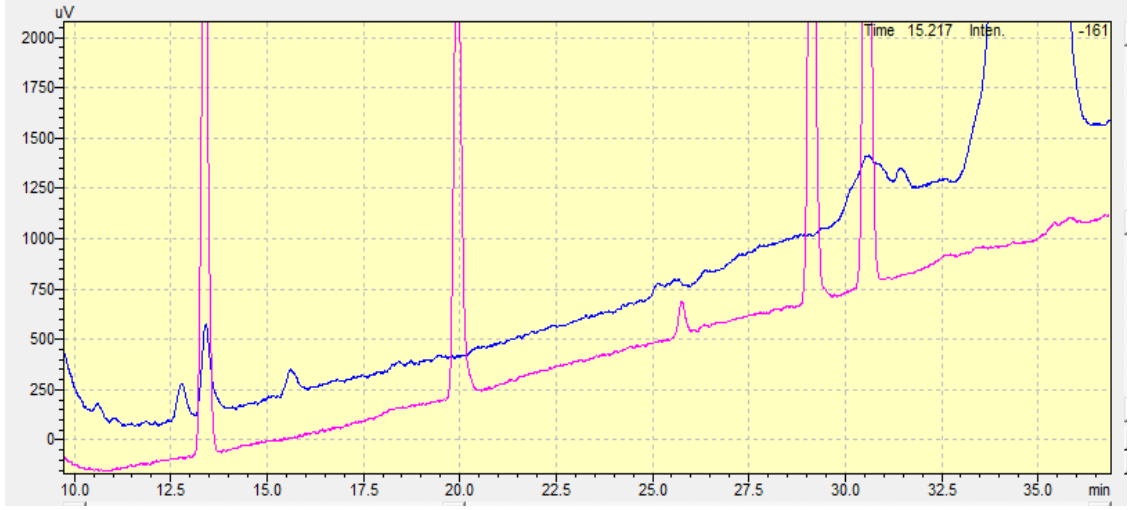
Şekil 3.52 7 nolu (pembe) eluanın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.53 10 nolu (pembe) eluanın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



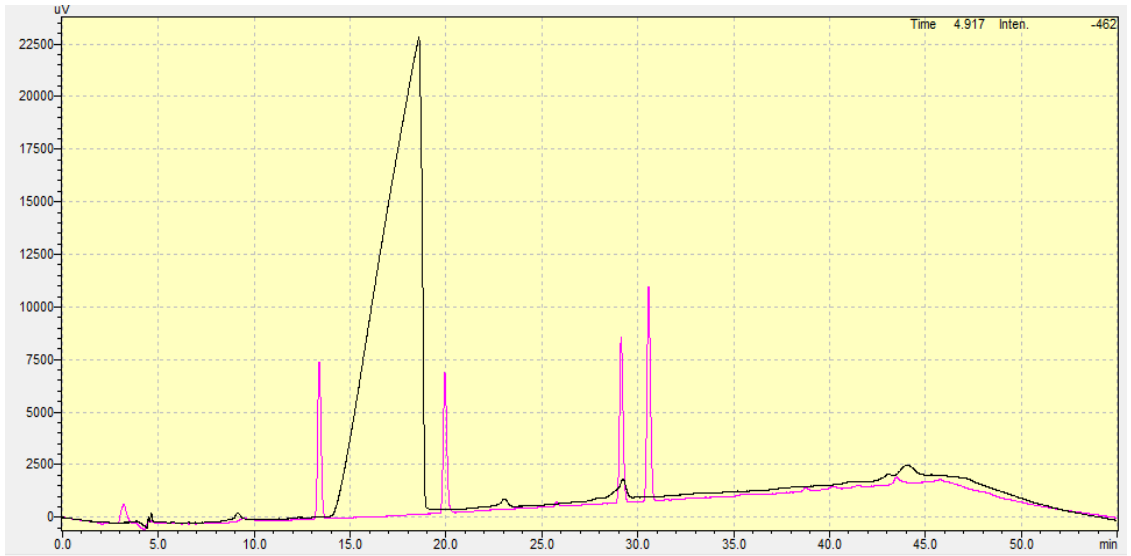
Şekil 3.54 13 nolu (siyah) eluanın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



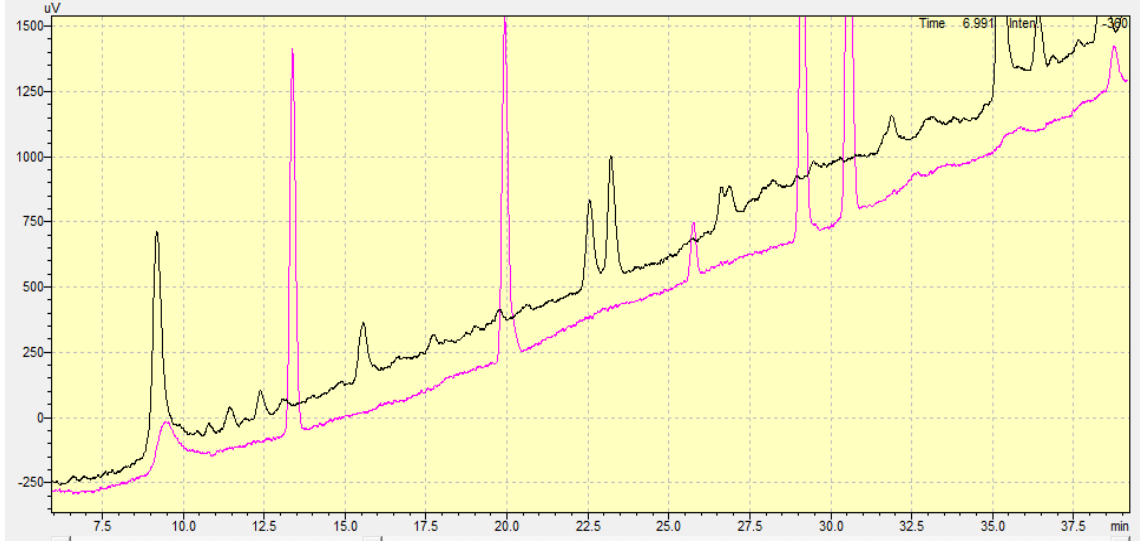
Şekil 3.55 15 nolu (mavi) eluanın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

3.1.3.2 DCM: Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)

Ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine florisil kolon dolgu maddesi eklenerek evapor edildi. Toz haline gelen numune hazırlanan florisil kolona yüklendi. Elüent olarak DCM: metanol (98,5:1,5) izokratik sistemi tercih edildi. Fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde 25 fraksiyon toplandı. Bu fraksiyonlardan 10., 15., 20. fraksiyonlar analiz edildi. 10. Fraksiyonun kromatogramı aşağıdaki gibidir. Bu yöntemde kromatografik ayırım metodu başarısız olmuştur.



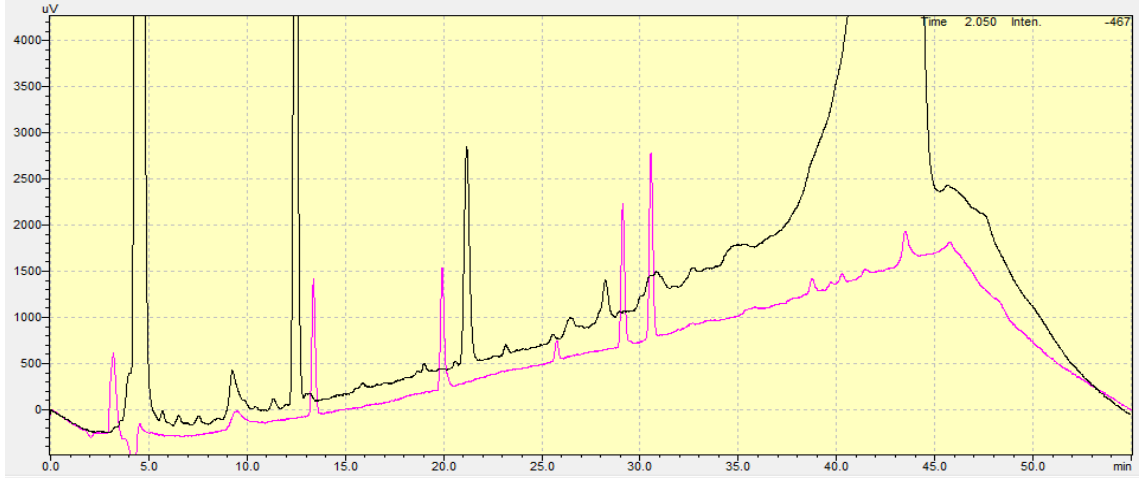
Şekil 3.56 10 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



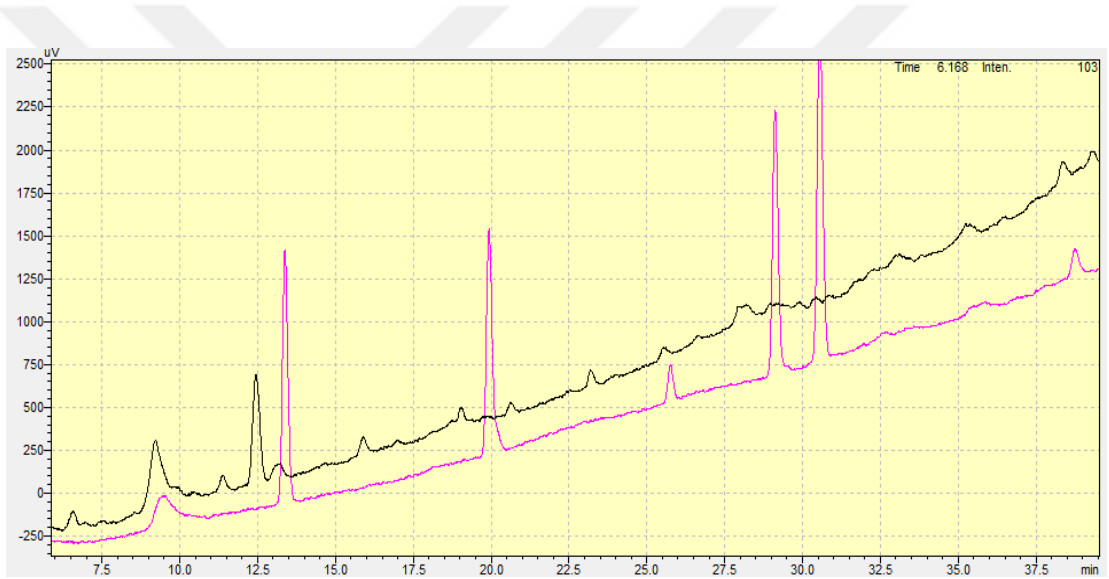
Şekil 3.57 10 nolu metanolle viallenen (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

3.1.3.3 Aseton: Hekzan Denemesi (İzokratik Yöntem)

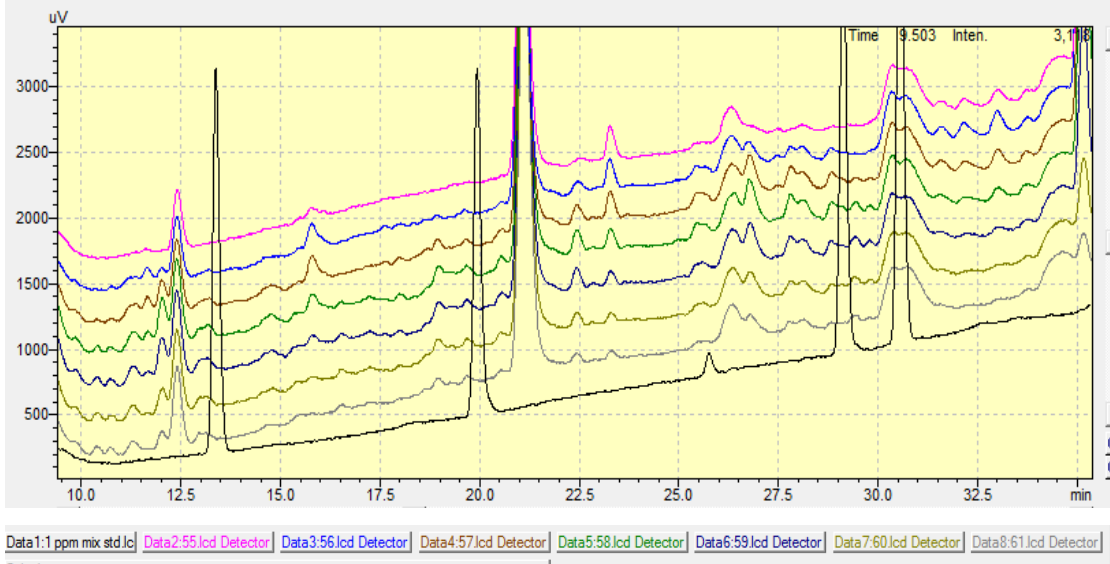
Ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune aseton: heksan (35: 65) çözeltileriyle dengelenen florisil kolona yüklendi. Sistem izokratik olarak yürütüldü. Fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde 25 fraksiyon toplandı. 10. fraksiyon analiz edildi. Bu denemeye ek olarak florisil kolon Aseton: Hekzan denemesinde hazırlanan stok çözeltilerden 0,1 ml ve 1 ml ekstre alınarak kolona yükleme yapıldı. 55-79 nolu arası toplanan fraksiyonlar 0,1 ml ekstrenin kolona yüklenip toplanmasıyla; 80-106 nolu arası toplanan fraksiyonlar ise 1 ml ekstrenin kolona yüklenip toplanmasıyla analiz edilmiştir.



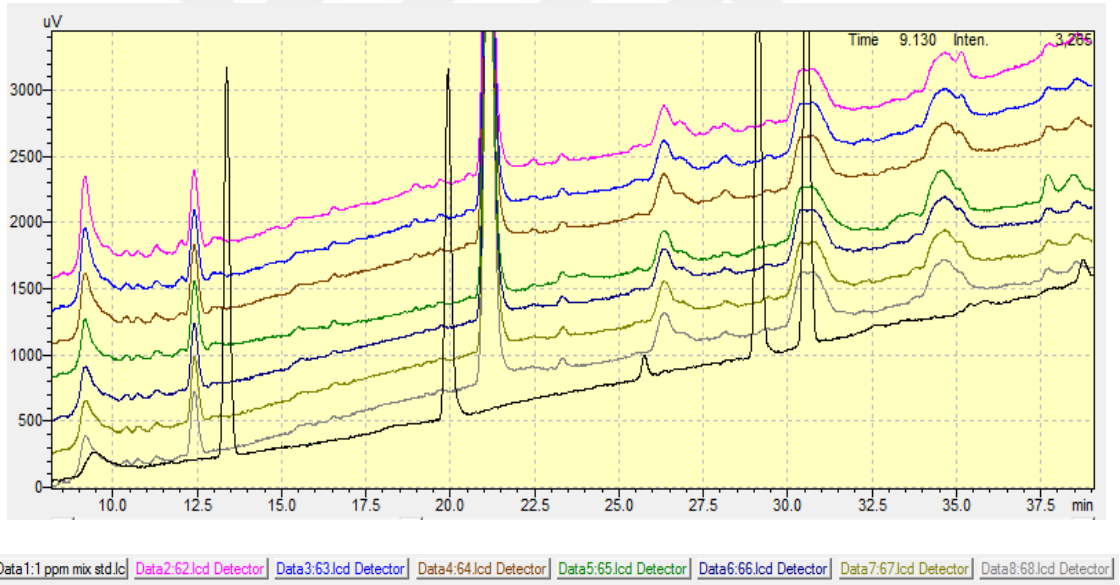
Şekil 3.58 Aseton:Hekzan 10 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



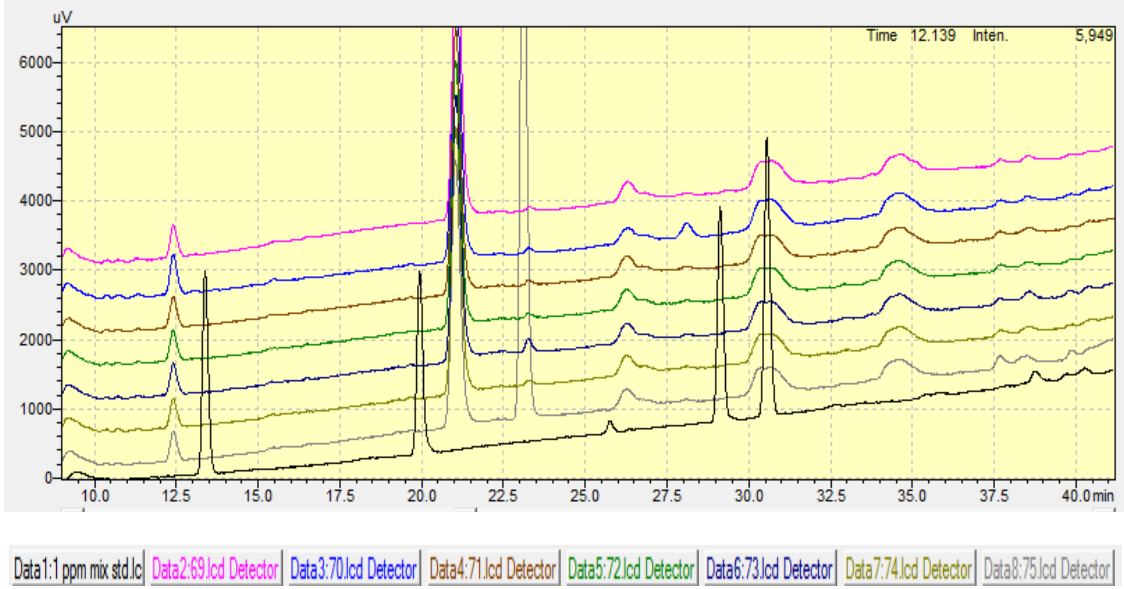
Şekil 3.59 Aseton: Hekzan 10 nolu metanolle viiallenen (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



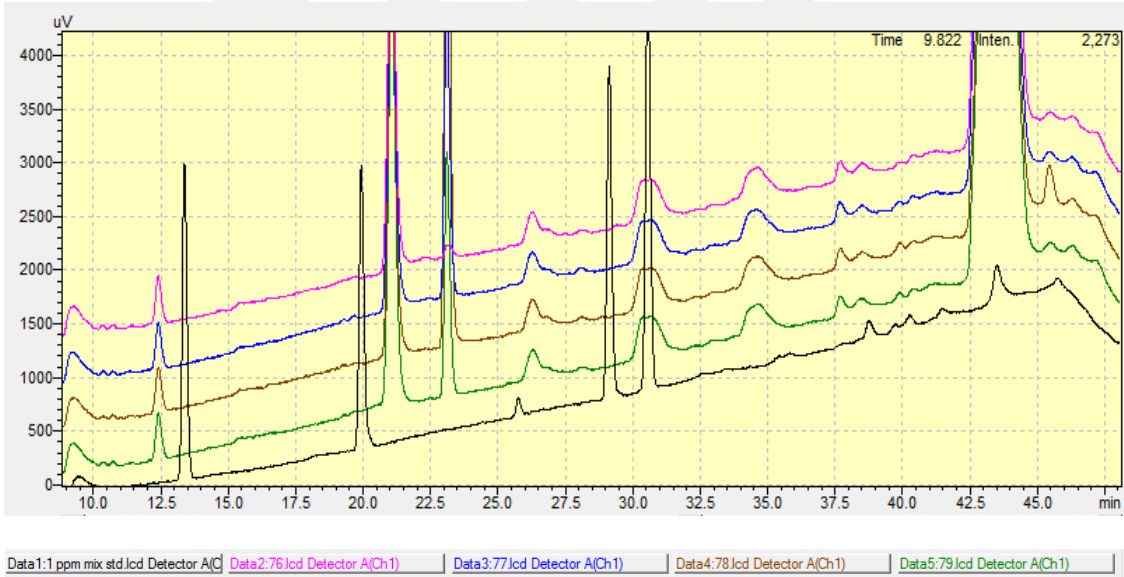
Şekil 3.60 55 nolu (pembe), 57 nolu (kahverengi), 58 nolu (yeşil), 59 nolu (lacivert), 60 nolu (koyu sarı), 61 nolu (gri) 10 nolu (siyah) eluanlatların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



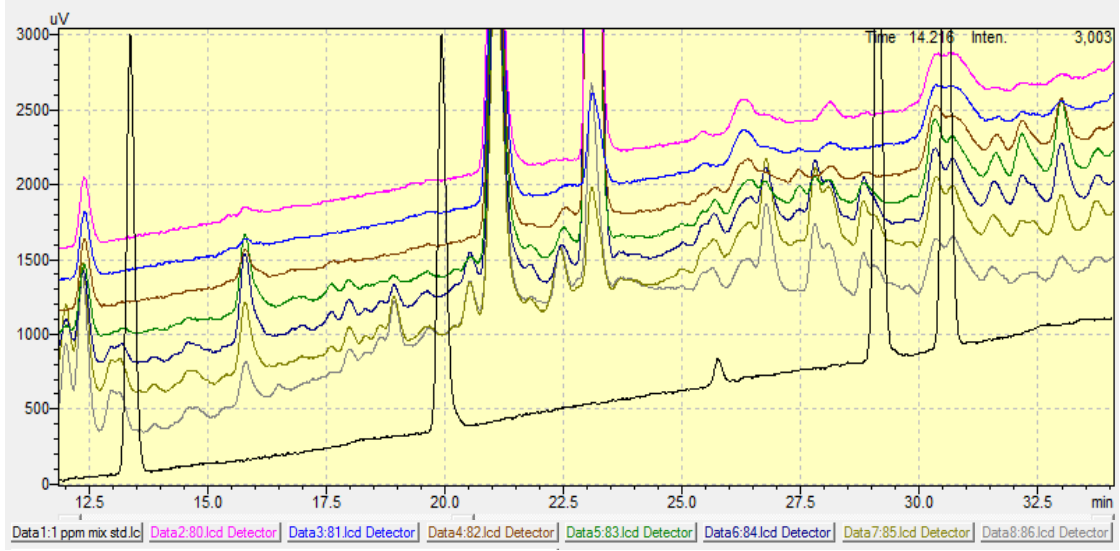
Şekil 3.61 62 nolu (pembe), 63 nolu (mavi), 64 nolu (kahverengi), 65 nolu (yeşil), 66 nolu (lacivert), 67 (koyu sarı), 68 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



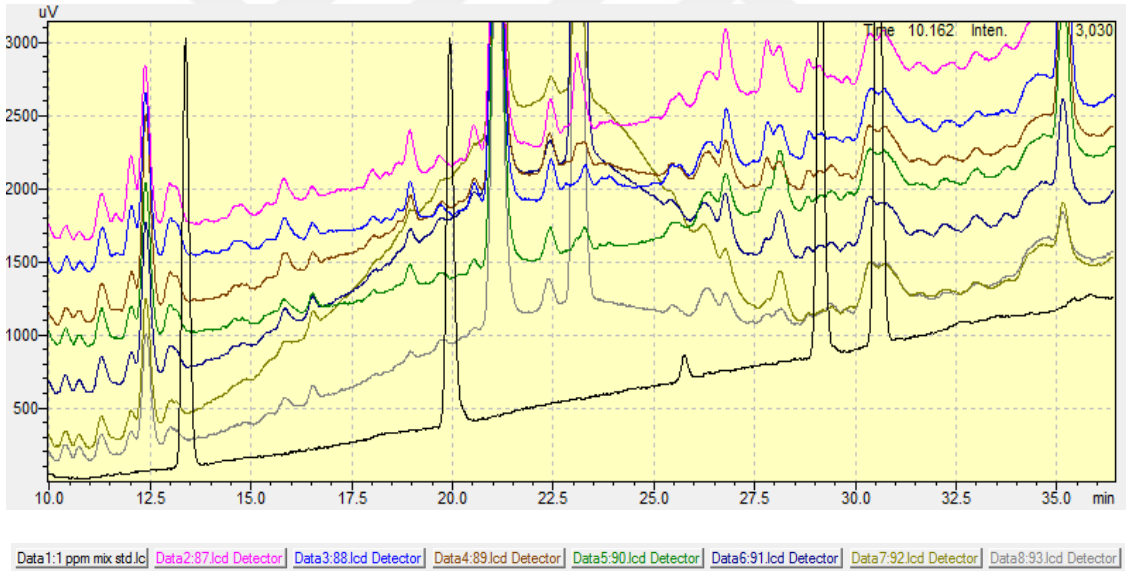
Şekil 3.62 69 nolu (pembe), 70 nolu (mavi), 71 (kahverengi), 72 nolu (yeşil), 73 nolu (lacivert), 74 nolu (koyu sarı), 75 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



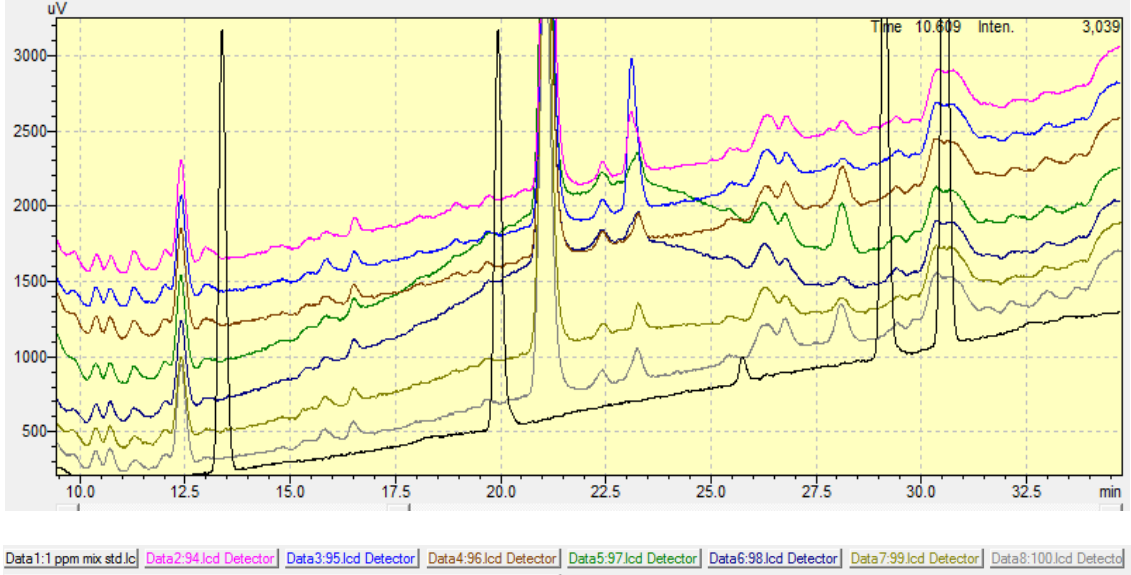
Şekil 3.63 76 nolu (pembe), 77 nolu (mavi), 78 nolu (kahverengi), 79 nolu (yeşil) 10 eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



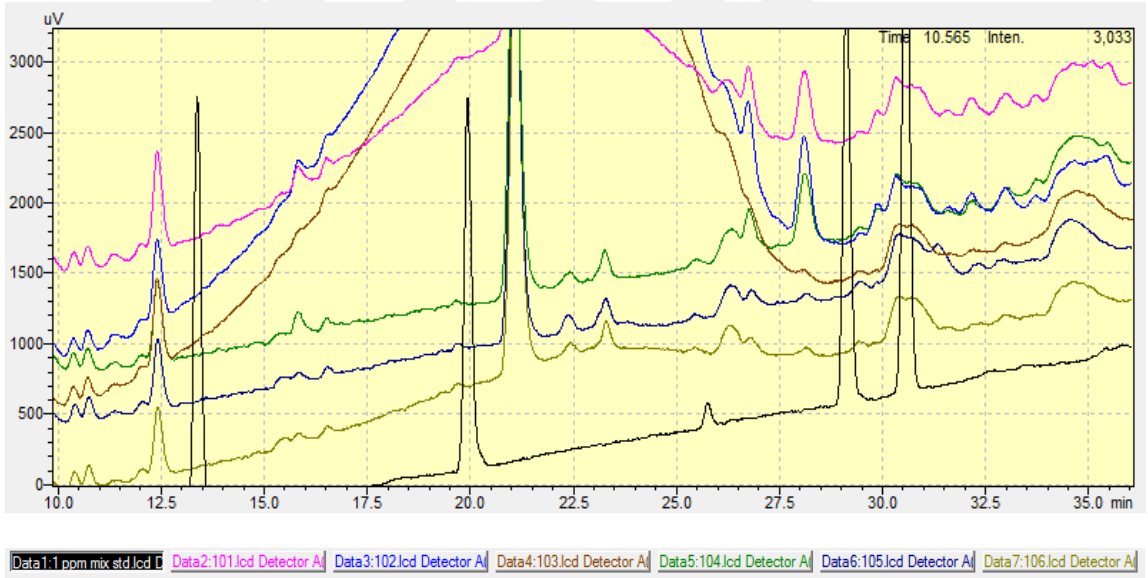
Şekil 3.64 80 nolu (pembe), 81 nolu (mavi), 82 nolu (kahverengi), 83 nolu (yeşil), 84 nolu (lacivert), 85 nolu (koyu sarı), 86 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.65 87 nolu (pembe), 88 nolu (mavi), 89 nolu (kahverengi), 90 nolu (yeşil), 91 nolu (lacivert), 92 nolu (koyu sarı), 93 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.66 94 nolu (pembe), 95 nolu (mavi), 96 nolu (kahverengi), 97 (yeşil), 98 (lacivert), 99 nolu (koyu sarı), 100 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



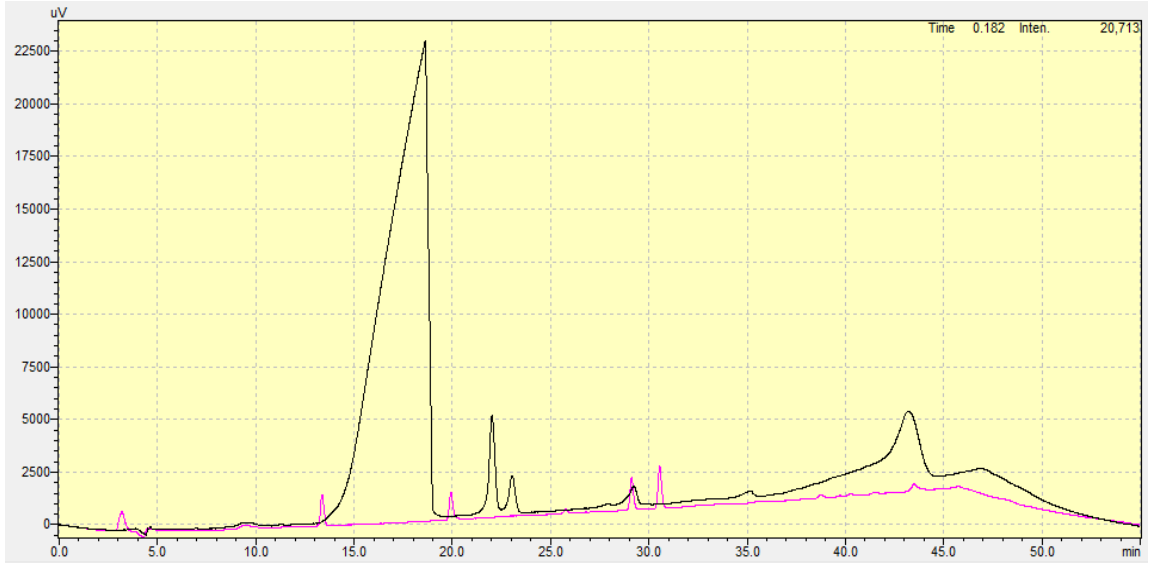
Şekil 3.67 101 nolu (pembe), 102 nolu (mavi), 103 nolu (kahverengi), 104 nolu (yeşil), 105 nolu (lacivert), 106 nolu (koyu sarı) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.

Tüm analizlerde paklitaksel bölgesi omuzlu olarak gelmiştir. 1 ml'lik hazırlanan ekstreden elde ettiğimiz sonuçlarda omuzlanma daha net gözlenirken 0,1 nl' lik ekstrede omuzlanma yayvandır. Fındık kabuğunda miktarca az bulunun paklitakselin tayininde 0,1 ml' lik ekstreden madde çekiminin daha zor olduğu gözlenmiştir.

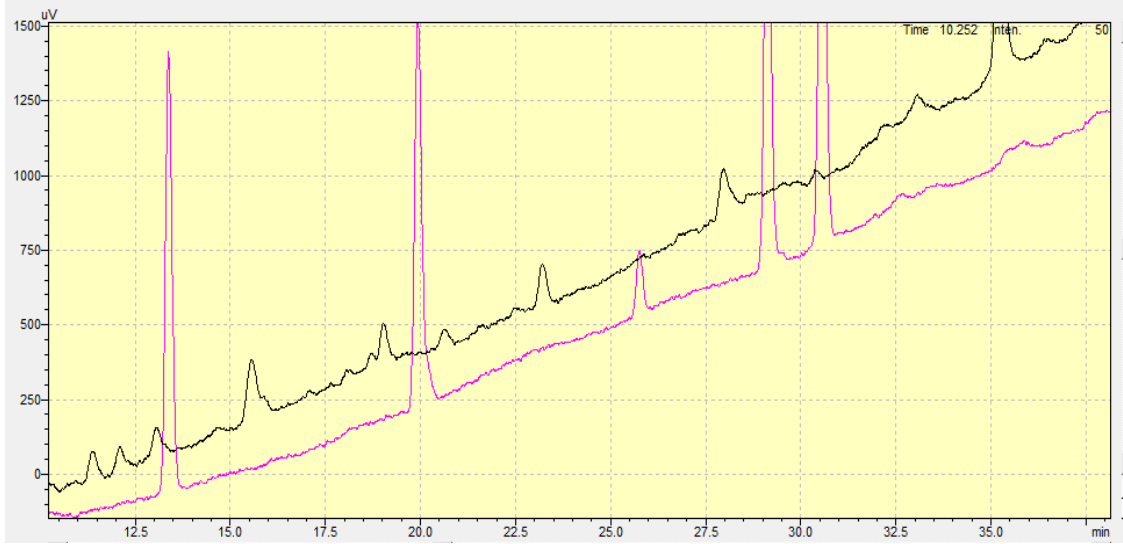
3.1.4 ALÜMİNYUM OKSİT KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI

3.1.4.1 DCM: Metanol Denemesi (İzokratik Yöntem)

Ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine alüminyum oksit kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune DCM: metanol yardımıyla hazırlanan alüminyum oksit kolona yüklendi. Eluent olarak DCM: Metanol izokratik olacak şekilde kullanıldı. Fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde 25 fraksiyon toplandı. 10. fraksiyon analiz edildi. Sonuçlara göre viallerdeki fraksiyonlar metanolle tekrar viallenerek analiz edildi. Aşağıda kromatogramları gösterildi.



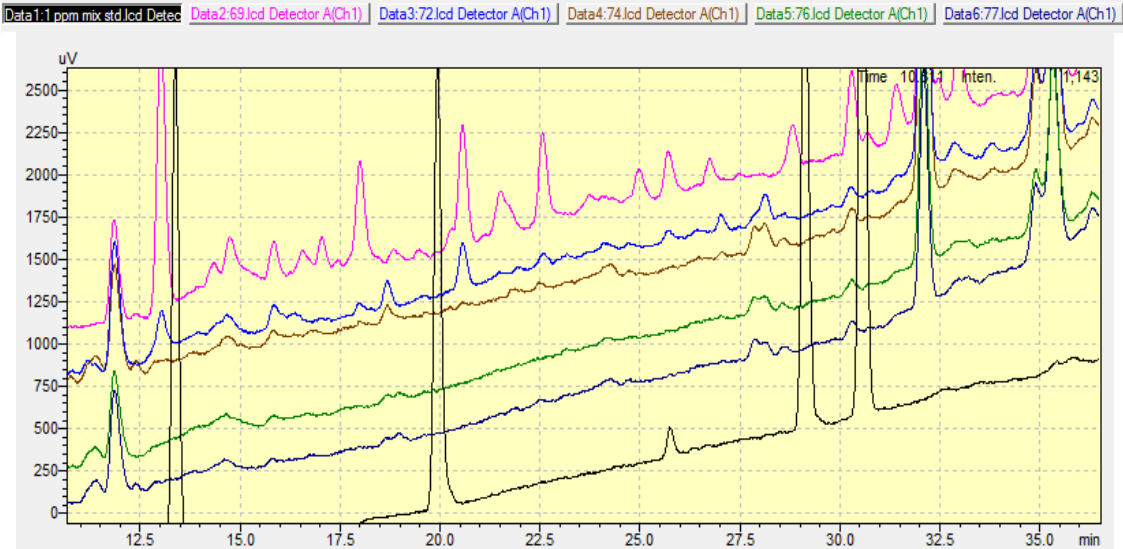
Şekil 3.68 10 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



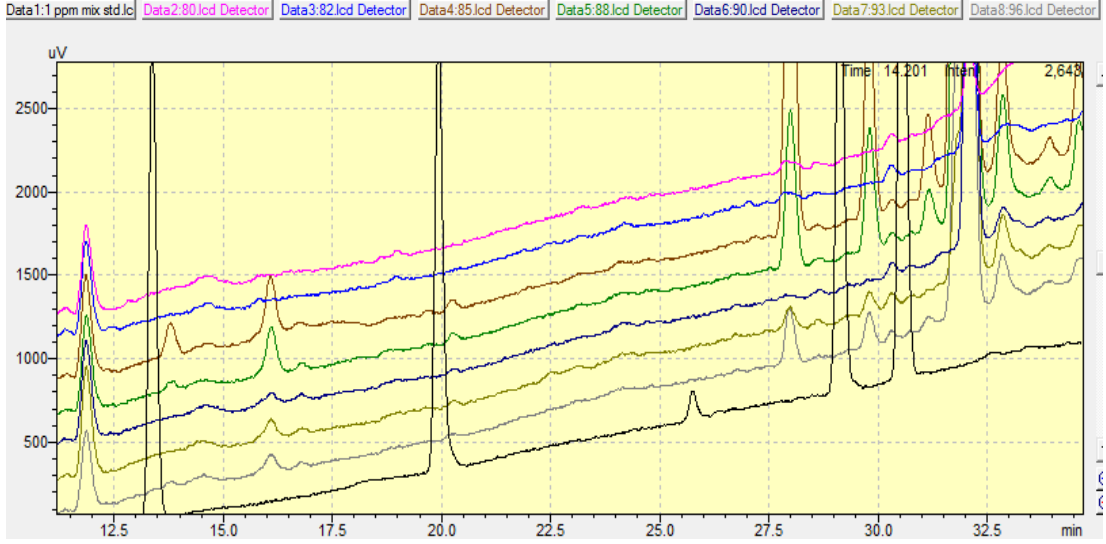
Şekil 3.69 10 nolu metanolle viallenen (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

3.1.4.2 Etilasetat: Hekzan Denemesi (İzokratik Yöntem)

Hazırlanan ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Alüminyum oksit dolgu maddesi ve etilasetat: heksan (30:70) ile kolon kuruldu. Toz haline gelen numune hazırlanan kolonuna yüklendi. Elüent olarak etilasetat- heksan kullanıldı. Fraksiyon toplama işlemi izokratik olarak gerçekleştirildi. Toplanan fraksiyonlara 67-96 arası numaralar verildi. Bu fraksiyonlardan 69, 72, 74, 76, 77, 80, 82, 85, 88, 90, 93, 96 nolu fraksiyonlar analiz edildi.



Şekil 3.70 69 nolu (pembe), 72 nolu (mavi), 74 nolu (kahverengi), 76 nolu (yeşil), 77 nolu (lacivert) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.71 80 nolu (pembe), 82 nolu (mavi), 85 nolu (kahverengi), 88 nolu (yeşil), 90 nolu (lacivert), 93 nolu (koyu sarı), 96 nolu (gri) eluantların ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.

3.2 TERS FAZ KOLON UYGULAMALARI

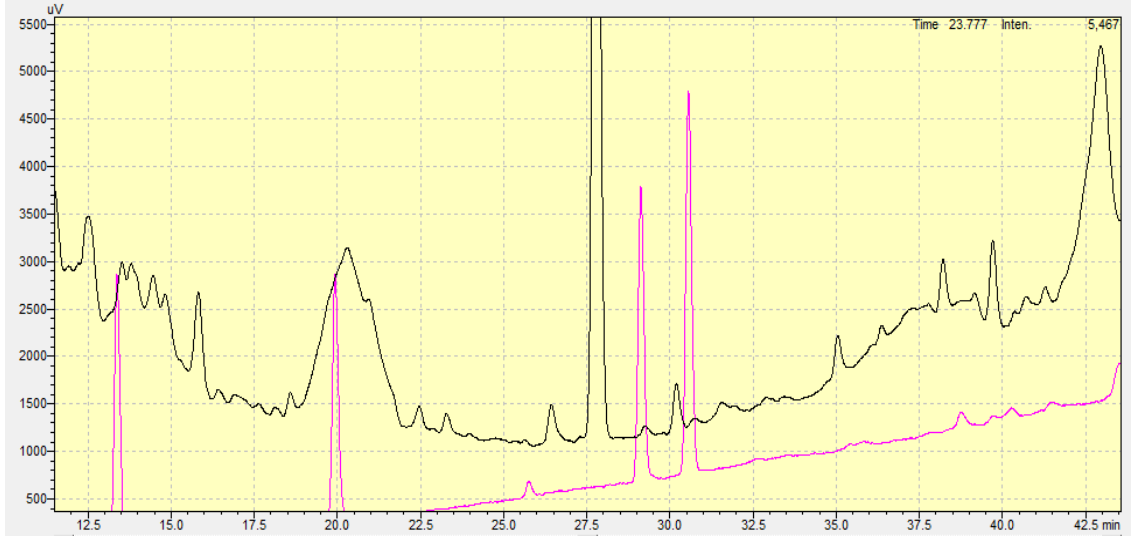
3.2.1 C8 KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI

3.2.1.1 Aseton: Toluen Denemesi (İzokratik Yöntem)

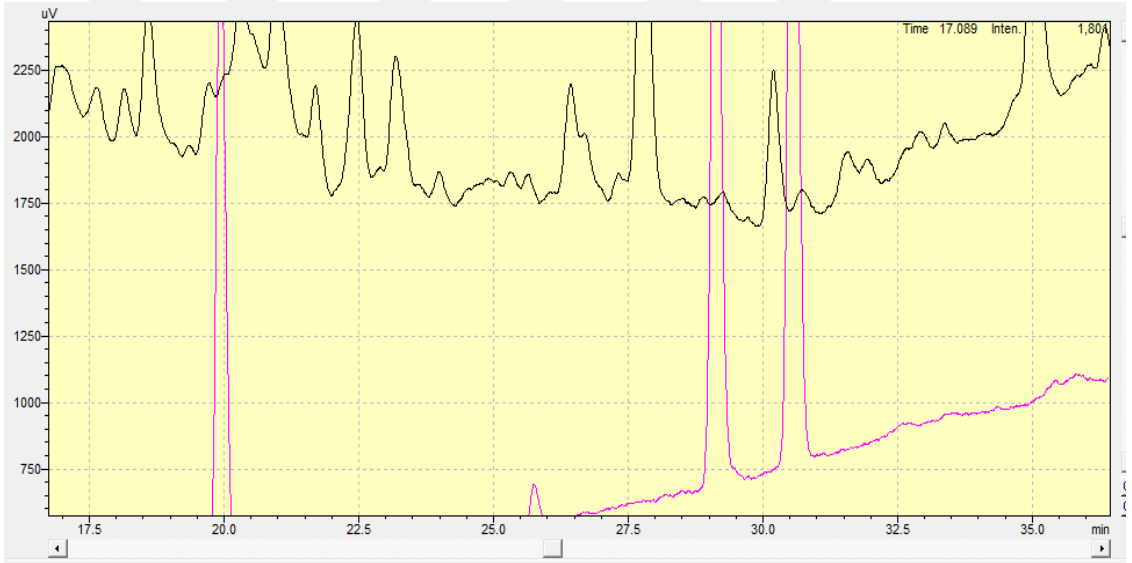
Hazırlanan ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine C8 kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune hazırlanan C8 kolonuna yüklendi. Kolon dengelenmesi aseton: toluen (70:30) çözelti karışımıyla gerçekleştirildi. Yürütme işlemleri de aynı çözücülerle izokratik olacak şekilde belirlendi. Fraksiyonlar 1 er ml olacak şekilde toplandı. İlk analiz sonuçlarına göre toplanan fraksiyonların birleştirilip tekrar analiz yapılmasına karar verildi. 1 er ml olarak toplanan 30 tüp numune sırasıyla 10 ar ml olacak şekilde birleştirilip 3 tüp numune elde edildi. 3 numuneye HPLC analizi yapıldı.

Çizelge 3.8 Aseton/ toluen izokratik yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
2	0,0233
3	0,0282



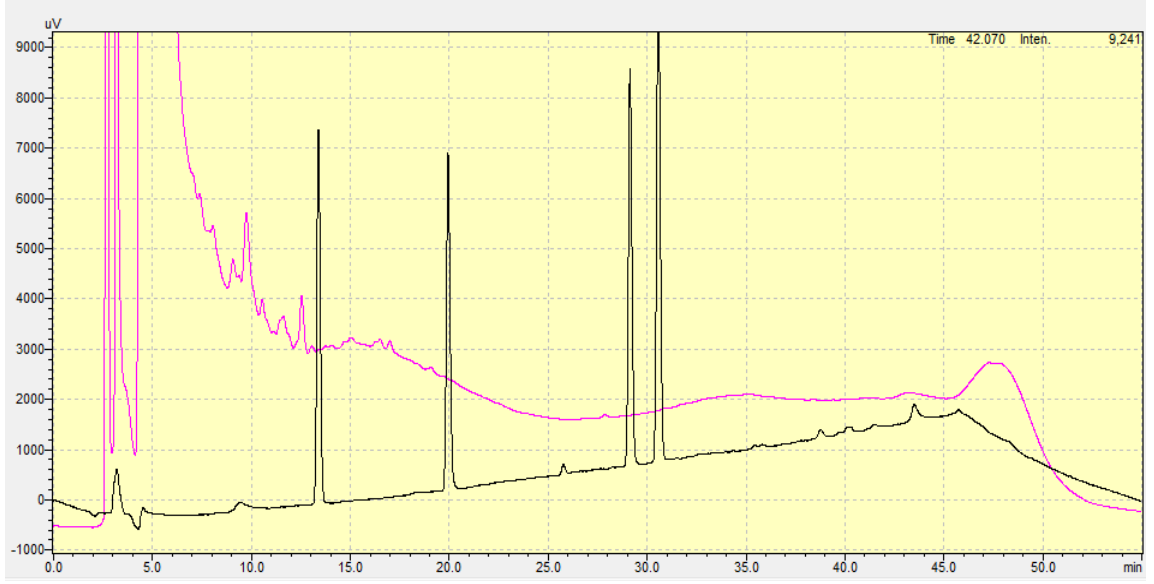
Şekil 3.72 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



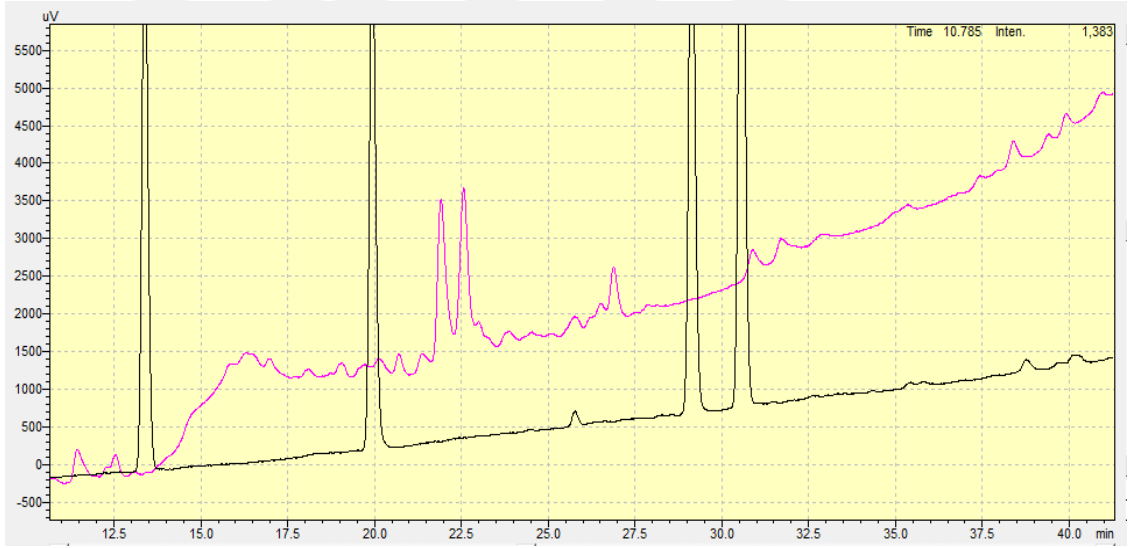
Şekil 3.73 3 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

3.2.1.2 Metanol: Su Denemesi (İzokratik Yöntem)

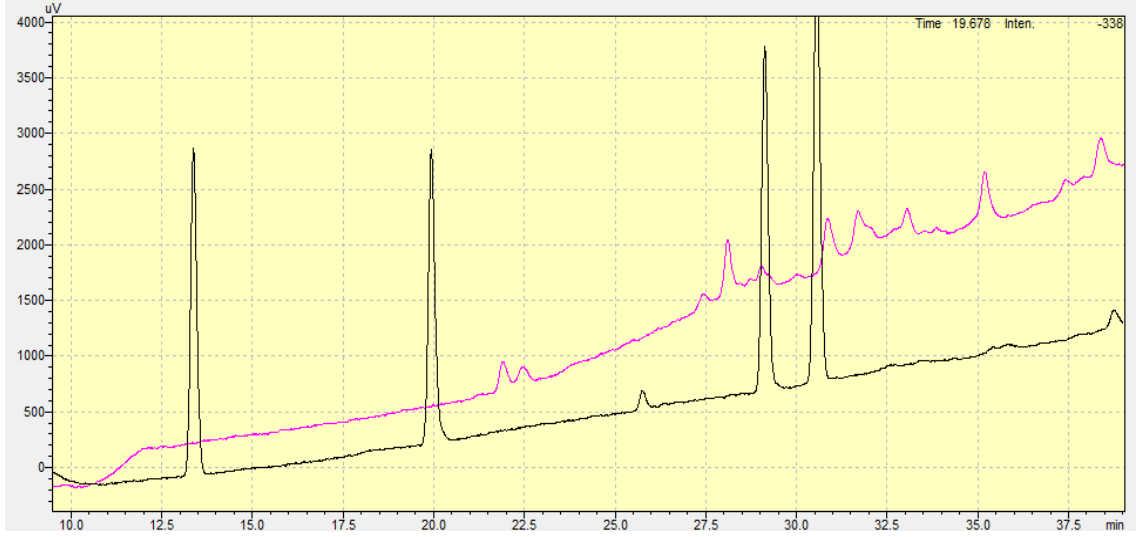
Hazırlanan ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine C8 kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune hazırlanan C8 kolonuna yüklendi. Elüent olarak metanol: su (65:35) izokratik olacak şekilde kullanıldı. Fraksiyonlar 5' er ml olacial şekilde aynı elüsyon çözeltisiyle toplandı. HPLC ile analiz edildi.



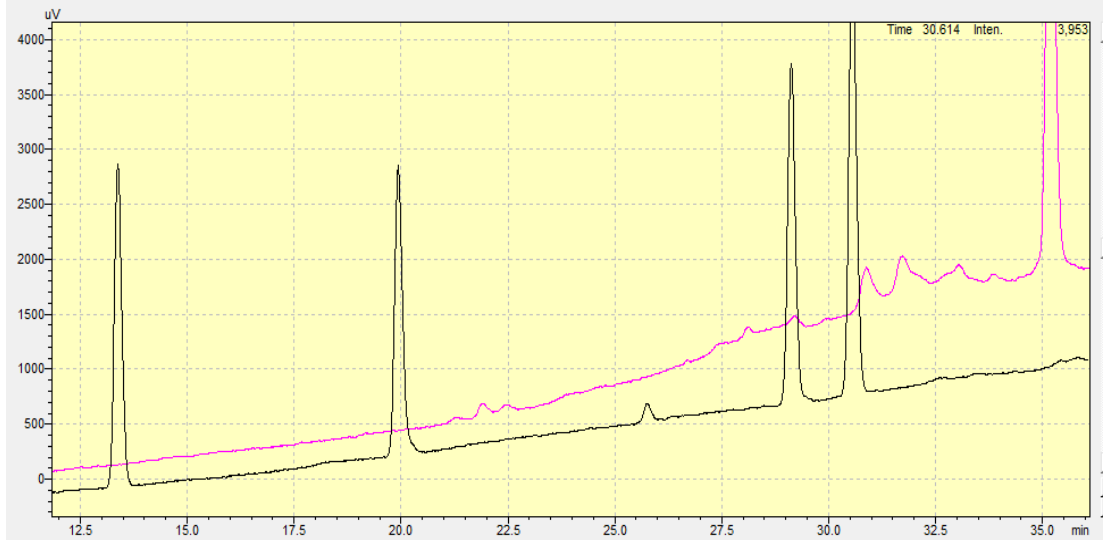
Şekil 3.74 1 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.75 2 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları..



Şekil 3.76 4 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.77 6 nolu (pembe) eluantın ve standart bileşiklerin (siyah) HPLC kromatogramları.

3.2.2 C18 KOLON UYGULAMALARI VE HPLC ANALİZ SONUÇLARI

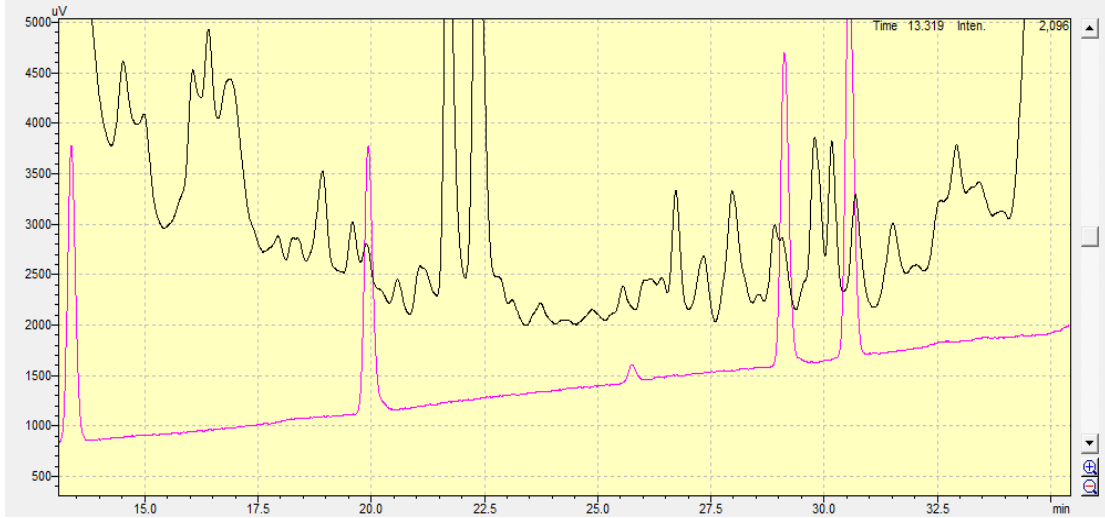
3.2.2.1 Aseton: Toluen Denemesi (İzokratik Yöntem)

Hazırlanan ekstreten 1 ml ekstrakt alındı üzerine C18 kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Kolon dolgu maddesi olarak %23' lük karbon içeren 40-63 µm boyutlu Silicycle marka dolgu maddesi kullanıldı. 70:30 oranında olarak belirlenen aseton: toluen çözelti karışımı hareketli faz olarak kullanıldı ve C18 kolon bu faz ile

dengeledi. Toz haline gelen numune hazırlanan C18 kolonuna yüklendi. Sistem izokratik olacak şekilde yürütüldü. Fraksiyonlar 2' şer ml olacak şekilde toplandı. İlk analizler neticesinde toplanan fraksiyonların birleştirilmesine ve analiz öncesinde evapore edilip metanol ile viallendikten sonra HPLC' ye yüklenmesine karar verildi böylelikle toplanan 20 fraksiyon ikiye ayrılarak birleştirildi ve evapore edilen birleştirilmiş fraksiyonlar metanol ile viallenmesinden sonra analiz yapıldı.

Çizelge 3.9 Aseton/ toluen izokratik yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel Geri kazanım verimi (ppm)
1	0,3090
2	0,0390



Şekil 3.78 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.79 2 (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

Elde edilen HPLC kromatogramlarına bakıldığında ayırımın iyi olduğu görülmektedir.

3.2.2.2 Aseton: Toluen Denemesi (İzokratik Yöntem)

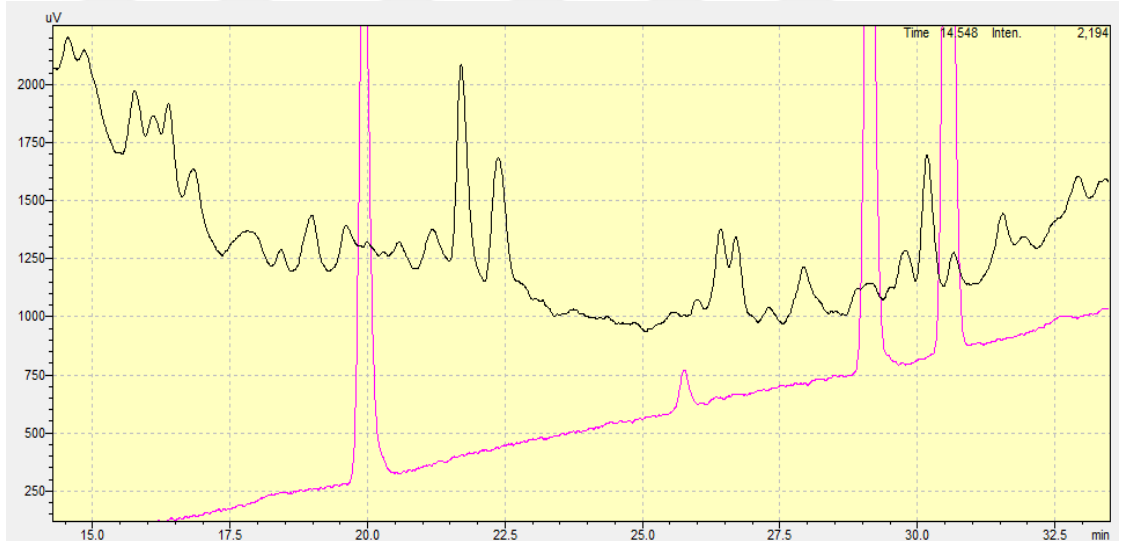
Hazırlanan ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine C18 (Fluka C18-reversed phase silika gel) kolon dolgu maddesi eklenerek evaporate edildi. Bu şekilde toz haline gelen numune aseton: toluen (70: 30) yardımıyla hazırlanan C18 kolonuna yüklendi. Fraksiyonlar aynı eluantla ve izokratik şekilde devam etti. Fraksiyonlar 3' er ml olacak şekilde toplandı. İlk analiz sonuçlarına göre birleştirilip evaporate edildikten sonra metanol ile viallendi. Toplanan 10 fraksiyon ikiye ayrılarak birleştirildi ve evaporate edilen birleştirilmiş fraksiyonlar metanol ile viallenmesinden sonra analiz yapıldı.

Çizelge 3.10 Aseton/ Toluen izokratik yöntem geri kazanım (ppm) değerleri.

Numune	Paklitaksel
	Geri kazanım verimi (ppm)
1	0,1976
2	0,0374



Şekil 3.80 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



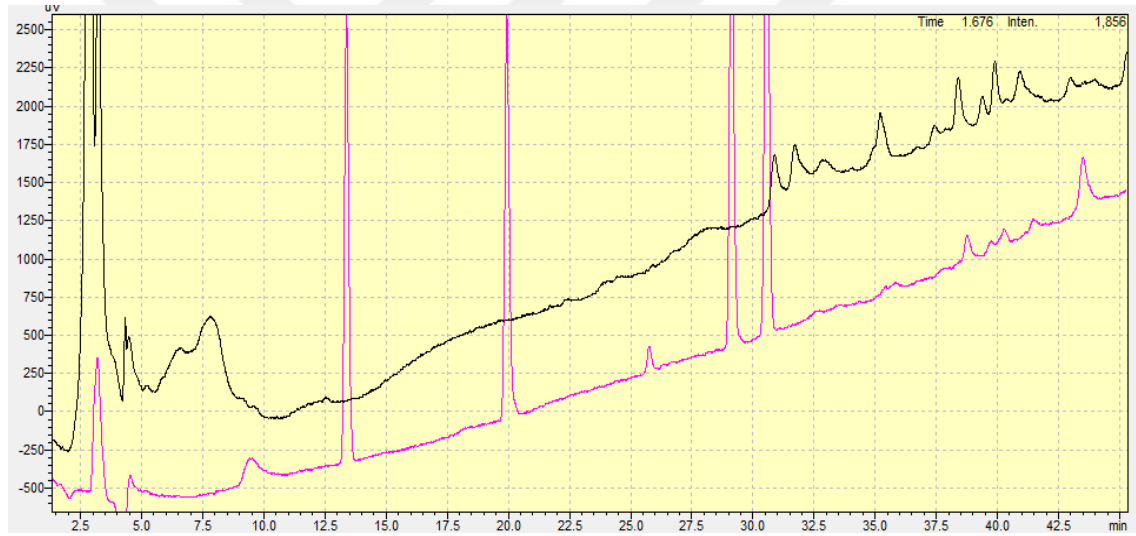
Şekil 3.81 2 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

3.2.2.3 Metanol: Su Denemesi (İzokratik Yöntem)

Hazırlanan stok ekstreden 1 ml ekstrakt alındı üzerine C18 kolon dolgu maddesi eklenerek evapore edildi. Toz haline gelen numune hazırlanan C18 kolonuna yüklendi. Kolon hazırlanmasında elüsyon çözücüsü metanol: su (65: 35) kullanıldı. Yürütücü sistem metanol: su (65: 35) sistemi ile izokratik olarak kullanıldı. Fraksiyonlar 10' ar ml olacak şekilde toplandı 1. ve 5. eluanta HPLC ile analiz edildi.



Şekil 3.82 1 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.



Şekil 3.83 5 nolu (siyah) eluantın ve standart bileşiklerin (pembe) HPLC kromatogramları.

4. SONUÇ VE ÖNERİ

Kalp hastalıklarından sonra dünya genelinde yaygın olan ve ölümlerle sonuçlanan hastalıklardan biri olan kanser günümüz sağlık problemlerinin başında gelir. İnsanlık tarihi kadar eski olduğu düşünülen bu hastalığın tedavi çalışmaları ve hastalığı önleme çalışmaları hala devam etmektedir. Bilinen verilere göre hastalığın en dezavantajlı tarafı kanser hücrelerinin tamamen yok edilememesidir. Birçok tedavi şekli olan kanser hastalığında en çok kullanılan yöntem kemoterapidir. Bu yöntem için çok sayıda ilaç geliştirilmiş ve geliştirilmektedir. Bunlardan biride paklitakseldir. Diterpen üyesi olan paklitaksel doğal anti tümör ilaç olarak kabul edilir. Bu ilacın asıl üretim materyali porsuk ağacıdır. Materyal olarak bitki kullanıldığından zamanla hammadde sıkıntısı yaşandığı için yeni yöntemlere veya aynı etken maddenin elde edilebileceği yeni ve kısa zamanda sürekliliği olan materyallere ihtiyaç duyulması olağandır.

Çalışmamızda farklı çözücüler ve farklı kolon dolgu maddeleri kullanarak ters faz ve normal faz kolon uygulamaları yapılmıştır. Biz de kromatografi ağırlıklı olarak yaptığımız bu çalışmamızda birçok deneme yaptık ve olumlu olumsuz koşulların belirlenmesini sağladık. Sonuç olarak yapmış olduğumuz tüm kromatografi çalışmasını genellediğimizde elde ettiğimiz sonuçlar; bu çalışma kapsamında günümüzün en önemli kemoterapi ilaçlarından olan paklitakselin kromatografik saflaştırma optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma paklitakselin fındık kabuklarından izolasyonu ve saflaştırılması çalışmalarının kromatografik saflaştırma kısımlarını içermektedir.

Çalışmamızda kullanılan stok çözeltideki paklitaksel miktarı 0.989 ppm olup, saflık ise % 0.45 olarak tespit edilmiş ve kromatografik saflaştırmalarda bu stok çözelti kullanılmıştır.

Bu bağlamda hem normal faz hem de ters faz kromatografik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Normal faz olarak silika 30 ve 60 türleri ile florosil ve alümina kullanılırken, ters faz için C8 ve C18 kolon adsorbanları kullanılmıştır. Çözücü sistemleri ise Aseton/ Hekzan (35: 65), DCM/ metanol (98,5: 1,5), Aseton/ DCM (20:80), Etilasetat/ Hekzan (30/70) sistemleri hem izokratik olarak hem de gradient

olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda geri kazanım verimi ve saflık değerleri ölçülmüştür.

Silika 60 kolonda Aseton/ Heksan (35:65) denemesi izokratik yöntem ile gerçekleştirilen çalışmalarda saflık ve geri kazanımda yüksek değerlere ulaşıldığı görülürken HPLC kromatogramları incelendiğinde paklitakselin yanındaki bileşenlerden tam olarak ayrılmadığı ve omuzlu olarak geldiği görülmektedir.

Çizelge 3.1'de bazı seçilmiş eluantların saflık ve miktarları verilmiştir. Tüm eluantların sonuçlarında ise geri kazanımın 0.90 ppm'e ulaştığı saflığın ise %10.2'ye ulaştığı görülmüştür. Ancak bu sonuçların paklitakselin omuzlu gelmesinden dolayı tarafımızca şüpheli bulunmasından dolayı, bu elde edilen verilerin tam anlam kazanması için yöntem tekrarlanmış ve elde edilen eluantların içerisine iç standart eklenerek paklitakselin varlığı kesin tayin edilmiş ve akabinde hesaplamalar yinelenmiştir. Böylece Çizelge 3.2'de paklitakselin tespit edildiği eluantların saflık ve miktarları verilmiştir. Tüm eluantların sonuçlarında ise geri kazanımın 1.78 ppm'e ulaştığı saflığın ise % 2'ye ulaştığı görülmüştür. Geri kazanımdaki yüksek miktar bize halen sonuçların hatalı olduğu göstermektedir. Paklitakselin omuzlu çıkmasından dolayı, tam anlam kazanması ve seri bir şekilde peşi sıra paklitakselli eluantların toplanarak tekrar ayırım işleminin gerçekleştirilmesi gerekli olduğuna kanaat getirmekteyiz.

Bir sonraki denemede İzokratik bu çalışmalarda elde ettiğimiz bu sonuçların daha da geliştirilmesi amacıyla aynı sistemin gradient çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde aseton hekzan 20:80, oranda başlayıp devamında 40:60; 50:50; 60:40; devam edip en sonda da 80:20 şeklinde tamamlanmıştır. Bu çalışmada saflık değeri %0.25, geri kazanım verimi ise 0.68 ppm olarak ölçülmüştür.

Bunun üzerine aynı yöntemin 35:65, 50:50 ve nihayetinde 65:35 şeklinde bir gradient yöntem denenmiştir. elde edilen sonuçların HPLC kromatogramları ve elde edilen değerler aşağıda verilmiştir. Bir önceki gradient sistemde tam olarak paklitaksel diğer bileşenden ayrılmamasına rağmen, tekrar denemiş olduğumuz bu gradient yöntemde ayırım daha başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Ancak bu yöntem de geri kazanım 0.3048 ve saflık ise %1.1 şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada aseton/ hekzan eluantların HPLC kromatogramlarında ki yayvanlaşmadan sonra seçilen eluantların birleştirilmesi ve akabinde metanolleme ile yeni kromatogramların alınması sayesinde

daha net düzgün kromatogramlar elde edilebilmiştir.

Bir diğer çalışmada silika 60 kolonda DCM: metanol (98,5:1,5) izokratik yöntemi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve paklitakselin diğer bir çok bileşen ile birlikte geldiği ve ayırımın çok kötü olduğu görülmüştür. Bunun üzerine Aseton: DCM (20:80) denemesi gradient (1-5, 20:80; 6-11, 50:50; 11-15, 80:20) yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde ise büyük ölçüde DCM' den dolayı HPLC piklerinde kaymalar ve yayvanlaşmalar gözlenmesi sebebiyle eluantlar evapore edilip, metanol ile çözülerek HPLC'ye verilmiş ve uygulanan yöntemin ayırım başarısı yönünden son derece başarılı olduğu görülmüştür. Elde edilen geri kazanım değeri ölçülen yani seçilmiş eluantlar için 0.2 ppm olurken, yine seçilmiş eluantlardaki saflık değerinin % 2.2 çıktığı görülmüştür.

Silika 60 kolonda etilasetat: hekzan (30/70) izokratik yöntemde gerçekleştirilen çalışmada ise paklitakselin ayırımı net olarak görülürken saflık değeri % 1'in üstüne çıkmış ve geri kazanım verimi ise 0.5 ppm olarak ölçülmüştür.

Aynı sistemin gradient yönteminde de ayırımın yine başarılı olduğu görülürken saflık ve geri kazanım veriminde sonuçların çok düşük çıktığı görülmüştür.

Silika 30 kolonda DCM: Metanol (98,5:1,5) izokratik yöntemde ve ayrıca Aseton: Heksan (35:65) sisteminde hem izokratik yöntem hem de gradient yöntem çalışılmış ve gerçekleştirilen çalışmaların ayırım yönünden başarısız olduğu görülmüştür.

Adsorban olarak florisil kullandığımız bir çalışmada Etilasetat: Hekzan (30: 70) izokratik yöntem de yapılan çalışmada kromatografik ayırım metodu başarısız olmuştur. Akabinde gerçekleştirilen hem izokratik yöntem ve hem de Aseton: Hekzan (35: 65) izokratik yönteminde paklitaksel bölgesi omuzlu olarak gelmiştir.

Alumina dolgu maddesi ile hem DCM: metanol (98,5: 1,5) yönteminde hem de Etilasetat: Heksan (30: 70) izokratik yönteminde ayırım iyi gerçekleşmemiştir.

Ters faz çalışmalarında ise C8 kolon da Aseton: Toluen (70: 30) izokratik yönteminde paklitakselin net bir şekilde ayrıldığı görülürken saflık değerinin %1 ve geri kazanım veriminin ise çok düşük olduğu görülmüştür. Aynı kolonda metanol: su (65: 35) yöntemi kromatografik ayırım yönünden başarısız bulunmuştur

C18 kolondaki Aseton: Toluen (70: 30) izokratik yönteminde paklitakselin ayırımı çok net başarılı bir şekilde gözlenmiş ve elde edilen yüzde saflık %1.1 ve geri kazanım değeri ise 0.34 ppm şeklinde gözlenmiştir. Aynı çalışmanın tekrarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Son olarak Metanol:Su (65: 35) izokratik yönteminde ise paklitaksel diğer bileşenlerden tam olarak ayrılmamıştır.

Sonuçta elde ettiğimiz sonuçlarda en uygun kromatoğrafik ayırımların silika 60 kolonda DCM: Metanol (98,5:1,5) izokratik yönteminde ve etilasetat: hekzan (30/70) izokratik yönteminde gözlenmiştir. Ancak her halükarda gerçekleştirilen kromatoğrafik işlemde paklitaksel gözlenen eluantların birleştirilerek tekrar aynı sistemde ardışık kromatoğrafik ayırma ihtiyacı duyduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bize endüstriyel düzeyde makro seviye pilot üretim için gerekli tüm verileri temin ederek yatırım için önümüzü açmıştır.

Yapılan bir takım çalışmalarda ve bu çalışmada da görüldüğü gibi fındık kabuğunda paklitakselin varlığı umut vericidir. Yakıt olarak kullandığımız materyali daha da detaylı çalışmalar yaparak çok daha değerli hale getirebilir hatta paklitaksel üretimini ülkemizde yapabilecek çalışmalar yürütülebiliriz. Total sentezi oldukça zor ve çok basamaklı olan paklitakseli; ekstraksiyon çalışmalarında ve çalışmamızda da gözlediğimiz türevlerini elde ettiğimizde de önemli bir başarı yakalamış sayılırız. Çünkü elde edeceğimiz türevden yola çıkarak ilacın yarı sentezini gerçekleştirebiliriz. Bunlara ek porsuk ağacında da fındıkta da denenen bir yöntem olan hücre kültürü yöntemi ile etken madde eldesini yapabilir veya elde işlemlerini daha da geliştirebiliriz.

KAYNAKLAR

- [1] S. Yıldırım, “Kanser tanısı ile izlenen hastaların yakınlarının kanser ile ilgili başvurdukları bilgi kaynaklarının değerlendirilmesi,” Uzmanlık tezi, İç Hastalıkları Bölümü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 2015.
- [2] Ç. Urfalı, “Reversal of breast cancer resistance protein mediated multidrug resistance in MCF-7 breast adenocarcinoma cell line,” Yüksek lisans tezi, Biyoloji Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2012.
- [3] E. Atıcı, “Tıp tarihinde kanser ve lösemi,” *Türk Onkoloji Dergisi*, c. 22, s. 4, ss. 197–204, 2007.
- [4] M. J. Stone *et al.*, “History of the Baylor Charles Sammons Cancer Center,” *Baylor University Medical Center Proceedings*, vol. 16, no. 1, pp. 30–58, 2003.
- [5] A. Çetin, “Kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar,” Bitirme tezi, Farmostatik Kimya Bölümü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye, 2013.
- [6] F. Andrew, and B. Tycko, "The history of cancer epigenetics," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 2, pp.143-153, 2004.
- [7] A. Sudhakar, “History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods,” Manuscript and M. T. Methods, *NIH Public Access*, vol. 1, no. 2, pp. 1–4, 2010.
- [8] M. Akgün, “Kemoterapi amacı ile primidin anti metabolitlerini kullanan hastalarda timidilat sentetaz polimorfizmine dayalı yan etkilerin ve ilaç rezistansının izlenmesi,” Yüksek lisans tezi, Eczacılık, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2006.
- [9] M. B. Amin, et al. “*AJCC Cancer Staging Manual*,” 7. Edition, Springer, Germany, 2010, vol. 1, pp 3-6.
- [10] L. Frederic. et al. “*AJCC Cancer staging manual*,” 6. Edition, Springer, Germany, 2010, vol. 1, pp 4.
- [11] S. Ölgün, I. Bıçak, D. Nebioğlu, “Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar,” *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, c.31, s.3, ss. 193-214, 2002.
- [12] V. T. Devita and E. Chu, “AACR Centennial Series A History of Cancer Chemotherapy,” *AACR Centennial Series*, vol.68, no. 21, pp. 8643–8653, 2008.
- [13] E. Wiltshaw, Cisplatin in the treatment of cancer,” *Platinum Metals Review*, vol. 23, no. 3, pp. 90-98, 1979.
- [14] B. Kütük, “Kemoterapi uygulanan kanserli hastalarda özbakımın değerlendirilmesi,” Yüksek lisans tezi, Hemşirelik Bölümü, İstanbul Bilim Üniversitesi, İstanbul Türkiye, 2016.

- [15] G. Can, “Antineoplastik ilaçların yan etkileri ve hemşirelik yaklaşımları,” *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, c.2, s.2, ss. 8-15, 2005.
- [16] M. A. Erkurt, İ. Kuku, E. Kaya, and İ. Aydoğdu, “Kanser Kemoterapisi ve Böbrek,” *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, c. 16, s. 1, ss. 63–68, 2009.
- [17] M. K. Uludağ, “Antikanser etkili bazı indol türevlerinin araştırılması,” Bitirme tezi, Farmöstik Kimya Bölümü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye, 2012.
- [18] S. Gülle, “Antitümör aktifliğe sahip elliptisin türevlerinin sentezi ve spektroskopik çalışmaları,” Yüksek lisans tezi, Kimya Bölümü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 2007.
- [19] G. Taşkırın, “Aspidosperma alkaloidlerinin temel iskeletinin sentezi için gerekli ara ürünlerin sentezi,” Doktora tezi, Kimya, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 2010.
- [20] T. Aniszewski, “*Alkaloids- Secrets of Life*,” 1th. Eddition, Oxford, UK, Elsevier, 2007, ch.2, pp. 61-66 .
- [21] R. H. Himes, R. N. Kersey, I. Heller-bettinger, and F. E. Samson, “Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine, and Desacetyl Vinblastine Amide on Microtubules in Vitro,” vol. 36, pp. 3798–3802, 1976.
- [22] A. Türker, Ö. Dizdar “Kemoterapötikler,” *Meslek İçi Eğitim Dergisi*, c. 1 s. 12, ss.73-74.
- [23] D. Oskay, “Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi,” *e- Journal of New World Sciences Academy*, c.4, s.2 ss.31-34, 2009.
- [24] M. Wink, “Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective,” *Phytochemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 3–19, 2003.
- [25] M. Atalay, “Preoperatif dönemde bitkisel ilaç kullanan hastalara genel bakış,” Uzmanlık tezi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye, 2011.
- [26] Ö. Sarışen ve D. Çalışkan “Fitoterapi : bitkilerle tedaviye dikkat,” *Sted*, c. 18, s. 7, ss. 182–187, 2005.
- [27] B. Kayan, “*Taxus baccata*’nın farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyonu ve ekstraksiyon verimlerinin karşılaştırılması,” Doktora tezi, Mersin Üniveritesi, Mersin, Türkiye, 2009.
- [28] E. K. Rowinsky, “The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents,” *Annual Review of Medicine*, vol. 48, no.1, pp. 353–74, 1997.
- [29] N. Erdemoğlu, B. Şener, “Taksan sınıfı bileşiklerin antitümör etkileri,” *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, c. 29, s. 1, ss. 77–90, 2000.

- [30] D. A. Dias, S. Urban, and U. Roessner, "A historical overview of natural products in drug discovery," *Metabolites*, vol. 2, no. 2, pp. 303–336, 2012.
- [31] J.-J. Zhong, "Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes.," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 94, no. 6, pp. 591–599, 2002.
- [32] M. Miele and A. Maria, "Hazel and other sources of paclitaxel and related compounds," *Phytochemistry reviews*, vol.11, no. 3, pp. 211–225, 2012.
- [33] P. Landre, R. Hocquemiller, G. Parc, and D. Chriqui, "Production of taxoids with biological activity by plants and callus culture from selected *Taxus* genotypes," vol. 59, pp. 725–730, 2002.
- [34] S. Işık, "Biyoteknolojik yönden tıbbi bitkiler ve bitkisel ürünlerde kalitenin belirlenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye, 2010.
- [35] M. E. Kaya, "Mikroekstraksiyon yöntemi ile yapılan ilaç analizleri," Bitirme tezi, Eczacılık, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye, 2014.
- [36] E. Büyüktuncel, "Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I," *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, c.32, s.2, ss. 209–242, 2012.
- [37] E. Fırıncaahmetoğlu, "Porsuk (*Taxus baccata* L.) ağacının yapraklarındaki uçucu yağ bileşenleri üzerine araştırma," Yüksek lisans tezi, Bartın Üniversitesi, Bartın, Türkiye, 2010.
- [38] (2015, 15 Haziran). *Zonguldak'ta 4112 Yaşında Porsuk Ağacı*. [Anturia]. Erişim: <http://www.anturia.com.tr/?p=450>.
- [39] E. Bemani, F. Ghanati, L. Yousefzadeh, and F. Khatami, "Antioxidant Activity , Total Phenolics and Taxol Contents Response of Hazel (*Corylus avellana* L.) Cells to Benzoic Acid and Cinnamic Acid," vol. 40, no. 1, pp. 69–73, 2012.
- [40] A. Hoffman and F. Shahidi, "Paclitaxel and other taxanes in hazelnut," *Journal of Function Foods*, vol. 1, no. 1, pp. 33–37, 2008.
- [41] L. Ottaggio *et al.*, "Taxanes from Shells and Leaves of *Corylus avellana*," *Journal of Natural Product*, vol.1, no. 77, pp. 58–60, 2008.
- [42] S. Polat, "Türk fıındığı (*corylus colurna*)'nın Türkiye'deki yeni bir yayılış alanı," *Marmara Coğrafya Dergisi*, vol. 1, no. 29, ss. 136–149, 2014.
- [43] U. Özveren, N.D. Bozdağ, S. Şahin, S. Özdoğan, "TG- MS ve FTIR kullanılarak fıındık kabuğunun gazlaştırılmasının incelenmesi" 10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, İstanbul, Türkiye, 2012.
- [44] S. Kayalak, A. Özçelik, "Türkiye'de ve dünyada fıındık politikaları," *Tarım Ekonomisi Dergisi*, c. 18, s. 2, ss. 43–53, 2012.

- [45] J. Kim, J. Yun, and Y. Hwang, "Production of taxol and related taxanes in *taxus brevifolia* cell cultures: effect of sugar," *Biotechnology letters*, vol. 17, no. 1, pp.101-106, 1995.
- [46] F. Bestoso *et al.*, "In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes," *BMC Biotechnology*, vol. 11, pp. 1–11, 2006.
- [47] F. Shahidi, C. Alaşalvar. (2004 Haziran). *Fındık ve fındık yan ürünlerinde fitokimyasal maddeler ve biyoaktif bileşikler*. Fındık Tanıtım Grubu. Erişim: <http://www.ftg.org.tr/tr/ar-ge-besin-degerleri-ve-saglik.html> .
- [48] S.A Slack, "A History of Yews in the U.S.," *A Compilation of Research Findings*, Ohio State Univesity, 1994, pp.13-15.
- [49] Miele *et al.*, "Method For The Production of Taxol And/Or Taxanes From Cultures of Hazel Cells," U.S. 20070026506A1, Feb. 1, 2007.
- [50] E. Cociancich, R. Pace, "A Process For The Extraction of Taxol And Derivatives Thereof From Plants Of The Genus *Taxus*," European. 0 553 780 A1, 01.27.1993.
- [51] S. Ramadoss, K. Haus, A. Vardhan, "Process for isolation of 14-b-hydroxy-10-deacetyl baccatin-III," E.P. Patent. 1 010 697 B1, Oct. 31, 2001.
- [52] Han W.M., Yoo K.J., Hong D.M., "Process of extracting Taxol from *taxus cuspidata*," U.S. Patent 6 066 748. A, May. 23, 2000.
- [53] T. Khac-Bui, M. Poiter, "Process For Isolation and Purification of Paclitaxel From Natural Sources," U.S. Patent 6 759 539 B1, Jul. 6, 2004.
- [54] Pyo H.S., Kim S.M., Cho S.J., Song K.B., Choi J.H., "Method for purification of Paclitaxel from paclitaxel-containing materials," U.S. Patent 154 218 A1, Jul. 14, 2005.
- [55] B. Gabetta, G. Zini, "Method for obtaining Paclitaxel from *taxus* plants," U.S. Patent 14 968 A1, Jan. 19, 2006.
- [56] J. Liu, A. Cherry, "Process for the extraction of Paclitaxel and 9-dihydro-13-acetyl baccatin III from *taxus*," U.S. Patent 7 169 307 B2, Jan. 30, 2007.
- [57] ElSohly N.H., Croom M.E., ElSohly A.M., McChesney D.J., "Method for isolating individual Taxanes," U.S. Patent 5 480 639 , Jan. 23, 1996.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Elif Sine Aksoy
Doğum Tarihi ve Yeri :26.07.1989 Düzce
Yabancı Dili İngilizce
E-posta :elifsine.aksoy@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya Bölümü	Düzce Üniversitesi	2017
Lisans	Kimya Bölümü	Gazi Üniversitesi	2012
Lise	Matematik-Fen	Düzce Arsal Anadolu Lisesi	2007