

**ATKESTANESİ EKSTRAKSİYONU
VE ESSİN İZOLASYONU**

Ömer Mete KOÇKAR /

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

Danışman: Doç.Dr. Mustafa KARA

Nisan 1989

ÖMER METE KOÇKAR'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı "ATKESTANESİ EKSTRAKSİYONU VE ESSİN İZOLASYONU" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

15.15.1989

Başkan: Prof. Dr. Mustafa Alpar

Üye: Prof. Dr. K. H. C. Başer

Üye: Doç. Dr. Mustafa Koca

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 29/5/1989 gün ve 2/2/2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Rüstem Kay

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, tıbbi bir bitki olan atkestanesinde (Aesculus hippocastanum L.) ülkemizde endüstriyel olarak total kuru ekstre ve etken madde essin üretimi için uygun proses değişkenleri araştırılmıştır.

Bu amaçla, Eskişehir'den toplanan atkestanelerinin, %50 etanol-su çözücüsü ile oda sıcaklığında yapılan ekstraksiyonuyla, yaklaşık %26 total kuru ekstre ve %5-5.5 essin içerdiği belirlenmiştir.

Ayrıca, 10 litre kapasiteli pilot ve 500 litre kapasiteli yarı endüstriyel ölçekli perkolatörlerle yapılan çalışmalardan, uygun katı/çözücü oranı 1/6, ortalama parçacık büyüklüğü 1.5 mm olarak bulunmuş ve bu şartlarda elde edilen ekstreden kuru atkestanesi bazına göre, %99 dan daha saf, yaklaşık %2.0-2.5 essin elde edilmiştir.

Essinin kantitatif tayinlerinde, ITK-dansitometre sistemi ve YBSK, standart essinle karşılaştırılmasında UV ve IR kullanılmış ve aralarında tam bir benzerlik görülmüştür.

SUMMARY

In this work, the process parameters were studied in order to produce total dry extract and escin from horse-chestnut (Aesculus hippocastanum L.), industrially. Horse-chestnut, collected from Eskişehir, were extracted with 50% ethanol-water mixture at room temperature yielding 26% total dry extract. Escin content of horse-chestnuts was found to be about 5.0-5.5% on a dry basis.

We also found that, utilizing a 10 liter capacity pilot and a 500 liter capacity semi industrial scale percolators in our laboratories, 1/6 solid/liquid ratio and 1.5 mm average particle size were optimum. Working under these conditions better than 99% pure escin with about 2.0-2.5%, on a dry horse-chestnut basis, was produced.

Escin was quantitatively determined using TLC-scanner and HPLC and was compared with standard escin using UV and IR giving excellent agreement.

Doktora çalışmamın her aşamasında, yanımda olan, yakın ilgi, anlayış ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım, Doç. Dr. Mustafa KARA' ya

Bu araştırmanın, Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi bünyesinde yapılmasını sağlayan ve büyük desteğini gördüğüm, Merkez Müdürü Prof. Dr. K. H. Can BAŞER' e

Çalışmalarım sırasında, başvurdukça, değerli fikirlerinden yararlandığım, Doç. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e

Araştırmalarımda, büyük yardımlarını gördüğüm, başta, Kimya Y. Müh. S. Hakkı BEİS, Kimya Müh. Samiye FIÇICIOĞLU, Kimya Y. Müh. Temel ÖZEK ve Kimya Y. Müh. Berrin BOZAN olmak üzere, tüm TBAM personeline ve Kimya Müh. Bölümündeki çalışma arkadaşlarıma,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Atkestanesi ağacının çiçek, yaprak ve meyvası 7
2.2	Spirostan halkası (Steroit tipi aglikon)...10
2.3	β -amyrin halkası (Triterpen tipi aglikon)...10
2.4	Essin yapısının aglikonları.....12
2.5	Essinin temel glikoziti.....16
2.6	Tıbbi bitkilerin endüstriyel çapta işlenmesinde gerekli temel işlemler.....25
2.7	Perkolatör bataryası.....28
3.1	Laboratuvarda yapılan karıştırmalı ekstraksiyon işlem basamakları.....33
3.2	Essin izolasyonu işlem basamakları.....35
3.3	Essin izolasyonu işlem basamakları (n-Butanol-su).....37
3.4	Pilot ölçekli perkolatör.....38
3.5	Pilot ölçekli ekstraksiyonlarda kullanılan düzenek.....40
3.6	Yarı endüstriyel ölçekli çok amaçlı ekstraksiyon ünitesi.....44
4.1	Ekstraksiyon verimine çözücü sisteminin etkisi.....55
4.2	Çözücü sisteminin 15 dak. ekstraksiyonda ekstraksiyon verimine ve kuru total ekstredeki essin yüzdesine etkisi.....56
4.3	Çözücü sisteminin 90 dak. ekstraksiyonda ekstraksiyon verimine ve kuru total ekstredeki essin yüzdesine etkisi.....57
4.4	Çözücü sisteminin atkestanesinden tüketilen essin miktarına etkisi.....58
4.5	Pilot ölçekte perkolatörde, ekstraksiyon verimine parçacık boyutunun etkisi.....66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 Pilot ölçekte perkolatörde, oda sıcaklığında, çözücünün yataktan bir kez geçişiyle ekstraksiyonda katı/çözücü oranının ekstraksiyon verimine etkisi.....	68
4.7 Pilot ölçekte perkolatörde, oda sıcaklığında, sirkülasyonlu ekstraksiyonda katı/çözücü oranının ekstraksiyon verimine etkisi.....	69
4.8 Pilot ölçekte perkolatörde, sıcakta, sirkülasyonlu ekstraksiyonda katı/çözücü oranının ekstraksiyon verimine etkisi.....	70
4.9 Yarı endüstriyel ölçekte, ekstraksiyon veriminin zamanla değişimi.....	72
4.10 İnce tabaka kromatografisi-dansitometresi farklı derişimlerdeki standart essin kromatogramları.....	74
4.11 İnce tabaka kromatografisi-dansitometresinde pik alanı-derişim arasındaki doğrusal ilişki.....	75
4.12 İnce tabaka kromatografisi-dansitometresi tayininde hazırlanan plak.....	76
4.13 İnce tabaka kromatografisinde, çalışmada elde edilen ürünlerin standartlarla karşılaştırılması.....	76
4.14 Standart essin ve izole edilen essinin YBSK kromatogramları.....	78
4.15 YBSK da pik alanları toplamı ile derişim arasındaki doğrusal ilişki.....	79
4.16 Elde edilen total ekstre ve standart total ekstrenin UV spektrumları.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞekilSayfa

- | | | |
|------|--|----|
| 4.17 | Standart essinin ve izole edilen
essinin UV spektrumları..... | 81 |
| 4.18 | Standart essinin ve izole edilen
essinin IR spektrumları..... | 82 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇizelgeSayfa

2.1	Essin yapısının bileşenleri.....	13
2.2	Essinin üç şekli ve özellikleri.....	15
3.1	İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında denenen belirteçler.....	48
3.2	İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında denenen yürütücü sistemler.....	49
3.3	İnce tabaka kromatografisi analiz şartları.....	51
3.4	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analiz şartları.....	53
4.1	Oda sıcaklığında seri ekstraksiyon sonuçları.....	61
4.2	Sıcakta seri ekstraksiyon sonuçları.....	62
4.3	Atkestanesinde essin yüzdesi.....	63
4.4	Essinin n-bütanol-su çözücü sistemiyle ekstraksiyonu ile doğrudan izolasyonu.....	65

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	5
2.1 Atkestanesi Ağacının Tanıtımı.....	5
2.2 Essinin Tanıtımı.....	6
2.2.1 Glikozitler.....	6
2.2.2 Saponinler.....	9
2.2.3 Essinin yapısı.....	11
2.3 Biyolojik Etkileri.....	14
2.3.1 Farmakoloji.....	14
2.3.2 Tedavide kullanımı.....	18
2.3.3 Kozmetik kullanımı.....	22
2.4 Bitkisel Hammaddelerin Ekstraksiyonu.....	24
2.5 Atkestanesinden Essin İzolasyonu Üzerine Önceki Çalışmalar.....	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	31
3.1 Laboratuvar Ölçekte Yapılan ön çalışmalar.....	31
3.1.1 Boyut küçültme, elek analizi, nem tayini.....	31
3.1.2 Ekstraksiyon yöntemi.....	32
3.1.3 Essin izolasyonu.....	34

İÇİNDEKİLER

Sayfa

3.1.3.1 Etanol-su çözücü sistemiyle yapılan ekstraksiyondan essin izolasyonu.....	34
3.1.3.2 n-Butanol-su çözücü sistemiyle essinin doğrudan izolasyonu.....	36
3.2 Pilot Ölçekte Ekstraksiyon.....	36
3.2.1 Parçacık boyutu seçimi.....	41
3.2.2 Katı/çözücü oranının belirlenmesi.....	42
3.2.3 Essin izolasyonu.....	43
3.3 Yarı Endüstriyel Ölçekte Ekstraksiyon ile Essin İzolasyonu.....	43
3.4 Çalışmalarda Elde Edilen Ürünlerin İncelenmesi.....	45
3.4.1 İnce tabaka kromatografisi-dansitometresi...	47
3.4.2 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi.....	50
3.4.3 Ultraviyole spektroskopisi (UV).....	52
3.4.4 Infrared spektroskopisi (IR).....	52
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR DAN ELDE EDİLEN BULGULAR....	54
4.1 Laboratuvar Ölçekte Yapılan Ön Çalışmaların Sonuçları.....	54
4.1.1 Çözücü sisteminin seçimi.....	54
4.1.2 Atkestanesinde total ekstraksiyon verim ve essin yüzdesinin belirlenmesi.....	59
4.1.3 Essin izolasyonu.....	60
4.2 Pilot Ölçekte Ekstraksiyon Sonuçları.....	64
4.2.1 Parçacık boyutunun seçimi.....	64
4.2.2 Katı/çözücü oranının belirlenmesi.....	67

İÇİNDEKİLER

Sayfa

4.2.3 Essin izolasyonu.....	71
4.3 Yarı Endüstriyel Ekstraktörde Çalışma Sonicları.....	71
4.4 Elde Edilen Ürünlerin İncelenmesi Sonicları...73	
4.4.1 İnce tabaka kromatografisi-dansitometresi...73	
4.4.2 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi.....77	
4.4.3 Ultraviyole spektroskopisi (UV).....77	
4.4.4 Infrared spektroskopisi (IR).....77	
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	83
EK AÇIKLAMALAR	
A. ESSİN İÇİN FORMÜLASYON ÖRNEKLERİ.....	86
B. ATKESTANESİ TOTAL KURU EKSTRESİ İÇİN FORMÜLASYON ÖRNEKLERİ.....	88
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	90
:	
ÖZGEÇMİŞ	

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkilerin, birçok hastalıkların tedavisinde kullanılması tarih öncesine kadar gitmektedir. Bitkilerle tedavi sanatının nesillerden nesillere geçişi, Sümerliler, Babilliler, Mısırlılar ve Çinlilerin ilk yazılı belgelerinde yer almış ve günümüze kadar ulaşmıştır.

Orta çağda, yaklaşık 1500 e ulaşan tıbbi bitki türü sayısı, XIX. yüzyılın ortalarına kadar pek değişiklik göstermeden bu değerde kalmıştır. Kimya endüstrisinde görülen önemli gelişme, ilaç endüstrisine de yansarak birçok sentetik ilacın üretilmesi ve tedavide kullanılmasına karşın, doğal kökenli, tıbbi bitkilerden elde edilen ürünler modern tıpta çok önemli yerlerini koruyabilmişlerdir.

Kimyanın çeşitli dallarındaki gelişmeler ise, tıbbi bitkilerde yapılan araştırmalara yön ve hız vermiş ve günümüzdeki önemine ulaştırmıştır. Çinlilerin 1500-2000 yıl önce yazılmış kitaplarında bahsedilen doğal kökenli geleneksel ilaçlarının aynı etkileri, günümüzün modern bilim ve teknolojisi ile kanıtlanarak açıklığa kavuşmaktadır.

Özellikle 1960 lı yıllardan başlayarak, tıbbi bitkilerden elde edilen ilaçlarda büyük bir artış görülmüştür. Bitki aktif maddelerinin insan organizması tarafından daha iyi kabul edilebilir oluşu ve birçok sentetik ilaca model ve temel teşkil etmesi, tıbbi bitkilerin gelecekte de önemle araştırılacağını ve ilaç üretiminde kullanılacağını göstermektedir. Bu son otuz yıl içerisinde aktif madde izolasyonu, kimyasal yapı aydınlatılması, biyolojik aktivitelerinin incelenmesi ve endüstriyel olarak üretilip insan sağlığı için hizmete sunulmasındaki araştırma ve uğraşlar, gerçekten tıbbi bitkilere verilen önemin apaçık bir kanıtıdır.

Doğa, tükenmeyen bitkisel ilaç hammaddelerini bizlere sağlamıştır. Bizlere düşen ise, sistemli bir yöntemle onları araştırmak, doğadaki varlıklarını ve sürekliliklerini koruyarak, doğa dengesini bozmadan yine kendi hizmetimize sunmaktır.

Günümüzde, dünya nüfusunun %80 i tıbbi bitkilerden elde edilen ham ekstrelerle tedavi edilmekte ve çok önemli tıbbi bitki türleri gelişmekte olan ülkelerde yetişmektedir. Bu ülkelerde, büyük çapta işlenmeden ihracı yapılan tıbbi bitkiler, gelişmiş ülke endüstrilerinde işlenerek ilaç elde edilmekte ve dünya pazarlarına girmektedir. Az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler için büyük bir ekonomik kayba neden olması bakımından, UNESCO, UNIDO, WHO ve diğer birçok uluslararası kuruluşlar, bu ülkelerde yetişen tıbbi bitkilerin, yine bu ülkelerde işlenerek, kendi sağlık sorunlarının çözülmesi için kullanımlarını teşvik etmektedirler. Hatta daha da ileri giderek, dünya pazarlarına girmeleri için bilimsel toplantılar, eğitim programları düzenlemeyi ve tıbbi bitkilerden ilaç hammaddesi üretiminde kendi endüstrilerini kurmaları için teknik yardım konularını gündemlerine almışlardır. Özellikle UNIDO, gelişmekte olan ülkelerde tıbbi bitkilerin endüstriyel kullanımı ile ilgili eğitim ve teknik yardım programlarını en etkili bir şekilde sürdürmekte ve bu ülkeler arasında tıbbi bitkilerle ilgili tüm konularda işbirliğini sağlamaya çalışmaktadır. Bu konuyla ilgili olarak, UNIDO'nun sağladığı maddi ve uzman desteğiyle, Anadolu Üniversitesi bünyesindeki Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi'nin, kalite kontrol laboratuvarları ve pilot ölçekte üretim ünitesi bugünkü haline getirilmiş ve dünyadaki sayılı araştırma merkezleri arasında yer almıştır. Bununla da yetinilmiyerek, UNIDO, İngilizce olarak ilk kez uygulanan tıbbi ve aromatik bitkilerin endüstriyel değerlendirilmesi ile ilgili Grup Eğitim

Programını, gelişmekte olan ülkelerden katılanlara bu merkezde verilmesini benimsemiş ve programın ilki Eylül 1988 de gerçekleştirilmiştir.

Tıbbi bitkilerin endüstriyel kullanımı üzerinde önemle duran bu gibi uluslararası kuruluşların çalışmaları ve önerileri, ilgili iki UNIDO raporunda (UNIDO, 1978; Tcheknavorian and Wijesekera, 1982) daha detaylı olarak bulunabilir.

Kalkınmakta olan ülkeler içerisinde birçok yönden daha iyi bir konumda bulunan Türkiye, ne yazıkki sadece birkaçı dışında sahip olduğu çok zengin ve üstün özellikli tıbbi bitki kaynaklarını endüstriyel olarak değerlendirememekte ve işlenmeden dış pazarlara satarak büyük bir ekonomik kayba uğramaktadır. Konunun önemi ve zaman geçirilmeden yapılması gerekenler bilimsel toplantılarda tartışılmakta ise de, somut sonuçlara ulaşamamaktadır. Oysa, tıbbi bitki açısından çok zengin olmayan birçok gelişmiş ülke, Türkiye'den ithal yoluyla sağladıkları tıbbi bitkiye bağlı ilaç endüstrilerini modern bir şekilde kurmuş ve kurmaktadır. Bu konularda yaptıkları bilimsel araştırmalar ise günden güne önem kazanarak bütün yönleriyle devam etmektedir.

Türkiye'de yetişen tıbbi bitkilerin, hangilerinin ne ölçüde endüstriyel olarak değerlendirilebildiğini, hangilerinin hiç değerlendirilmeden ham olarak nasıl ve ne miktarda ihraç edildiğini ve hangilerinin hiçbir şekilde değerlendirilemediğini burada yinelemek yersizdir.

Park ve bahçelerde bir süs bitkisi olmaktan öte, Türkiye'de hiçbir şekilde, ne endüstriyel işlenmesi ne de ihracatı bulunan bir bitki de atkestanesidir (Aesculus hippocastanum L.).

Özellikle batı ülkelerinde, toplam ekstre ve ekstredeki ana aktif madde olan essin üretiminde kullanılan atkestanesi ile ilgili Türkiye'de belirli bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Devlet İstatistik Enstitüsü kaynaklarından öğrenildiği kadarıyla, tıpta ve kozmetik alanda önemli bir kullanımı olan essin, bu ad altında hiç ithal edilmemiş fakat öğrenildiğine göre bir firma tarafından ithalat girişiminde bulunulmuştur.

Atkestanesi tohumlarının Orta Avrupa'ya ilk olarak XVI. yüzyılda bir botanikçi ve hekim olan Charles de L'Ecluse tarafından İstanbul'dan götürülerek yetiştirildiği belirlenmiştir. Bitkinin 1960'lı yıllarda yoğunlaşan araştırmalarla tüm yönleriyle araştırıldığı ve endüstriyel ilaç ve kozmetik üretiminde hammadde olarak kullanılmaya başlandığı bilinmektedir. Ayrıca, 1982 yılındaki bir UNIDO raporundan atkestanesinin bir tıbbi bitki olarak dünya pazarlarında öneminin arttığı görülmektedir (Tcheknavorian and Wijesekera, 1982).

Bütün bunlar göz önüne alınarak, Türkiye'de ilk kez Anadolu Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü ve Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezince, atkestanesinden ilaç hammaddesinin endüstriyel ekstraksiyonunda en uygun proses değişkenlerini belirlemek amacıyla, ortaklaşa bu çalışma başlatılmıştır.

Çalışmada, gözücü sistemi, sıcaklık, tanecik büyüklüğü ve süre gibi proses değişkenlerinin, toplam ekstre ve essin verimine etkileri incelenmiş, ekstraksiyon işlemi laboratuvar, pilot ve yarı endüstriyel ölçekli ekstraktörlerde yapılmıştır. Ayrıca, çalışmanın her evresinde essin miktarlarını kantitatif olarak tayin etmek için ince tabaka kromatografisi-dansitometresi sistemi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri geliştirilerek uygulanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

Bu bölümde, üzerinde çalışılan atkestanesisinin ağacı tanıtılmış, etken madde essinin yapısı ve biyolojik etkileri hakkında bilgi verilmiştir. Ayrıca, bitkisel hammaddelerin ekstraksiyonu özetlenmiş ve atkestanesisinden essin izolasyonu ile ilgili önceki çalışmalar üzerinde durulmuştur.

2.1 Atkestanesi Ağacının Tanıtımı

Atkestanesi ağacı, Hippocastanaceae familyasına dahil, yaklaşık 25 m ye yükselen, çok kuvvetli kök sistemine sahip zarif bir ağaçtır. Yapraklar, karşılıklı, oldukça büyük, lamina el şeklinde parçalanmış ve koyu yeşildir. Yaprakcıklar, 5-7 adet, uzunca, ters oval şeklinde olup, tabana doğru kama biçiminde daralır, uca doğru ise genişler ve birdenbire sivrilir. Bunlar yaklaşık 20 cm lik bir sapın ucunda birleşir ve kenarları düzensiz dişlidir. Çiçekler, genelde beyaz, 15-30 cm uzunluğunda piramit şeklinde, bileşik salkım durumudur. Çanak yapraklar, çan şeklinde birleşmiş, eşit olmayan 5 dişe sahip olup, kolayca dökülür. Taç yapraklar, 4-5 adet, serbest, birbirine benzemeyen yapraklardan oluşmuştur. Bunların taban kısmında genç yaşta sarı renkli lekeler vardır. Bu lekeler, çiçek yaşlandıkça kırmızılaşır. Erkek organlar, 7-8 tane, filamentler yukarı doğru kıvrılmış şekildedir. Meyva yuvarlak, yaklaşık 6 cm çapında, sivri sert dikenli, genellikle 1-3 tohumlu, etli bir kapsüldür. Tohum 1-4 cm çapında ve kahverengidir. Atkestanesi ağacı Nisan-Mayıs aylarında çiçek açar ve meyva, Ağustos-Ekim aylarında olgunlaşır (Stoyanov, 1982; Petkov, 1982; Bianchini and Corbetta, 1977; Cronquist, 1981; Baytop, 1963).

Atkestanesi, zerafeti nedeniyle yerleşim bölgelerindeki park ve yol kenarlarında süs ağacı olarak, ülkemizin her tarafında olduğu gibi ılıman iklimde bulunan Avrupa, Asya

ve Amerika'da da yetiştirilir. Tohumları ile üretilen atkestanesi verimli, kaba ve bereketli topraklarda çok iyi yetişir. Atkestanesi ağacının çiçek, yaprak ve meyvası şekil 2.1' de gösterilmiştir.

Çiçeklerde, flavonoit türevleri rutin ve kuersitrinle birlikte saponin karışımı essin yanında, kolin ve purin bulunur.

Ağaç kabuğunda, kumarin glikoziti olan esculin, bunun aglikonu olan esculetin, oksikumarinik glikoziti olan fraksin ve skopolin, bunların aglikonları, fraksetin ve skopoletin, essin, allantoin ve kuersetin vardır.

Tohumlarda, nişasta, essin, protein, yağlar, şeker ve kateşik tanenler bulunur.

Yapraklarda, kuersitrin, izokuersitrin, kuersetin adlı flavonoitler ve karotenoidler (lutein) vardır (Stoyanov, 1982; Petkov, 1982; Bianchini and Corbetta, 1977; Cronquist, 1981).

2.2 Essinin Tanıtımı

Atkestanesi ağacı tohumlarının (Atkestanesi) etken maddesi olan essin, bir triterpenik saponin karışımıdır.

Triterpen tipi saponinler esas olarak glikozit olduklarından, bu bölümde öncelikle glikozitler, daha sonra da saponinler ve triterpenik saponinler hakkında kısa bilgiler verilmiştir.

2.2.1 Glikozitler

Glikozitler, enzim ya da seyreltik asit etkisiyle yapılan hidroliz sonucunda, şeker ve şeker olmayan kısımlara ayrılan organik bileşiklerdir. Şeker kısmı bir ya



Şekil 2.1 Atkestanesi ağacının çiçek, yaprak ve meyvası

da birkaç molekül monosakkaritten, şeker olmayan kısmı ise aglikon, genin ya da genol olarak adlandırılan aromatik ya da alifatik yapıdan oluşurlar (Tyler, et al., 1981).

Genellikle glikozitlerde şeker ile aglikon arasındaki bağ oksijen atomuyla yapılmış olup, bu tip glikozitlere O-glikozitleri denilmektedir. Bazı glikozitlerde ise, şeker ile aglikon arasındaki köprü kükürt (S-glikozitleri), azot (N-glikozitleri) ya da karbon (C-glikozitleri) atomlarıyla yapılmıştır.

O-glikozitleri, aglikonun karboksil grubu (alkol, fenol) ile şekerin indirgen grubunun bir molekül su kaybederek birleşmesi sonucu oluşurlar. Doğada bulunan glikozitlerin büyük çoğunluğu bu grupta olup, aglikonun yapısına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılırlar (Baytop, 1980; Tyler, et al., 1981).

A- Alkol glikozitleri

1. Siyanogenetik glikozitler

B- Fenol glikozitleri

1. Basit fenol glikozitleri
2. Antrasen glikozitleri
3. Flavon glikozitleri
4. Antosiyen glikozitleri
5. Kumarin glikozitleri

C- Steroit glikozitleri

1. Kalp kuvvetlendirici glikozitler
2. Saponinler
 - a. Steroidal saponinler
 - b. Triterpenik saponinler

2.2.2 Saponinler

Su ve alkol (metanol, etanol) gibi polar çözücülerde çözünen, fakat oksijensiz çözücülerde çözünmeyen nötral ya da asidik karakterli bileşiklerdir. Sudaki çözeltileri çalkalandığında kalıcı bir köpük meydana getirir.

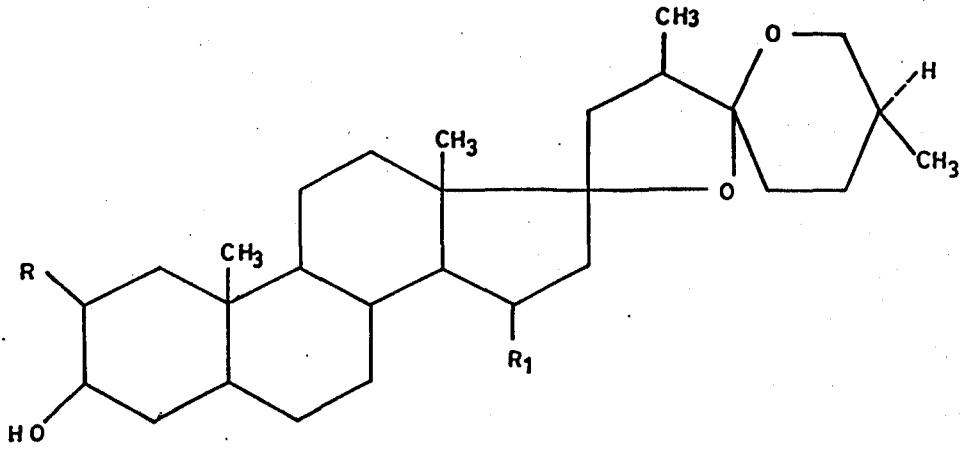
Saponin tiplerinin büyük çoğunluğu yüksek bitkilerde bulunmakta iken, bazı deniz hayvanlarında, örneğin, deniz salyangozunda ve deniz yıldızında da saponin bulunmaktadır.

Saponinler, sapogeninlerinin ya da aglikonlarının kimyasal yapıları esas alınarak, triterpenoid ve steroidal saponinler olmak üzere iki grupta toplanırlar (Tyler, et al., 1981; Trease and Evans, 1980; Wagner and Wulff, 1977).

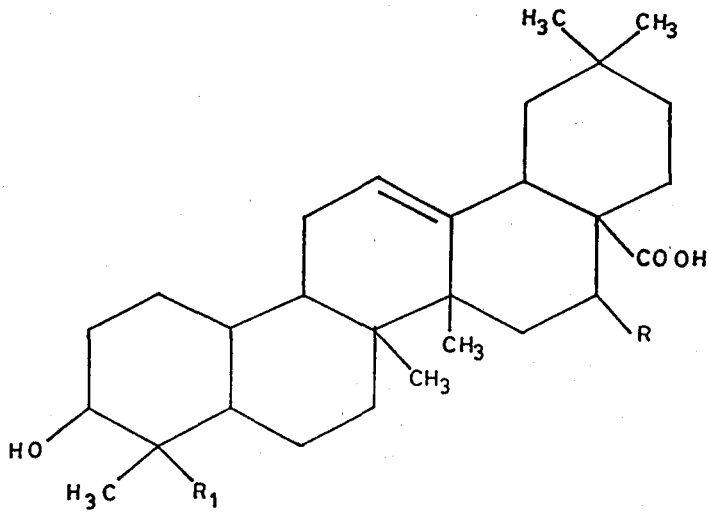
Saponinlerin saflaştırılmasındaki güçlükler nedeniyle, 1960 lı yıllarda ancak birkaç saponinin kimyasal yapısı bilinmekteydi. Son zamanlarda kromatografik tekniklerdeki önemli gelişmelerle, saflaştırılabilen her iki grubun sapogeninlerinin yapıları büyük ölçüde aydınlatılmıştır (Wagner and Wulff, 1977).

Aglikon kısmı steroid türevi olan saponinlerin aglikonu şekil 2.2' de gösterilen spirostan halkası (27 karbon) yapısındadır. Halkaya bağlı karboksil grubu bulunmadığı için, bu tip saponinlere nötral saponinler adı da verilmektedir.

Aglikon kısmı triterpen türevi olan saponinlerin aglikonu, β -amyrin halkası (30 karbon) yapısındadır (Şekil 2.3). Büyük çoğunluğunda 17 numaralı karbona bağlı bir karboksil grubu bulunduğu için, bu tip saponinlere asit saponinler adı da verilmektedir (Baytop, 1980).



Şekil 2.2 Spirostan halkası (steroit tipi aglikon)



Şekil 2.3 β -amyrin halkası (triterpen tipi aglikon)

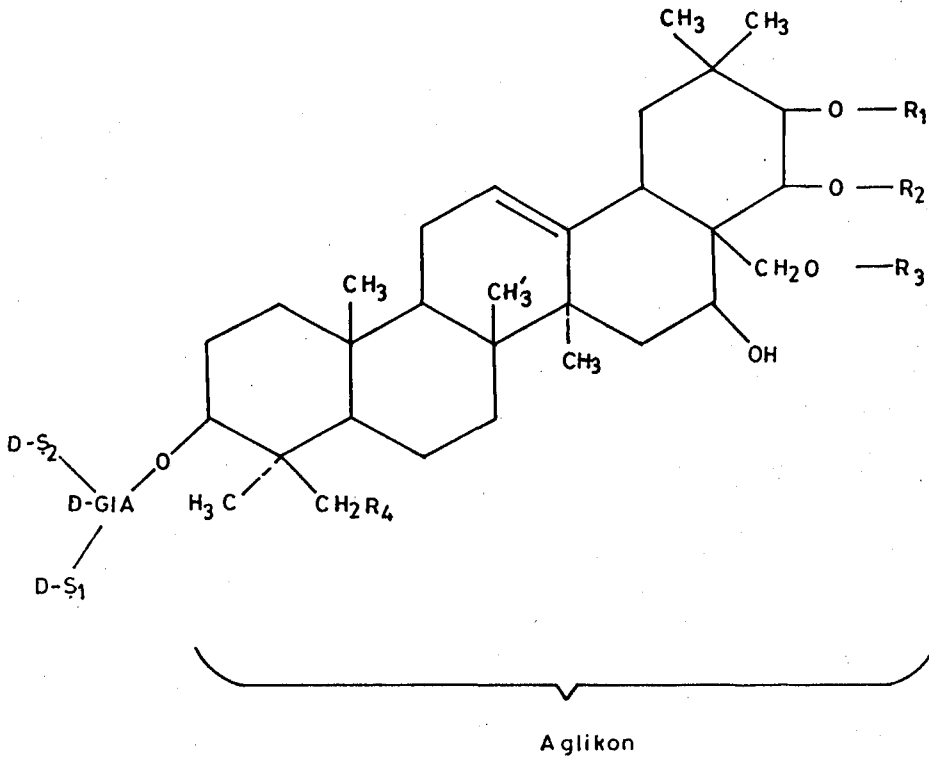
2.2.3 Essinin yapısı

Atkestanesinin (Aesculus hippocastanum L. tohumları) içerdiği kompleks saponin karışımı essin olarak adlandırılır. Essin bitkide sodyum ya da potasyum tuzu halinde bulunur (Rucman and Jankoviç, 1976; Wulff und Tschesche, 1968).

Son yıllarda essinin yapı aydınlatılması çalışmaları, iskelette C-21 ve C-22 karbon atomlarına ya angelik asit-asetik asit ya da tiglik asit-asetik asit in (α -metilbutirik ve isobutirik aside de rastlanmaktadır) ester olarak bağlanmış olduğu başlıca iki aglikon bulunduğunu göstermiştir. Bu aglikonlar protoessigenin ve barringtogenol-C dir. Burada asitler arasındaki oran, 8-10 molekül asetik asit için 6-4 molekül tiglik asit, 4-3 molekül asetik asit için 1/2 molekül angelik asit olarak verilmiştir. Şeker bağlanması 3 nolu karbon atomundaki hidroksil grubunda görülür. D-glikuronik aside 1-4 ve 1-2 bağlarıyla iki şeker bağlıdır. Bu iki şeker, glikoz-glikoz, glikoz-ksiloz ve glikoz-galaktoz kombinasyonlarında olabilir. Şeker oranları: 1 glikuronik asit için 1.98 glikoz, 0.23 ksiloz ve 0.19 galaktozdur (Tetenyi, 1977; Wulff und Tschesche, 1968; Wagner, et al., 1985; Wagner and Wulff, 1977; Windholz, 1976; Konoshima and Lee, 1986; Jurenitsch, et al., 1984).

Genel yapıya ait aglikonlar şekil 2.4 'de verilmiştir. Yapılan çalışmalar essin bileşiminde 30 dan fazla bileşik olduğunu göstermiştir. Bunlardan en çok karşılaşılan 8 tanesi çizelge 2.1' de verilmiştir (Tschesche und Wulff, 1973).

Bu 8 temel bileşiğin toplam essin içindeki miktarı % 73 ü oluşturur (Wulff und Tschesche, 1968; Wagner and Wulff, 1977).



Aglikon	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Protoessigenin	H	H	H	OH
Barrintogenol - C	H	H	H	H

Şekil 2.4 Essin yapısının aglikonları

Çizelge 2.1 Essin yapısının bileşenleri

Aglikon	Şekerler	Asitler	* %	** %
Protoessigenin	D-Glikuronik asit D-Gli. D-Gli.	Angelik + Asetik	23	19
—	— — —	Tiglik + —	15	22
—	— — —	Angelik + —	9	5
—	— — —	Tiglik + —	6	6
—	— — —	Angelik + —	7	1
—	— — —	Tiglik + —	5	1
Barringtogenol C	— — —	Angelik + —	5	1
—	— — —	Tiglik + —	3	1

* Wulff und Tschesche, 1969

** Wagner, et al., 1970

Genel olarak yukarıda tanıtılan essin, β -essin, α -essin ve kriptoessin olarak 3 biçimde bilinir. β -essin, essinin suda zor çözünen ve kristal olarak elde edilen bir bölümü olarak belirtilir. Suda kolay çözünen α -essinde, C-22 nin yanında C-28-O da asetil bağları bulunur. Essinin bilinen üçüncü şekli ise kriptoessindir. Bu yapıda yalnızca C-28-O da asetil bağı bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda α -essin, β -essin ve kriptoessinden oluşan bir karışım olduğu öne sürülmüştür (Wagner, et al., 1985).

Çizelge 2.2' de essinin 3 şekli ve özellikleri verilmiştir (Windholz, 1976; Wagner, et al., 1985).

Atkestanesi içindeki essin miktarı genellikle % 3-6 arasında değişmektedir (Wulff und Tschesche, 1968).

Essinin temel glikoziti şekil 2.5' de verilmiştir

2.3 Biyolojik Etkileri

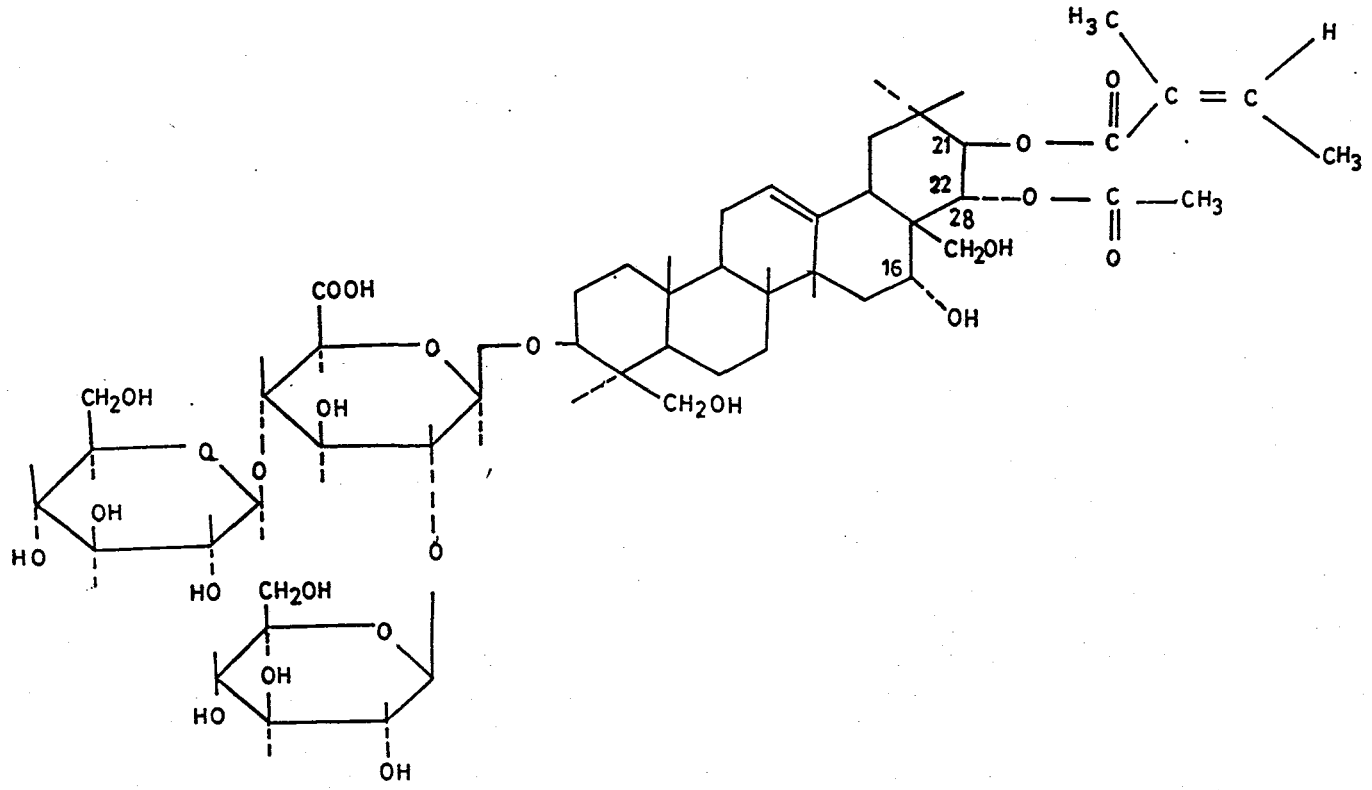
Bu bölümde, öncelikle atkestanesi etken maddesi essinin farmakolojik etkileri, toksisitesi, toleransı ve tedavide kullanımı daha sonra ise atkestanesinin kozmetik kullanımı kısaca verilmiştir.

2.3.1 Farmakoloji

Essin, anti-ödem ve anti-enflamatuvar etkili bir maddedir. Anti-ödem etki, lokal ya da genel ödem oluşturulan laboratuvar hayvanlarında kanıtlanmıştır. Bu amaçla, sıçan pençesinde ovalbumin, formalin ve dekstran ile oluşturulan ödemin essin ile belirgin biçimde azaldığı gözlenmiştir (Lorenz and Marek, 1960; Girerd, et al., 1961; Manca and Passarelli, 1965).

Çizelge 2.2 Essinin üç şekli ve özellikleri

Essin	Karakteristik yapı	Özellik
β -Essin	R2=Asetil R3=H	Suda zor çözünür HI=40 000
Kriptoessin	R2=H R3=Asetil	Suda kolay çözünür HI=0.0
α -Essin	R2=Asetil R3=H veya R2=H R3=Asetil	Suda çözünür HI=20 000.



Şekil 2.5 Essinin temel glikoziti

Essinin anti-enflamatuvar etkisi, intravenöz yolla ve ödem oluşturuucu maddeden 16 saat önce verildiğinde belirgin olarak görülmüştür (Manca and Passarelli, 1965).

Çeşitli saponinlerle yapılan karşılaştırmalı çalışmada, essinin belirgin anti-eksudatif etkisi olduğu da gözlenmiştir. Ödem başlangıcından 16 saat önce profilaktik olarak kullanıldığında, intakt ve hipofizektomize sıçanlarda diüretik ve natriüretik etkileride dikkat çekmiştir (Vogel and Marek, 1962).

Karbonmonoksit içeren hava solumaya bırakılan, (Tzonos and Riebling, 1968) ya da kalay etilsülfat verilen (Zoltan, et al., 1969; Zoltan and Foeldi, 1969; Varkonyi, et al., 1969; Zoltan and Gorini, 1970; Joo, et al., 1970) hayvanlarda oluşan serebral ödemlerde de essinin olumlu etkisi deneysel olarak kanıtlanmıştır. Her iki deneyde de essin ile tedavi sonucunda, serebral ödem kaybolmuş ve beyin omurilik sıvısı (BOS) basıncı normale dönmüştür. BOS basıncındaki değişikliklerle ilgili benzer sonuçlar, Hemmer and Diezemann (1962) tarafından yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır. Ayrıca, essin ve bufenin eşit miktarda karıştırılarak elde edilen jelin, sıçan pençesinde, kaolinle oluşturulan ödemi tedavide başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Lorenz and Reipper, 1967). Bu jel halindeki formülasyonun deriden kolaylıkla geçebilirliği ve pratikliği nedeniyle geniş çapta uygulama alanı bulabileceği belirtilmektedir.

Deksametazon ile eşit miktarda karıştırılan essinin, anti-ödem etkisinde önemli bir artış, sıçan pençesinde ovalalbumin ile oluşturulan ödemin tedavisinde gözlenmiştir (Lippert and Weinberg, 1967).

Essinin anti-ödem etki mekanizması ve farmakodinamiği birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Vogel, et al., 1963; Preziosi and Manca, 1965; Mussgnug, 1969; Vogel, et

al., 1970; Ascher and Paltauf, 1970; Hamper, et al., 1970; Vogel and Marek, 1962; Erbring and Vogel, 1963; Meyer-Bertenrath and Kaffarnik, 1970; Henschler, et al., 1971; Jacker, 1977).

Diğer bir çalışmada, merkezi sinir sisteminde radyasyon ile oluşabilecek tahribat önceden essin uygulanmasıyla önlenmiştir. Essin verilen ve ardından düşük dozda X-ışını uygulanan tavşanlarda görülen merkezi sinir sistemi değişimleri, essin verilmeyen tavşanlarınkinden daha hafif ve daha önemsiz olarak gözlenmiştir (Giordano and Invernizzi, 1968).

Akut ve kronik toksisite fare, sıçan ve tavşanlarda belirlenmiştir (Lorenz and Marek, 1960; Ubel and Patt, 1960; Manca and Passarelli, 1965). Sonuçlar, insan tedavisi için normalde kullanılan dozlar açısından, uygun olduğunu göstermektedir. Toksisite sadece çok yüksek dozlarda görülmektedir.

Tolerans, özellikle intravenöz yol ile uygulamada dikkate alınmalıdır. Essin ile kilogram ve/veya gün başına insan tedavisinde kullanılan en yüksek dozun iki katı dozlar uygulanarak, aralıksız elli gün süren tedavilerde bile, iyi tolere edildiği anlaşılmıştır (Manca and Passarelli, 1965).

Bütün uygulama yöntemlerinde saponinlere özgü yerel tahriş essinde de görülebilir (Girard, et al., 1961).

2.3.2 Tedavide kullanımı

Essin, farmakolojik özellikleri ve iyi tolere edilebilmesi nedeniyle, bugün geniş ölçüde tıpta kullanılmaktadır (Inverni Della Beffa, 1979a).

Essin ilk kez 1960-61 yıllarında Almanya'da, enjekteble şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Sonraları, amorf ve tuzları halinde suda çözünürlüğünün arttığı gözlemlendiğinden, oral yolla da tedaviye girmiştir (Bonati, 1977).

Varis, flebit ve hemoroid essin ile tedavi edilebilmektedir. Düzenli kullanımı, yinelenen trombo flebit nöbetlerinden yakınan hastalarda özellikle etkilidir. Bu durumda, hastalığın sıklık ve şiddetinde bir azalma görülebildiği gibi ülser belirtilerinin de oldukça uzun süreli olarak ortadan kaldırılması söz konusudur. Essinin bu amaçla kullanılması konusunda birçok araştırma bulunmaktadır (Lucas, 1963; Aichinger, et al., 1964; Jonhe, 1964; Wolfram, 1968; Stoppani, et al., 1969; Ludwig, 1970; Fromantin, 1972).

Bütün araştırmacılar, essinin iyi toleransı, yan etkilerinin olmaması ve özellikle yüksek terapötik etkisi konusunda birleşmektedir.

Rapor edilen vakalar arasında, tedavi ile herhangi bir yan etki görülmeyen bazı hamile kadınlara da rastlanmaktadır.

Farmakolojik etkisi doğrulanmış essin içeren jellerin piyasaya sunulması, varis ve flebit tedavisinde yaygın kullanıma yol açmış ve doktorlar ile hastalar tarafından büyük bir ilgi görmüş, çok sayıda vakada etkinliği ve iyi toleransı kanıtlanmıştır (Lotz, 1967; Niedling, 1967; Harichhausen, 1968; Klauda, 1968; Schoen and Wefers, 1968; Wampola, 1968).

Essinin, retrograt amnezi gösteren ya da göstermeyen kafa kırık ve travmalarının ardından gelişen serebral ödemlerin tedavisinde de etkisi görülmüştür. Tedavi ile sefalji, vertigo ve genel rahatsızlık belirtilerinin ortadan kalkması, durumun ciddiyetine bağlı olarak, 3 ila 16 günlük süre içinde olmaktadır (Hutzel, 1963).

Apopilektik nöbet ve hemiparezis geçiren hastalarda belirgin iyileşme sonuçları görülmüştür. Essin verilmesi, yaklaşık 24 saatlik bir süre içinde, tüm belirtilerin ortadan kalkmasına yol açmaktadır (Lucas, 1963).

Heppner, et al. (1967)'in çalışmaları da bu sonuçları doğrulamaktadır. Bu araştırmacılar, serebral tümör, intrakranial anevrizma, serebral sikleröz, subdural hematom, ensefalit ve menenjitli hastaları tedavi etmişlerdir. Akut vazomotor yetmezliğe bağlı serebral ödemlerde, sonuçlar çabuk ve başarılı olarak alınmakta iken, kronik hastalık durumunda ise iyileşme uzun süreli essin uygulamasından sonra yavaş yavaş gelişmektedir.

Aynı alanda, Wolfram (1968), Cazzullo and Torriqiani (1969), Tzavalles and Finke (1970) daha umut verici sonuçlar elde etmişlerdir. Bilindiği gibi kırık ve çıkıklardan sonra çevre dokuda, uygulanan alçı ya da bandaj nedeniyle şiddetli bir şişme ve bunlar kaldırıldıktan sonra morarma oluşabilir, bu vakalarda essin kullanımı iyileşmeyi çabuklaştırmaktadır.

Hutzel (1963), essini fazla kan kaybı ile yumuşak doku kısmında tahribat olan çok sayıda kırık vakasında kullanmıştır. Tedavinin başlangıcından bir kaç saat sonra hastaların çoğunda, şiddetli ağrıda bir azalma olmuş ve hematom, essin tedavisi uygulanmayan hastalardan daha hızlı olarak yok olmuştur. Benzer olumlu sonuçlar ön kol kırığı olan hastalarda da Greifenstein (1966), tarafından rapor edilmiştir.

Essin, klasik Sudeck sendromunun tedavisinde de olumlu sonuçlar sağlamaktadır (Scheibe, 1966). Spontan ve hareket sırasında ortaya çıkan ağrının azalması, ilk enjeksiyon gününden itibaren farkedilmektedir.

Ortopedi ve travmatoloji alanında, travmatik yaralanma sonucu oluşan iki parapileji vakasındaki ayak ödemlerinde de, essinin etkinliği gözlenmiştir (Di pierro, 1969).

Travmatize ve uzun süre yatalak hastalarda, hareketsizliğe bağlı olarak oluşan ödemlerde de olumlu sonuçlar Parmeggiani (1968), tarafından gözlenmiş ve ayak kırıklarından sonra subakut ve kronik yerel ödemlerde iyileşmeler görülmüştür. Aynı araştırmacılar tarafından, diz kapağı hidrartrozda da tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir.

Essin, siyatiğin rutin tedavisinde, steroid türevi maddelerle kombinasyon halinde kullanılmış ve ağrı belirtileri açısından elde edilen sonuçlar olumlu bulunmuştur. Böylece essin, tedavide kullanılan steroid türevlerinin dozunun düşürülmesi için kullanışlı görülmüştür (Caminiti and Bocaleti, 1969).

Essin, kadın doğum alanında da, ödemli bir durum olan gestosların ve eklampsilerin risksiz tedavisi için çok kullanışlı olmaktadır (Ferrero, et al., 1968).

Essinin, kulak, burun, boğaz ve diş rahatsızlıklarında da başarı ile kullanıldığı vakalar vardır (Hutzel, 1963). Uzun süreli oral-trakeal intübasyona bağlı epiglottik ödemlerde 200 den fazla hastada başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Torelli, 1969).

Diş eti tedavilerinde hızlı bir iyileşme sağlanmıştır. Tedavinin sonunda, diş etlerinin normal rengine döndüğü ve presyon uygulandığında sadece kısa süreli kanamalar görüldüğü belirlenmiştir (Hutzel, 1963).

Dermatoloji alanında, Giannetti and Pelfini (1968), essinle Herpes Zoster'e bağlı ödemleri başarıyla tedavi etmiştir.

Garbin and Vartanian (1972), multiple sklerozda essinin anti-enflamatuar ve anti-ödem etkisini tedavi amacıyla değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar, akut krizlerde belirgin bir iyileşme ve tedaviye düşük dozda kortizon maddelerinin katılmasıyla, belirtilerde tümüyle düzelme olduğunu gözlemişlerdir. Kronik krizlerde ise, essin düşük doz kortikosteron ile karıştırıldığında daha önceden yüksek doz kortikosteron ile tedavi edilen vakalardakine eşdeğer sonuçlar elde edilmiştir.

Essin, cerrahi operasyonlar sırasında oluşan ödemlerin önlenmesi amacıyla da profilaktik olarak kullanılmaktadır. Albrecht'in (1967), ürolojik operasyon sırasında intravenöz ve operasyon sonrasında oral uygulaması ödem oluşmasını önlemiştir.

Yakın zamana kadar, bu gibi vakalarda özellikle su-tuz dengesi yönünden güvenilmez etkileriyle bilinen diüretikler kullanılıyordu, artık bu nedenlerle essin, daha yoğun bir uygulama alanı bulabilmektedir.

Yukarıdan da görülebileceği gibi, essinin tromboz, serebral kanamalar, venöz stazis ve herhangi bir tipte cerrahi operasyona bağlı travmalardan kaynaklanan ödemlerin tedavisi için yeni bir ilaç seçeneği olduğu kolaylıkla söylenebilir.

2.3.3 Kozmetik kullanımı

Atkestanesi ekstresi terkinde bulunan saponinler nedeniyle anti-ödemik, astrenjan ve dekonjestif etki gösterirler ve dolayısıyla dermatoloji alanında büyük ölçüde kullanılırlar (Proserpio, et al., 1980).

Kozmetikte atkestanesi temizleme, canlandırma ve koruma özelliklerine sahip olup,

- . banyo köpükleri
- . şampuan, saç ve yüz losyonları
- . canlandırma ve koruma y/s kremleri
- . banyo ve güneş banyosu, traş ve epilasyon sonrası emülsiyon ve jelleri
- . diş macunu ve gargaraları
- . ayak ve bacak yorgunluk kremleri
- . temizleme maskeleri ve
- . sporcu masaj kremlerinin

formülasyonlarında oldukça yaygın kullanım sahası bulunmaktadır (Inverni Della Beffa, 1979b; Marrissal, 1976; Touzet, 1972; Marrissal and Aubert, 1981).

Atkestanesi genel olarak alt deride kan dolaşımını ve deri altı hücre metabolizmasını düzenleyerek deriyi yumuşatır ve buruşuklukları önler (Kuriyama, et al., 1968; Denner, 1973).

Saç canlandırması ve kafatası derisine kan sağlayıp güçlendirmesi amacıyla saç losyonları ve şampuanlarda yaygın olarak kullanılır (Thomae, 1965; Hiroshi, et al., 1968; Kuriyama, et al., 1968; Oreal, 1980; Grollier and Beauquey, 1979).

Essin, dişeti iltahaplarını giderdiği, kanamaları önlediği ve diş etlerine normal görünümünü kazandırdığı için diş macunu ve gargaralarda kullanılır (Hiroshi, et al., 1968; Denner, 1973).

Yukarıda, atkestanesi ekstreleri ve essinin farmakolojik çalışmaları, terapötik alanda kullanımına kısaca değinilmiştir. Her iki kullanım alanında da bir çok formülasyon örnekleri verilebilirse de sadece tipik olanlardan bazıları Ek Açıklamalar-A ve Ek Açıklamalar-B de verilmiştir.

2.4 Bitkisel Hammaddelerin Ekstraksiyonu

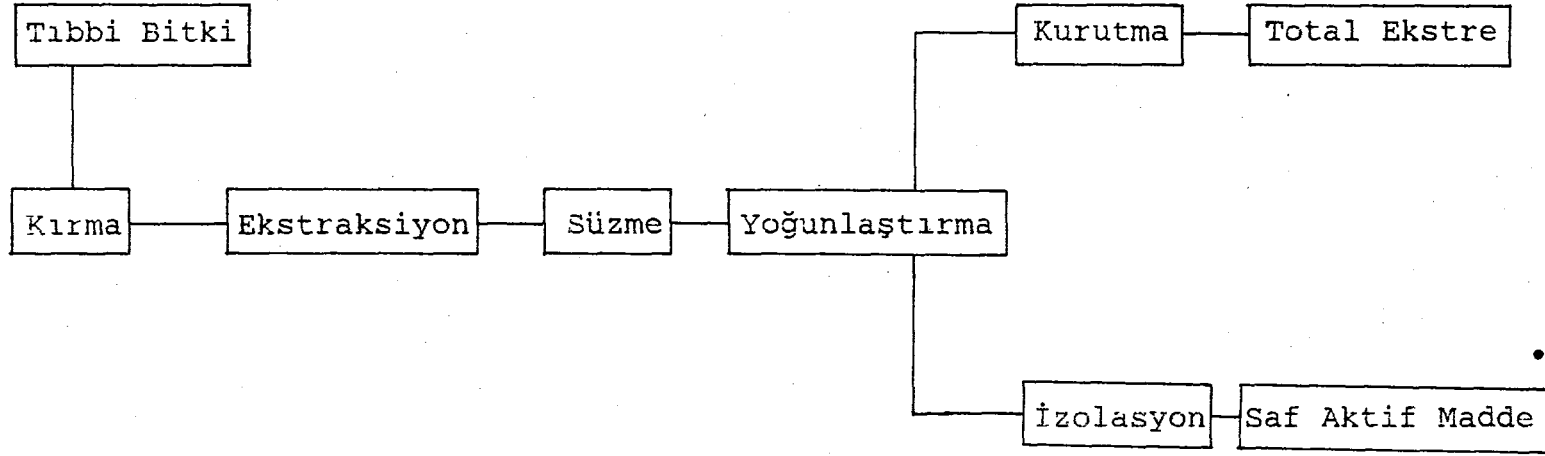
Doğada kendiliğinden yetişen ya da kültüre alınabilen tıbbi bitkiler, a)ham drog b)ekstre c)saf etken madde eldesinde kullanılırlar. Bitkisel hammaddeler, gelişmekte olan ülkelerin, özellikle kırsal bölge halkının yegane ilacı olmakla birlikte, ihtiyaç fazlası dış ülkelere ihraç edilir. Tıbbi bitkilerden elde edilen total ekstratlar, oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Saf etken maddeler ise, belirli bir düzeyde fitokimyasal endüstriye sahip ülkelerde üretilmekte, ancak bu ülkelerde de ekonomik nedenlerle genellikle total ekstre üretimi tercih edilmektedir.

Türkiye'de yetiştirilen, ya da yetiştirilmesi mümkün olan bitkilerden üretilen ham droglar, doğrudan ihraç edilmemeli total ekstre ya da saf etken madde eldesi yoluna gidilmelidir. Zira, bu şekilde elde edilecek yarı mamul ya da mamul ürünlerin getireceği katma değer, ülke endüstrisine ve ekonomisine daha çok yarar sağlayacaktır.

Tıbbi bitkilerin endüstriyel çapta işlenmesinde gerekli temel işlemler, şekil 2.6' da şematik olarak gösterildiği gibi, boyut küçültme (kırama, öğütme), ekstraksiyon, süzme, yoğunlaştırma (deriştirme), kurutma ve eğer saf etken madde üretilecekse izolasyondur.

Katı-sıvı ekstraksiyonu (leaching), bir katıdaki bir ya da birden fazla bileşenin bir sıvı çözücü tarafından seçici (selektif) olarak çözülüp alınmasıdır, şeklinde tanımlanabilir.

Bitkisel hammaddelerin ekstraksiyonunda kullanılacak çözücülerde, çözülmesi istenen bileşenler için seçici, kolay bulunur, ekonomik, doygunluk derişimi yüksek, vizkozitesi, yüzey gerilimi düşük olması, korozif, toksik ve patlayıcı olmaması gibi özellikler aranır. Bu nedenle,



Şekil 2.6 Tıbbi bitkilerin endüstriyel çapta işlenmesinde gerekli temel işlemler

en çok kullanılan çözücü su olmakla birlikte, bazı bitkisel hammaddeler için alkol, petrol eteri, hekzan, kloroform gibi organik çözücüler de sık sık kullanılmaktadır.

Bitkisel hammaddenin, kırılma, ya da öğütülmesi, çözücü ile temas yüzeyini artıracığından, ekstraksiyon hızı artacaktır. Bunun yanında, hammaddenin çok ince öğütülmesi ekstraksiyonun perkolatörde uygulanmasına imkan vermeyecek ve hatta karıştırmalı tankta ekstraksiyon sonucunda, istenmeyen maddelerinde çözeltiye geçmesine neden olacak ve katı-sıvı ayırımında zorluklar çıkaracaktır.

Çözülmesi istenen katı madde, bitkisel hammaddelerde hücre içerisinde bulunur. Hücre duvarlarının bozunmadan kalması halinde ekstraksiyon hücre duvarlarından osmotik geçişle sağlanacaktır. Boyut küçültme ile hücre duvarları bozunacak olursa diğer istenmeyen maddelerinde çözücüye kolaylıkla geçmesi ortaya çıkacaktır.

Sıcakta yapılan katı-sıvı ekstraksiyonlarında da katının çözücü içerisinde çözünürlüğü artacak ve daha derişik ekstreler elde edilecektir. Ancak, bazı bitkisel hammaddelerde, sıcakta ekstraksiyonda, aşırı miktarda istenmeyen madde de çözücüye geçmekte ve daha sonraki saflaştırma aşamalarında sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca sıcakta ekstraksiyonlarda, ekstre edilecek maddenin yapısının bozunmaması ve aşırı miktarda çözücü kayıplarının olmaması göz önünde bulundurulmalıdır.

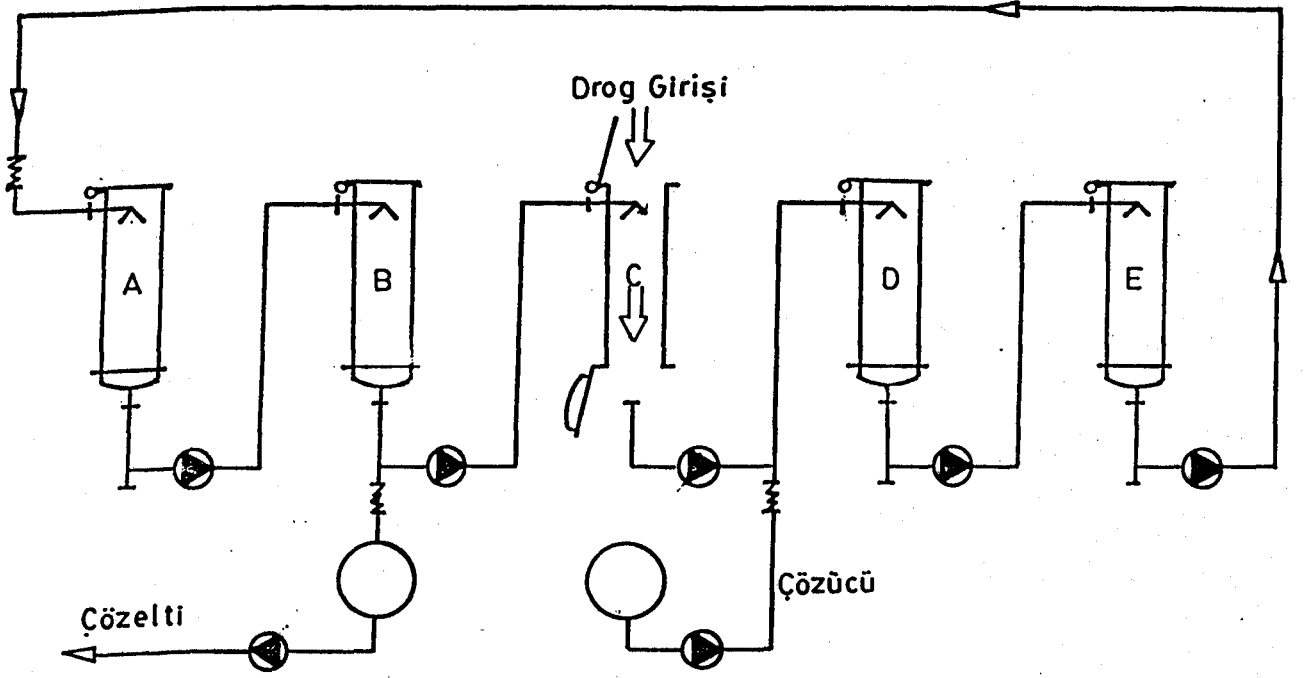
Katı-sıvı ekstraksiyonunda, parçacık boyutunun, çözücünün, sıcaklığın önemi birçok kaynakta bulunabilir (Treybal, 1981; McCabe and Smith, 1976; Banchemo and Badger, 1979; Perry and Chilton, 1984; Rauling, 1982; Schweitzer, 1969 ; Kirk Othmer, 1978).

Ekstraksiyonlarda genellikle, kesikli (batch), yarı-kesikli (semi-batch) ve sürekli (continuous) olmak üzere üç işletim şekli uygulanır. Her bir işletim şeklinde,

kademeli ya da sürekli temas tipi ekstraktörler kullanılabilir. Çözücü, bitki üzerine ya püskürtülerek ya da bitki tamamen çözücü içinde bırakılarak ekstraksiyon yapılır. Uygun işletim şekli ve ekstraktör tipinin seçimi, bitkisel hammaddenin fiziksel özelliklerine, ekstraksiyon şartlarına, üretim kapasitesine ve ekonomiyi etkileyen diğer parametrelere bağlıdır.

Perkolatör, bitkisel hammaddelerden ekstre üretiminde kullanılan en basit ve geleneksel ekstraktördür. Kapasitesi büyük, alt kısmına delikli plaka yerleştirilmiş, yüksek sıcaklıklarda çalışılması gerektiğinde bir ceketle ısıtılabilen ve iri parçacıklı hammaddelerin ekstraksiyonunda kullanılan perkolatörlerde, hammadde ve çözücü statik temasta bulunabileceği gibi, sıvı devamlı olarak sirküle edilebilir. Genellikle birden fazla perkolatör ya ayrı ayrı ya da şekil 2.7' de görüldüğü gibi seri halde işletilir. Seri işletimde seyreltik çözelti bir perkolatörden diğerine aktarılarak, istenilen derişime erişinceye kadar işleme devam edilir. Perkolatörde, tıkanmaya neden olmamak için, mümkün olduğu kadar aynı büyüklükte kırılmış bitkisel hammaddenin ekstraksiyonu yapılmalı, çok ince öğütülmüş maddelerin ekstraksiyonundan kaçınılmalıdır.

Perkolatörlerden başka, tıbbi bitkilerden ilaç hammaddeleri üretiminde kapasite, işletim şartları ve hammadde özelliklerine göre çok değişik tipte ekstraktörlerde kullanılmaktadır. Bu konuda, karosel (rotasel) ekstraktör, zıt akımlı helezonik ekstraktör, karıştırıcılı ekstraktör, U-ekstraktörü, extr-o-mat ekstraktörü, bant ekstraktörü gibi bir çok ekstraktör tipleri sayılabilir. Daha ayrıntılı bilgi aşağıdaki kaynaklarda bulunabilir (Treybal, 1981; Perry and Chilton, 1984; Hill, 1977; Rawlins, 1982; Başer ve Kara, 1987; Schweitzer, 1969)



Şekil 2.7 Perkolatör bataryası

2.5 Atkestanesinde Essin İzolasyonu Üzerine Önceki çalışmalar

Yapılan kaynakça taramasından, Türkiye'de atkestanesi ekstraksiyonu ya da essin izolasyonu konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bununla birlikte, yurt dışında özellikle Avrupa'da bu konuda bir çok araştırma yapılmış olup patentlerde mevcuttur.

Ekstraksiyon işlemleri, genellikle değişik tür ve oranlarda alkol-su çözücü sistemleriyle yapılmış, ya öncelikle kuru total ekstre elde etme yönüne gidilmiş, ya da doğrudan essin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların çoğunda ise kuru total ekstre başlangıç maddesi olarak alınmış ve tedavide kullanılabilecek essin izolasyonuna gidilmiştir.

Bunlardan, bir Alman patenti (1 902 609), atkestanesi kuru ekstresinin propanol/etil asetat/su karışımında çözülmesi ve bu çözeltinin alumina doldurulmuş kromatografi kolonundan geçirilerek saflaştırılmasına dayanmaktadır. Ancak adsorbanın essine oranının çok yüksek olması gerektiğinden essin izolasyonu için ekonomik bir teknik olmadığı düşünülmektedir (Rucman and Jankoviç, 1976a).

Bir diğer Alman patentinde (1 617 581) ise, atkestanesinin asidik sulu ekstresinin, alifatik alkol ve klorlu hidrokarbon karışımı ile ekstraksiyonundan saf essin elde edilme yöntemi verilmiştir. Bununla birlikte essin ve flavonoidlerin verilen dağılma katsayıları aynı olduğundan tam ayırım sağlanamamış ve böylece patentte de belirtildiği gibi son ürün renkli olarak elde edilmiştir (Rucman and Jankoviç, 1976a).

Başka bir Alman patentindeki (2 339 760) metoda göre, başlangıç maddesi olan atkestanesi ekstresi, üçlü sistem kloroform/metanol/su da çözülmüş ve beyaz renkte daha saf

essin elde edilmiştir. Bununla birlikte çözünme sırasında ayrılması zor bir emülsiyonla karşılaşmıştır (Rucman and Jankoviç, 1976a).

Fransız 2 361 420 nolu patentte ise, ilk üç yöntemden farklı olarak, atkestanesinde doğrudan essin elde edilmiştir. Bu yöntemde, ara basamak olan atkestanesi ekstresini herhangi bir yöntemle hazırlamaya gerek yoktur. Öğütülmüş atkestanesi, su ile doyurulmuş alifatik alkol (tercihan n-bütanol) ve alifatik alkol ile doyurulmuş su sistemi ile ekstre edilir. Elde edilen organik faz, su ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulup, polaritenin etil asetat ile değiştirilmesinden sonra, alkali bikarbonatın sudaki çözeltisiyle ekstre edilip kurutularak essin tuz haliyle elde edilir. Metanolde çözülüp, önce H⁺ formundaki katyon değiştiriciden, daha sonrada aktif karbon kolonundan geçirilip, kurutularak, beyaz toz halde essin elde edilmiştir. Yöntemde 4 kg atkestanesinde başlanarak sonuçta 88 g essin elde edilmiştir (Rucman and Jankoviç, 1976a; Rucman and Jankoviç, 1976b; Rucman and Jankoviç, 1978).

Ayrıca 2 530 941 nolu Alman patentinde ise, öğütülmüş atkestanesi, su ile karışan düşük alifatik alkollerle ekstre edilmiştir. Katyon değiştiriciden geçirilen ekstre, yoğunlaştırılarak essin çökmeye bırakılmış ve çöken essin süzme ya da santrifüj yoluyla ayrılmıştır. Yöntemde çözücü olarak %65 metanol-su sistemi kullanılmıştır (Madaus, 1975).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada, Eskişehir'den toplanmış atkestaneleri gölgede kurutulduktan sonra, laboratuvar, pilot ve yarı endüstriyel ölçekte ekstre edilerek, kuru total ekstre ve etken madde essin saf olarak elde edilmiştir.

3.1 Laboratuvar Ölçekte Yapılan Ön Çalışmalar

Laboratuvarda yürütülen çalışmalarda, atkestanesinin ekstraksiyonunda, uygun çözücü sisteminin ve çalışma şartlarının seçimi yapılmıştır. Öncelikle atkestanesinin toplam çözülebilir madde ve essin içeriği tayin edilmiş ve essin izolasyonu yöntemleri araştırılmıştır. Ayrıca, öğütülen atkestanelerinde parçacık boyutu, nem ve yoğunluk gibi fiziksel özellikler de belirlenmiştir.

3.1.1 Boyut küçültme, elek analizi, nem tayini

Kurutulmuş kestanelerin öğütülmesinde, saatte 3 kg kapasiteli Cullatti DFH 48 tipi öğütücü kullanılmıştır. Öğütülen kestanede, ASTM elek serisi kullanılarak elek analizi uygulanmış ve ortalama tanecik boyutu 0.8 mm olarak tayin edilmiştir. Yapılan araştırmada, elde edilen sonuçların değerlendirilmesi kuru baz üzerinden yapıldığından, ekstraksiyonlarda kullanılan hammaddenin nem miktarının bilinmesi gereklidir. Nem miktarı tayini, Shimadzu Libror EB-280 MOC elektronik nem tayin cihazında, 105°C sıcaklıkta, sabit tartıma gelinceye kadar kurutularak yapılmış ve %4-5 olarak bulunmuştur.

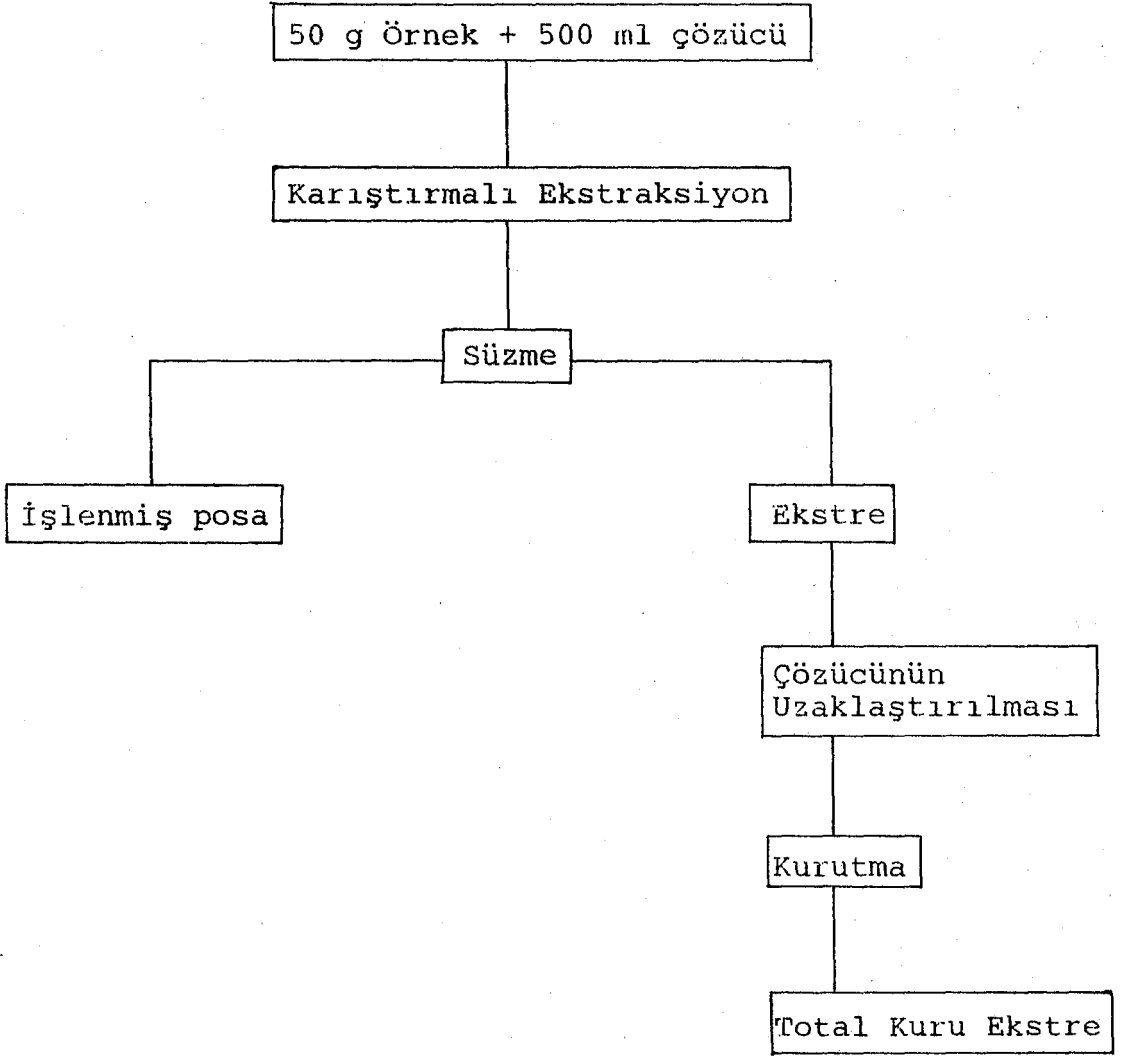
3.1.2 Ekstraksiyon yöntemi

Literatürde, atkestanesi ekstraksiyonlarının, genel olarak alkol-su karışımının değişik oranlarıyla yapıldığı verilmiştir. Bu araştırmada, alkol olarak etanol kullanılmıştır. Etanol-su karışımının yüzde 30-70 arasında değişen oranlarıyla ekstraksiyonlar yapılmış ve bu çözücülerin ekstraksiyon verimi ve ekstredeki essin yüzdesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu grup çalışmada, ekstraksiyonlar oda sıcaklığında, karıştırmalı olarak gerçekleştirilmiş, çalışmalarda karıştırma hızı ve katı/çözücü oranı (1/10) sabit tutulmuştur.

Ekstraksiyonlarda, nem miktarı bilinen 50 g örnek alınmış, çözücü ilavesiyle karıştırmalı olarak ekstre edilmiştir. Süzülerek işlenmiş posadan ayrılan ekstre, Buchi 165 vakum kontrollü RE-111 rotavapor ile yaklaşık 50°C da vakum altında kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır (şekil 3.1).

Atkestanesinde, en yüksek etanol-su ekstraksiyon verimi ve essin yüzdesinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada ise, %50 etanol-su çözücü sistemi kullanılarak, oda sıcaklığında ve sıcakta (55-60°C) olmak üzere iki grupta yapılan ekstraksiyon işlemi ile tüm çözünebilir madde çözeltiye alınmış, toplam ekstre ve essin miktarı tayin edilmiştir. Bu ekstraksiyon için yine 50 g örnek alınmış, 500 ml çözücü ilavesiyle 2 saat karıştırmalı ekstraksiyon yapılmıştır. Süzülerek, posa ekstreden ayrılmış ve posa üzerine tekrar 500 ml çözücü ilavesiyle 2 saat ekstraksiyona devam edilmiştir. Bu işlem, atkestanesindeki tüm çözünebilir madde tüketilinceye kadar 5 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.1 Laboratuvarda yapılan karıştırmalı ekstraksiyon işlem basamakları

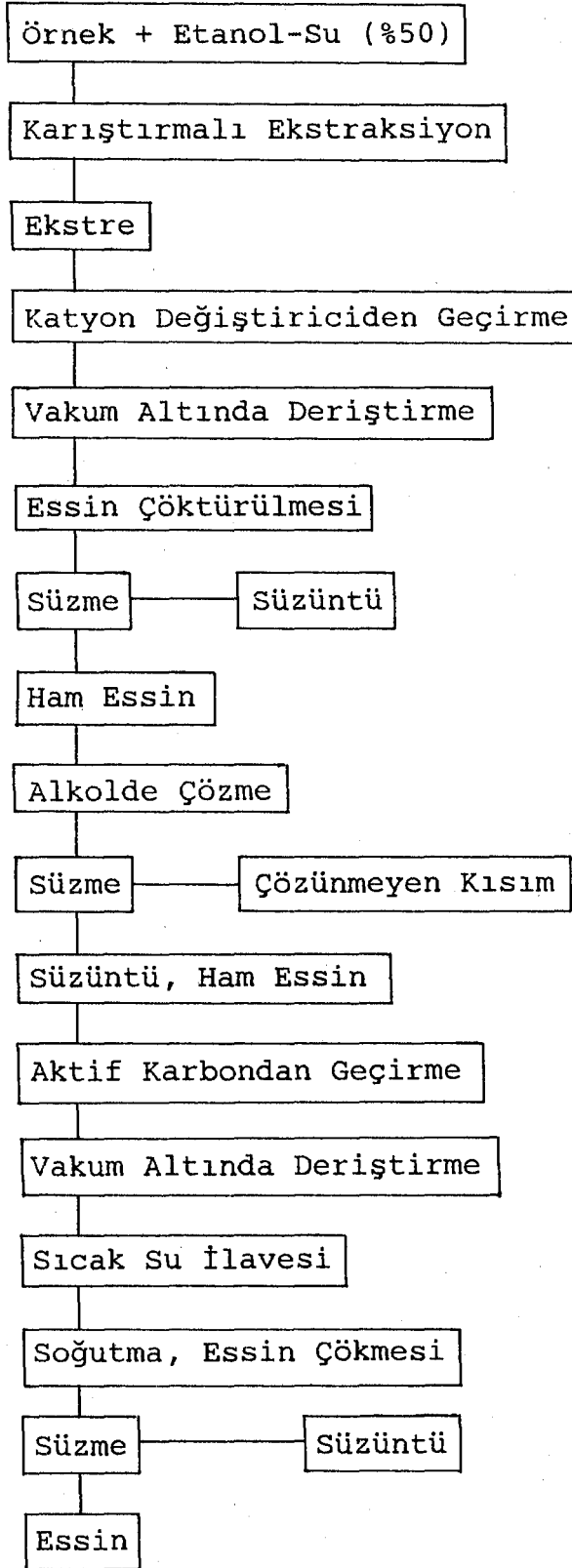
Çalışmanın bütünlüğü açısından, çözücü olarak, etanol-suyun yüzde 30-70 arasında değişen oranları yanında, distile etanol (%96), saf su ve %65 metanol-su da kullanılmış ve ekstraksiyon verimleri tayin edilmiştir.Yapılan kıyaslamada, %50 etanol-su sistemi ile çalışmalara devam edilmesi uygun görülmüştür.

3.1.3 Essin izolasyonu

Atkestanesinden etken madde olan essinin saf olarak izolasyonu için, literatürde verilen yöntemlerden ikisi üzerinde durulmuştur. Bu yöntemler, kestanenin %50 etanol-su (Alman 2 530 941 nolu patent) ve n-bütanol-su (Fransız 2 361 420 nolu patent) çözücü sistemleriyle ekstraksiyonuna dayanmaktadır (Madaus, 1975; Rucman and Jankoviç, 1976a).

3.1.3.1 Etanol-su çözücü sistemiyle yapılan ekstraksiyondan essin izolasyonu

Bu yöntemle essin izolasyonunda, örnek yukarıda anlatıldığı gibi %50 etanol-su çözücüsüyle ekstre edilir. Ekstre, 100 ml lik bürette 50 ml H⁺ formunda Levatit katyon değiştirici reçine doldurulması ile hazırlanmış kolondan geçirilir. Bu şekilde, PH=2.5-3.5 olarak elde edilen çözelti, rotavaporda 50°C de, vakum altında buharlaştırılarak, yaklaşık 1/3 e kadar yoğunlaştırılır ve soğumaya bırakılarak ham essinin çökmesi sağlanır. Süzülerek ayrılan essin, etanolde tekrar çözülerek süzülür. Çözelti, aktif karbon doldurulmuş kolondan geçirilerek renk giderilir ve rotavaporda yaklaşık 50°C da vakum altında deriştirilir. Sıcak, derişik etanollu çözelti üzerine iki katı kadar 80-90°C da sıcak su ilave edilerek soğumaya bırakılır. Çalışmada izlenen yol şematik olarak şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 Essin izolasyonu işlem basamakları

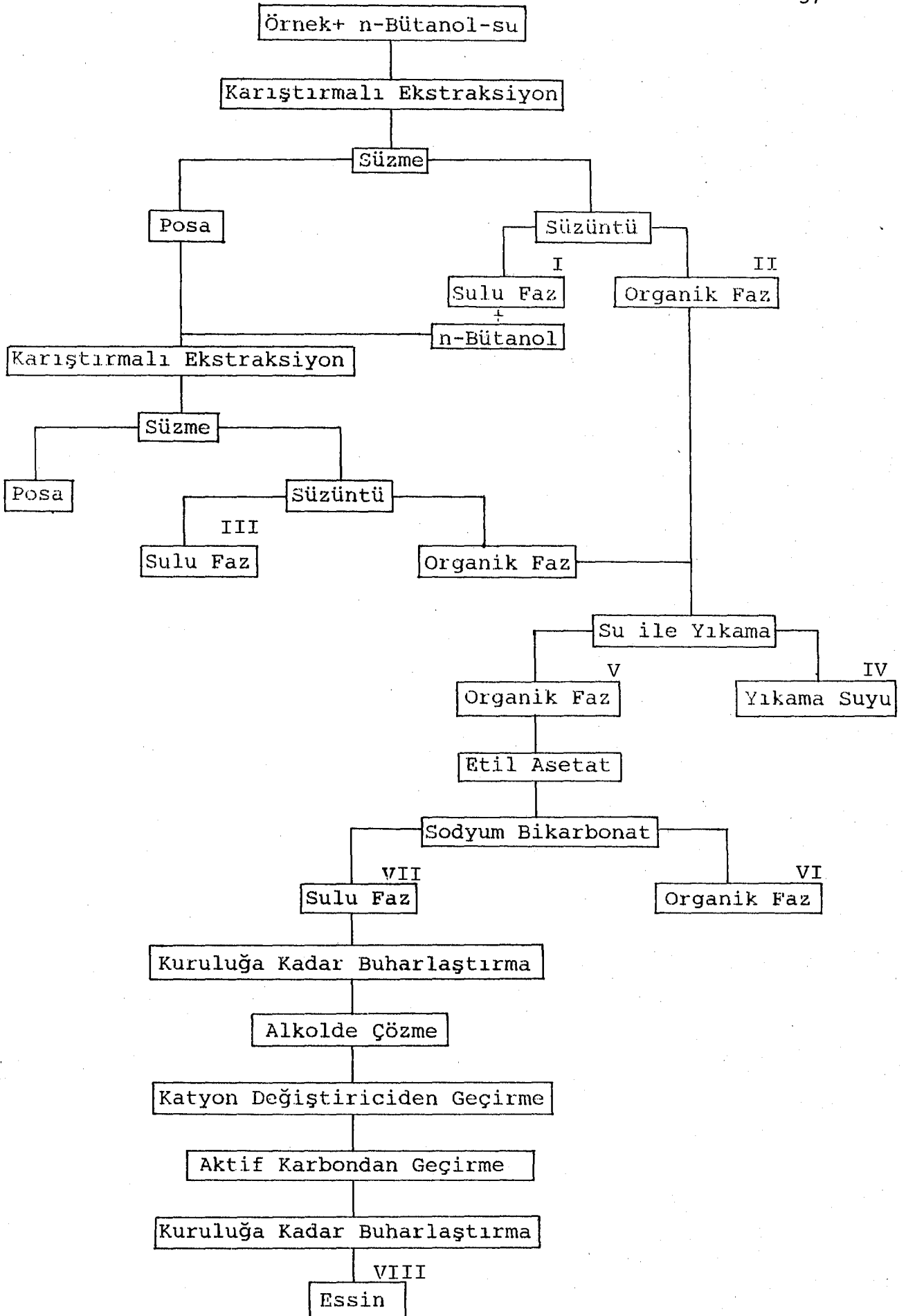
3.1.3.2 n-Bütanol-su çözücü sistemiyle essinin doğrudan izolasyonu

Bu çalışmada, Fransız 2 361 420 nolu patentte verilen yönteme bağlı kalınarak, su ile doymuş n-bütanol ve n-butanol ile doymuş sudan oluşan iki fazlı çözücü sistemi kullanılmış ve bu amaçla 80 g örnek 216 ml n-bütanol-194 ml su-2 ml hidroklorik asit ile 2 saat süreyle karıştırmalı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Daha sonra, süzülerek posadan ayrılan ekstre, ayırma hunisinde bekletilerek iki faza ayrılmıştır. n-Bütanol ile doymuş su fazı ve posa, 216 ml n-bütanol ile tekrar 2 saat karıştırmalı olarak ekstre edilmiştir. Ekstre, süzülerek ayırma hunisine alınmış, n-bütanol ve su fazlarının ayrılması sağlanmıştır. Buradan alınan n-bütanol fazı, önceki n-bütanol fazı birleştirilmiştir. Bu çözelti, üç kez 200 ml su ile yıkanmıştır. Daha sonra, yaklaşık 400 ml etilasetat ve 100 ml %1 sodyum bikarbonat ilave edilerek ekstre edilmiş ve essin sodyum tuzu halinde alınmıştır. Kuruluğa kadar buharlaştırılmış, alkolde çözülmüş ve H⁺ formundaki katyon değiştirici kolondan geçirilmiştir. Daha sonra, aktif karbonlu kolondan geçirilerek 50°C da vakum altında kuruluğa kadar buharlaştırılarak essin elde edilmiştir. Yöntemde izlenen yol şekil 3.3'de verilmiştir.

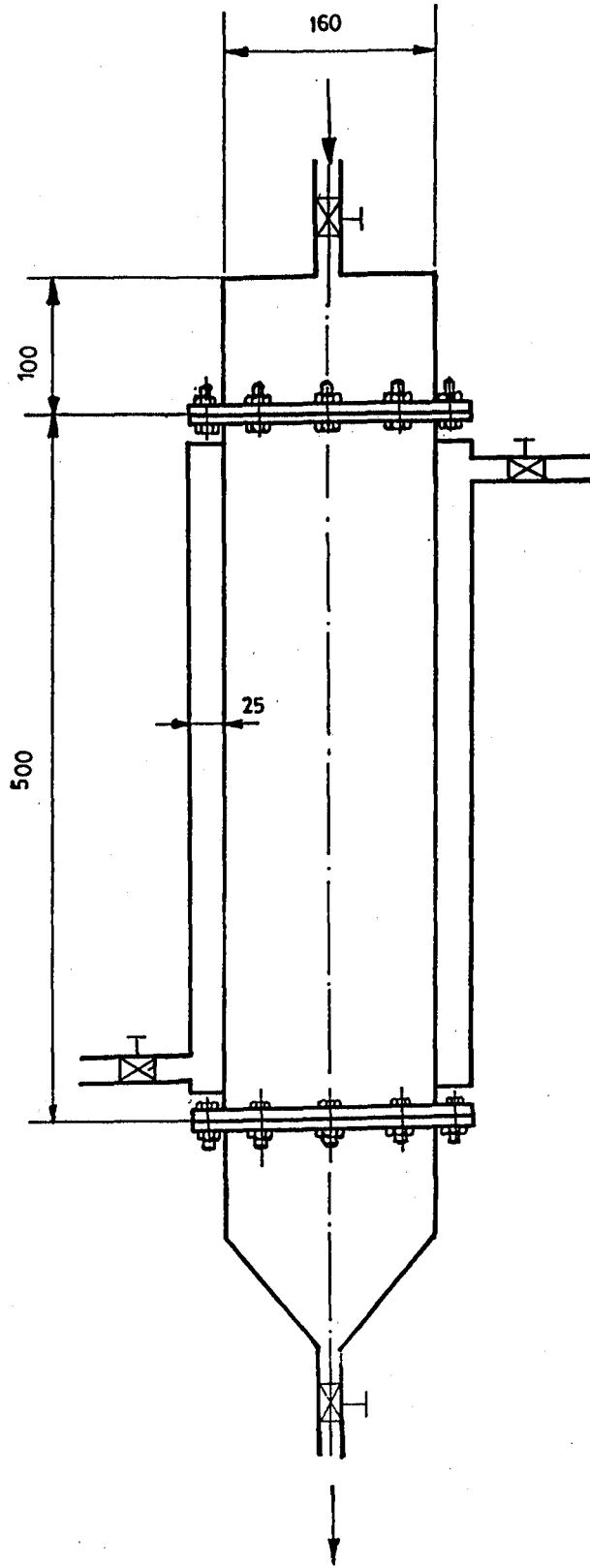
3.2 Pilot Ölçekte Ekstraksiyon

Bir önceki bölümde yapılan laboratuvar ön çalışmalarını sonucunda çözücü sistemi, sıcaklık, total ekstre ve saf essin verimleri belirlenmiş ve bu çalışmaların ışığı altında pilot ölçekte çalışmalara geçilmiştir.

Bu amaçla, 10 litre kapasiteli, ısıtma ceketli, paslanmaz çelikten yapılmış, şekil 3.4' de gösterilen silindirik perkolatör kullanılmıştır.



Şekil 3.3 Essin izolasyonu işlem basamakları (n-Butanol-Su)



Şekil 3.4 Pilot ölçekli perkolatör

Pilot ölçekli perkolatörde yapılan araştırmaların sonuçlarının, 500 litre kapasiteli yarı endüstriyel üretim perkolatöründeki çalışmalara temel oluşturması düşünöldüğünden, bu gruptaki çalışmalarda, parçacık boyutu, katı/sıvı oranı, süre (akım hızı), sıcaklık ve çözücü geçirme yöntemleri gibi değişkenlerin ekstraksiyon ve essin verimine etkileri belirlenmiştir.

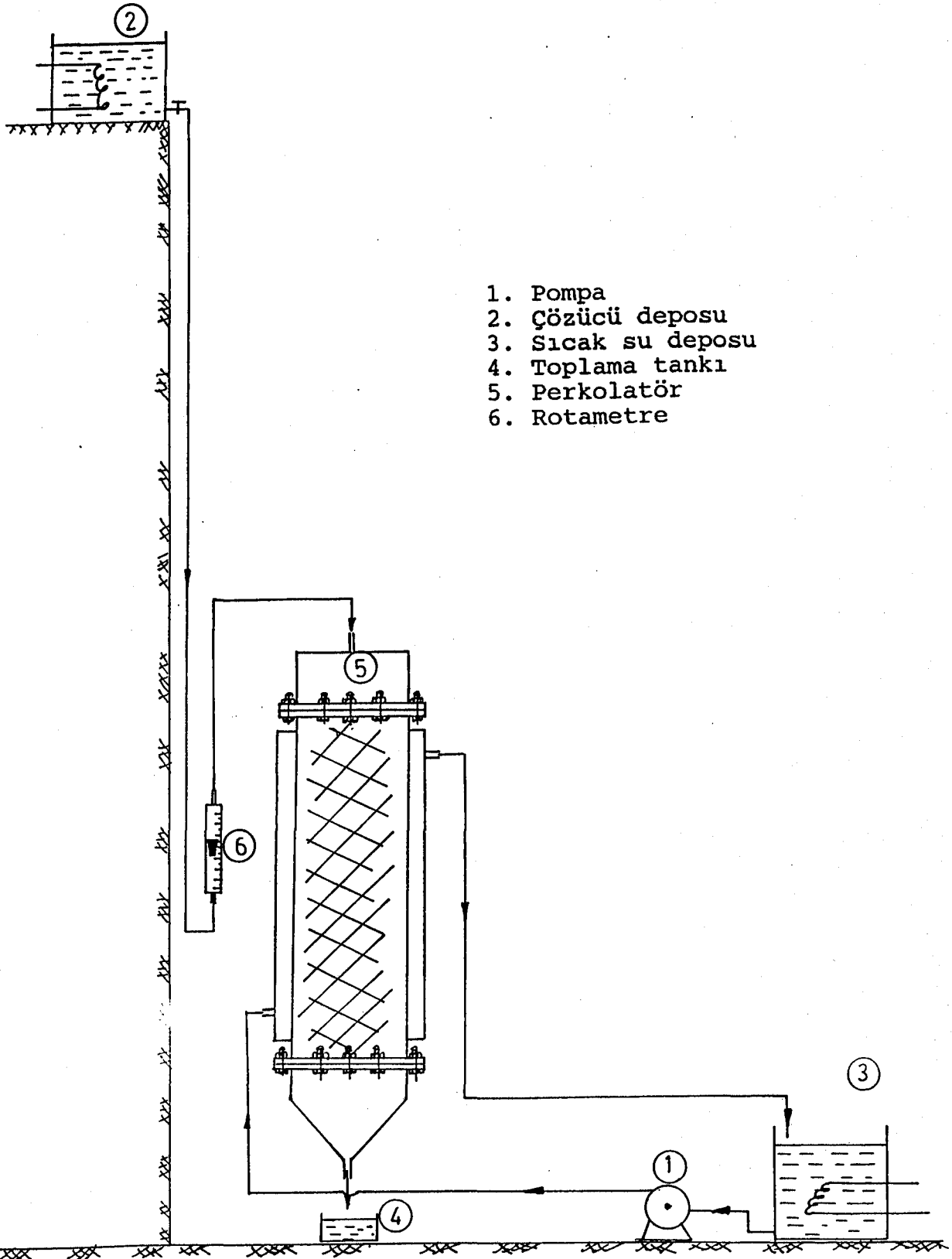
Ekstraksiyonlarda kullanılan düzeneğin şeması şekil 3.5'de verilmiştir.

Ekstraksiyonlarda, çözücü akımı, yaklaşık 3 m yüksekteki çözücü tankından yer çekimiyle ya da bir santrifüj pompa yardımıyla sağlanmıştır.

Çözücünün perkolatör yatağından geçiş hızı bir vana yardımıyla ayarlanmış ve kalibrasyonu yapılmış bir rotametre ile ölçülmüştür. Bu şekilde, tüm çözücünün yataktan belirli sürede geçişi sağlanmış ve ekstre direk olarak alttan toplama kabına alınmıştır. Sirkülasyonlu çalışmalarda ise, toplanan ekstre bir pompa yardımıyla tekrar yukarıdaki çözücü tankına gönderilerek perkolatörde istenilen sürece sirküle edilmiştir.

Sıcakta yapılan çalışmalarda, perkolatör ceketinden sıcak su geçirilerek ve çözücü, tanktaki daldırmalı bir elektrik rezistanslı ısıtıcı yardımıyla ısıtılarak istenilen sıcaklık sağlanmıştır.

Ekstraksiyon veriminin hesaplanması için, tüm ekstre miktarı ölçülmüş ve bundan belli miktarda alınarak pilot ölçekte, Buchi rotavapor R-151 de kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Bu şekilde hesaplanan verimin, tüm ekstrenin kuruluğa kadar buharlaştırılmasıyla hesaplanan verimle aynı olduğu görölmüş ve böylece ileriki çalışmalarda, özellikle essin izolasyonunda, tüm ekstrenin kuruluğa kadar buharlaştırılmasına gerek olmadığından, toplam ekstraksiyon verimi bu yöntemle belirlenmiştir.



Şekil 3.5 Pilot ölçekli ekstraksiyonlarda kullanılan düzenek

Çalışmalarda öncelikle, kuru atkestaneleri saatte 50 kg kapasiteli Gondard Çekiçli kırıcısında kırılarak herhangi bir ön elemeye tabi tutulmadan 4 kg tartılarak perkolatöre yüklenmiştir. Çözücü tankından yer çekimi ile sağlanan akımın yaklaşık 5 litresi perkolatörden geçtikten sonra, atkestanesi yatağı geçirgenliğini kaybetmiş ve çözücü akmaz hale gelmiştir. Akımın sağlanmasında yerçekimi yerine santrifüj pompanın da denenmesi olumlu sonuç vermemiş ve perkolatörde tanecik büyüklüğünün çalışılmasının önemini göstermiştir.

3.2.1 Parçacık boyutu seçimi

Perkolasyonda parçacık boyutunun önemi göz önüne alınarak, kırıcıdan alınan atkestanesi ASTM elek setinin ilk dört serisi olan 1.8 mm (12 mesh), 0.85 mm (20 mesh), 0.425 mm (40 mesh), 0.215 mm (60 mesh) delik çaplı eleklerin üzerindeki örneklerin herbirinin dörder kilogramıyla yapılan çalışmalar sonunda, 0.215 mm ve 0.425 mm delik açıklığı olan eleklerin üzerinde kalan örneklerin, perkolatörde tıkanmaya neden olduğu görülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda, kırıcıdan alınan örnekten, bu iki kısım elenerek ayrılmış ve ortalama 1.5 mm parçacık boyutlu atkestanesi yatağından, perkolatörde çözücünün geçmesiyle ilgili önemli bir sorunla karşılaşılmamış ve bu ortalama 1.5 mm ortalama tanecik çaplı atkestanesi ileri çalışmalarda kullanılmıştır.

Parçacık boyutu seçimi için yapılan çalışmalarda, 4 kg örnek tartılarak perkolatöre konulmuş, 1/10 çözücü oranı sabit tutularak, %50 etanol-su çözücüsü oda sıcaklığında, perkolatörden belirli sürelerde geçirilmiş ve ekstraksiyon verimleri izlenmiştir.

3.2.2 Katı-çözücü oranının belirlenmesi

Fiziksel olarak, bir ekstraksiyonda, aşırı miktarda çözücü kullanılarak çözünebilen maddenin tamamına yakını çözeltiye alınabilir. Ancak bu durumda, çözücünün geri kazanılması işlemlerinde genellikle buharlaştırma söz konusu olduğundan, önemli miktarda enerji harcanması ve belirli bir oranda da çözücü kaybı ortaya çıkacaktır.

Bu göz önünde bulundurularak, istenilen orandaki çözünebilir madde, mümkün olduğu kadar az çözücü kullanılarak ekstraksiyon yoluna gidilir. O halde ekstraksiyon değişkenlerinin belirlenmesinde, kullanılacak en uygun katı/sıvı oranı, araştırılacak önemli faktörlerden birisidir.

Bu araştırmada, katı/çözücü oranının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar iki şekilde yürütülmüştür.

İlk grup ekstraksiyonlarda, katı/çözücü oranı 1/4, 1/6, 1/8, 1/10 olarak değiştirilmiş ve her bir çözücü miktarı bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde, oda sıcaklığında 1.5 mm parçacık boyutlu perkolatör yatağından belirli sürelerde geçirilmiş ve ekstraksiyon verimleri tayin edilmiştir.

İkinci grup ekstraksiyonda ise katı-çözücü oranı 1/4, 1/6, 1/8 olarak değiştirilmiş, bu grup çalışmalarda perkolatör yatağından çözücü, sistemdeki tüm vanaların açık tutulmasıyla geçebileceği en yüksek akış hızında geçirilmiş ve alınan ekstre depoya bir pompa yardımıyla gönderilerek ekstraksiyonun sirkülasyonlu olması sağlanmıştır. Çalışmalarda, ekstraksiyon süresince 30, 45, 60, 120, 240, dakikalar sonunda örnekler alınarak ekstraksiyon verimi izlenmiştir. Sirkülasyonlu çalışmalar, oda sıcaklığında ve

ekstraksiyon verimine sıcaklığın etkisinin izlenebilmesi amacıyla, sıcakta (55-60°C) olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmiştir.

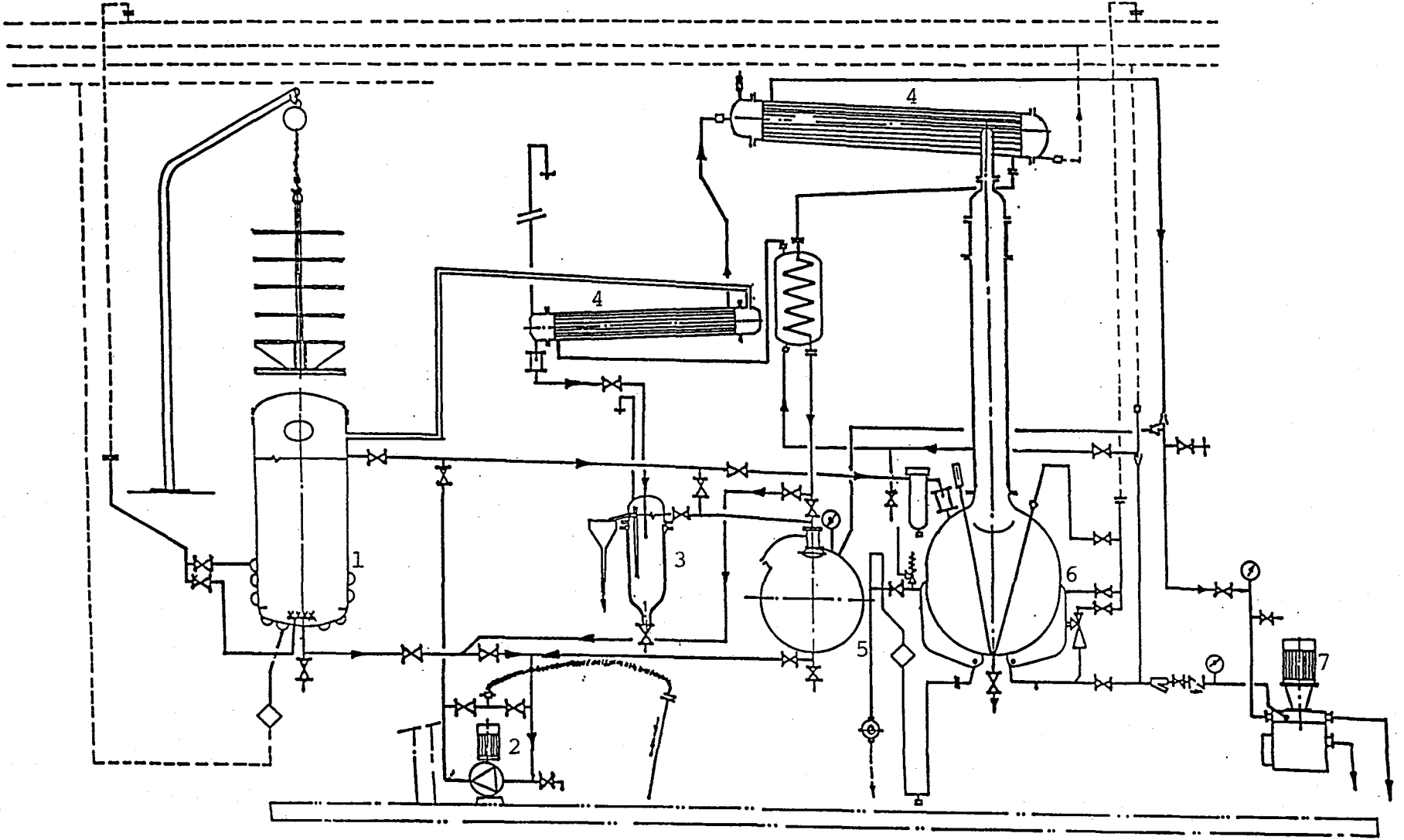
3.2.3 Essin izolasyonu

Pilot ölçekteki çalışmalarda, (10 litre kapasiteli perkolatörde), 1/6, katı/çözücü oranı kullanılarak, 1.5 mm ortalama tanecik boyutundaki yatakta, 2 saat, oda sıcaklığında sirkülasyonlu ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yaklaşık 20 litre çözelti, 5 litre H⁺ formda Levatit katyon değiştiricili kolondan, pH=2.5-3.5 arasında, geçirilmiştir. Alınan asidik çözelti, Buchi R-151 pilot ölçek rotavaporunda, vakum altında, 50°C da yaklaşık 7-8 litreye kadar deriştirilmiş ve essin soğutularak çökmeye bırakılmıştır. Elde edilen ham essin, kurutulup tartılmış, ayrıca saflık dereceleri tayin edilmiştir. Daha sonra, sıcak alkolde çözülüp üzerine sıcak su ilavesiyle tekrar çöktürülmüş ve ayrılıp, kurutulularak, beyaz toz essin elde edilmiştir.

3.3 Yarı Endüstriyel Ölçekte Ekstraksiyon İle Essin izolasyonu

Yukarıda belirtilen 10 litre kapasiteli perkolatörde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulardan hareketle, üretim amacıyla, Tournaire firmasından temin edilen ve şekil 3.6' da gösterilen, 500 litre kapasiteli, buhar ceketli, gerektiğinde posadan çözücüyü geri kazanmak için direk buhar verilebilecek, silindirik paslanmaz çelik, çok amaçlı ekstraksiyon ünitesinde çalışılmıştır.

Çalışmalarda, 1.5 mm ortalama tanecik çapındaki 60 kg atkestanesi ekstraktöre yüklenmiş, daha sonra 1/6, katı/çözücü oranında, %50 etanol-su çözücü sistemi ilave edilmiş ve sirkülasyonlu olarak oda sıcaklığında, 4 saat



Şekil 3.6 Yarı endüstriyel üretim ölçekli çok amaçlı ekstraksiyon ünitesi

- | | | |
|---------------|------------------------|--------------------------------|
| 1. Ekstraktör | 2. Sirkülasyon pompası | 3. Geri kazanılan çözücü tankı |
| 4. Kondenser | 5. Depolama tankı | 6. Evaporatör |
| | | 7. Vakum pompası |

ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon süresince 30, 45, 60, 120, 240 dakikalarda çözelti örnekleri alınarak, ekstraksiyonun gelişimi izlenmiştir. Ekstraksiyon sonunda katı ile birlikte kalan doymuş çözelti belirli bir miktar çözücü ile akıtılarak kazanılmıştır.

Sonuçta, elde edilen, yaklaşık 300 litre çözelti paslanmaz çelik toplama tankına alınmıştır. Çözelti, yine aynı H^+ formda Levatit katyon değiştiricili kolondan geçirilmiş ve daha sonra Tournaire firmasından temin edilmiş 500 litre kapasiteli, paslanmaz çelik, ceketten ısıtmalı buharlaştırıcıya alınarak, (şekil 3.6), $50^{\circ}C$ da vakum altında yaklaşık 120 litre kalıncaya kadar deriştirilmiştir. Buharlaştırıcıdan alınan yoğun ekstre soğumaya bırakılarak, çöktürülmüştür. Vakum altında süzöldükten sonra elde edilen çökelti, alkolde çözölüp kaba süzgeç kağıdından tekrar süzölmüş ve pilot ölçekte rotavaporda kuruluğa kadar buharlaştırılarak, elde edilen ham essin miktarı belirlenmiştir. Ayrıca, bu ham essinin saflık derecesi, İTK dansitometresi ve YBSK ile tayin edilmiştir.

Hafif sarı renkli olan ham essin, sıcak alkolde çözölüp üzerine sıcak su ilavesiyle tekrar çöktürölmüş, çözeltiden ayrılıp, kurutularak beyaz toz essin elde edilmiştir.

Ekstraktördeki posa üzerinde kalan çözücü, çıplak buhar gönderilerek geri kazanılmıştır.

3.4 Çalışmalarda Elde Edilen Ürünlerin İncelenmesi

Yapılan çalışmaların kantitatif olarak değerlendirilebilmesi ve birbirleriyle kıyaslanarak uygun işletme değişkenlerinin seçilebilmesi için, kuru total ekstrenin essin miktarı ve izole edilen essinin saflık derecesinin tayin edilmesi gerekir.

Daha önceki araştırmacıların çalışmaları incelendiğinde, essinin kantitatif tayini yöntemlerine kısaca değinmek yerinde olacaktır.

Boguslauskaya and Zykova (1977), tarafından verilen UV-spektrometrik yöntemde %3.7 hata ile essin tayini yapılmıştır.

Glasl und Ihrig (1984), çalışmalarında, ince tabaka kromatografisi İTK -dansitometresi kullanmışlardır. Yürütücü sistem olarak, n-butanol:asetik asit:su (5:1:4) kullanılmış, lekeler, %10 sülfürik asit ile renklendirilmiştir.

Vanhaelen and Vanhaelen-Fastre (1983), atkestanesi ekstresinde İTK-dansitometresi ile essin tayininde, 1,2-diklorometan:etanol:metanol:su (50:20:20:6) sistemini yürütücü olarak, %1 vanilin ve %5 sülfürik asitin alkoldeki karışımı da belirteÇ olarak kullanılmış ve sonuÇlar %3.2 lik hata ile verilmiştir.

Franck (1975), atkestanesi total ekstresinde essin miktar tayinini, kantitatif fluorometrik İTK-dansitometresi kullanarak gerçekleştirmiştir. Total ekstre, n-bütanol:metanol:%25 amonyak (10:2:5), yürütücü sistemde yürütülmüş, kurutulan plak üzerine nil mavisi püskürtülerek renklendirilmiştir. SonuÇlar, %4-5 hata ile verilmiştir.

Floumetrik İTK-dansitometresi kulanarak essin miktar tayini üzerine diğer bir metotda, Hammerstein und Kaiser (1972), tarafından, %1.5 hata ile verilmiştir.

Wagner, et al., (1985), çalışmalarında yüksek basıncılı sıvı kromatografisi (YBSK) ile essin tayinini iç standart yöntemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Bu çalışmalar dikkate alınarak, yapılan çalışmalarda elde edilen kuru total ekstrelerin essin yüzdelerinin ve saflaştırılan essinin saflık derecelerinin belirlenebilmesi için, spektroskopik ve kromatografik yöntemler kullanılmıştır.

Yapılan çalışmada, kuru total ekstrelerin essin yüzdelerinin belirlenmesi amacıyla, İTK-dansitometresi kullanılmıştır. Bunun yanında, YBSK de, İTK-dansitometresi sonuçlarının kontrol edilmesinde ve izole edilen essinlerin saflıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Bu çalışmada, standart olarak kullanılan essin ve kuru total ekstre, Indena S.P.A. Gruppo Inverni Della Beffa, İtalya'dan temin edilmiştir.

3.4.1 İnce tabaka kromatografisi-dansitometresi

Bu konuda yapılan önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak, bu çalışmada geliştirilen İTK-dansitometresi ile essin miktar tayini yönteminin ön çalışmalarında, tayini yapılacak olan essin 210 nm gibi düşük bir dalga boyunda en yüksek absorbanşı gösterdiğinden, görünür bölgede çalışabilmek amacıyla, çizelge 3.1'de gösterilen 4 farklı belirteç denenmiştir. Sonuçta, essinin 537 nm de en yüksek absorbanşı gösterdiği belirlenen, %10 sülfürik asit en uygun belirteç olarak seçilmiştir (Wagner, et al., 1984 ; Stahl, 1969; Wagner, et al., 1970).

Daha sonra, en uygun yürütücü sistemin seçilebilmesi amacıyla, çizelge 3.2 de verilen 18 farklı yürütücü sistem denenmiş sonuçta, kloroform:metanol:gla.asetik asit:su (60:32:12:8) sistemi seçilmiştir (Wagner, et al., 1984 ; Stahl, 1969; Gosparic and Churacek, 1979; Götz, et al., 1980; Wagner, et al., 1970). Analizde izlenen yöntemde, İTK plağına 5 µl, Drommond pipetler ile tatbik edilmiş, plak

Çizelge 3.1 İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında denenen belirteçler

Belirteç	Hazırlanışı
%10 sülfürik asit	sülfürik asidin %10 luk çözeltisi 105-110 °C da etüvde bekletilir
Antimon III klorür	%20 Antimon III klorürün kloroformdaki çözeltisi 100 °C da etüvde 5-6 dak. bekletilir.
Vanilin-sülfürik asit	1 g vanilin 100 ml d.sülfürik asitte çözülür 120 °C da etüvde 15 dak. bekletilir.
Karomovsky	10 ml %50 lik sülfürik asit ile 100 ml %2 lik metanollu 4-hidroksibenzaldehit çözeltileri karıştırılır. 105-110 °C da etüvde 15 dak. bekletilir.

Çizelge 3.2 İnce Tabaka Kromatografi Çalışmalarında denenen yürütücü sistemler

5:1:4 (üst faz)	Butanol:Asetik Asit:Su
50:20:20:6	1,2 Diklorethan:Etanol:Metanol:Su
64:50:10	Kloroform:Metanol:Su
4:1:1	Bütanol:Asetik Asit:Su
50:50:2	Kloroform:Metanol:Su
50:50	Kloroform:Metanol
58:35:7	Kloroform:Metanol:Su
50:20:20:5	Kloroform:Metanol:Asetik Asit:Su
65:35:10	Kloroform:Metanol:Su
65:35:8	Kloroform:Metanol:Su
75:50:10:20	Kloroform:Metanol:Asetik Asit:Su
64:50:4:8	Kloroform:Metanol:Asetik Asit:Su
64:50:10:20	Kloroform:Metanol:Asetik Asit:Su
64:51:8:8	Kloroform:Metanol:Asetik asit:Su
70:50:10	Kloroform:Metanol:Su
60:50:5:10	Kloroform:Metanol:Asetik Asit:Su
64:50:4:4	Kloroform:Metanol:Asetik Asit:Su
60:32:12:8	Kloroform:Metanol:Asetik Asit:Su

yürütücü sistemde 10 cm yürütüldükten sonra, çıkarılıp kurutulmuş ve belirteç otomatik püskürtücü ile püskürtülerek, 120°C da etüvde 10 dak. bekletilmiştir. Plak çıkartılıp soğutulduktan sonra, İTK-dansitometresinde okutulmuş ve CR3-A integratör ile kromatogramları alınmıştır.

Tayinde, öncelikle yapılan standart çalışmasında, 5 farklı derişimdeki standart essin çözeltilerinden İTK plağına uygulanmış, yürütüldükten sonra, İTK-dansitometresinde okutulup, kromatogramları alınmıştır.

Kuru total ekstredeki essin miktar tayini, verilen derişim aralığında, absorbans ve derişim arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldükten sonra, dansitometre üzerindeki EXT2 yönteminin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tayinlerde İTK plağına, 9×10^{-4} g/ml ve 13×10^{-3} g/ml derişimlerindeki standart essin çözeltilerinden birer ve 5.6×10^{-3} g/ml derişimindeki total ekstre çözeltisinden üç leke uygulanıp, plak analiz için yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmış ve İTK-dansitometresinde EXT2 yönteminin kullanılmasıyla değerlendirilmiştir.

Tayin sonuçları, her bir örnek için en az iki İTK plağının değerlendirilmesiyle ortalamaları alınarak verilmiştir.

İTK-dansitometresinde essin miktar tayininde uygulanan analiz şartları ve cihazlar çizelge 3.3' de verilmiştir.

3.4.2 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayinler, bu çalışmada geliştirilen, bir dış standart yöntemiyle yapılmıştır (Wagner, et al., 1970).

Çizelge 3.3 İnce tabaka kromatografisi analiz şartları

Reaktif Püskürtücü	Shimadzu Auto Spraying Unit SPU-1
Belirteç	%10 Sülfürik Asit
Plak	15x20 boyutunda 0.25 mm, silikajel 60GF ₂₅₄ -60G ₂₅₄
Yürütücü Sistem	60:32:12:8 Kloroform:Metanol:Asetik Asit:su
Standart Derişimi	6×10^{-4} , 9×10^{-4} , 1.3×10^{-3} , 1.6×10^{-3} , 1.8×10^{-3}
Kullanılan Cihaz	Shimadzu High-Speed TLC Scanner CS-920, CR3-A İntegratör
Parametreler	X=24, Y=10, L=30 Linearizer:3, Dalga Boyu:537

Tayinde, belirli derişimlerdeki örnekler kolona enjekte edilmiş ve kromatogramlar alınıp değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan YBSK analiz şartları çizelge 3.4' de verilmiştir.

3.4.3 Ultraviyole spektroskopisi (UV)

Elde edilen total ekstrenin 190-500 nm, ayrıca izole edilen essinin 190-350 nm dalga boyları arasında UV spektrumları alınmış ve standartlarla karşılaştırılmıştır. Bu işlem için, Shimadzu Recording Spectrophotometer UV-240 ve grafik printer PR-1 kullanılmıştır.

3.4.4 Infrared spektroskopisi (IR)

İzole edilen essinin ve standartın 400-4000 1/cm dalga boyları arasında IR spektrumları alınarak karşılaştırılmıştır. Bu işlemde, Shimadzu Infrared spectrophotometer IR-435 kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analiz şartları

Kullanılan Cihaz	Shimadzu LC 5A, UV Dedektör CR4-A İntegratör
Kolon	Zorbax ODS (C18) 5-6 µm particle size
Taşıyıcı Faz	%35 Asetonitril (500 ml de 20 ml 1 N H ₃ PO ₄)
Akım Hızı	1 ml/dak.
Standart Derişimi	1.6x10 ⁻³ g/ml
Enjeksiyon Miktarı	3, 5, 8, 10, 12 ml
Dalga Boyu	210 nm

4. DENEYSEL ÇALIŞMALARDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

Bu bölümde, laboratuvar, pilot ve yarı endüstriyel ölçekte yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar verilmiştir.

4.1 Laboratuvar Ölçekte Yapılan Ön Çalışmaların Sonuçları

Bu bölümde, atkestanesi ekstraksiyonunda uygun çözücü sisteminin seçimi, atkestanesindeki kuru total ekstre ve essin miktarı, essin izolasyon yöntemleri üzerinde laboratuvarda yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar verilmiştir.

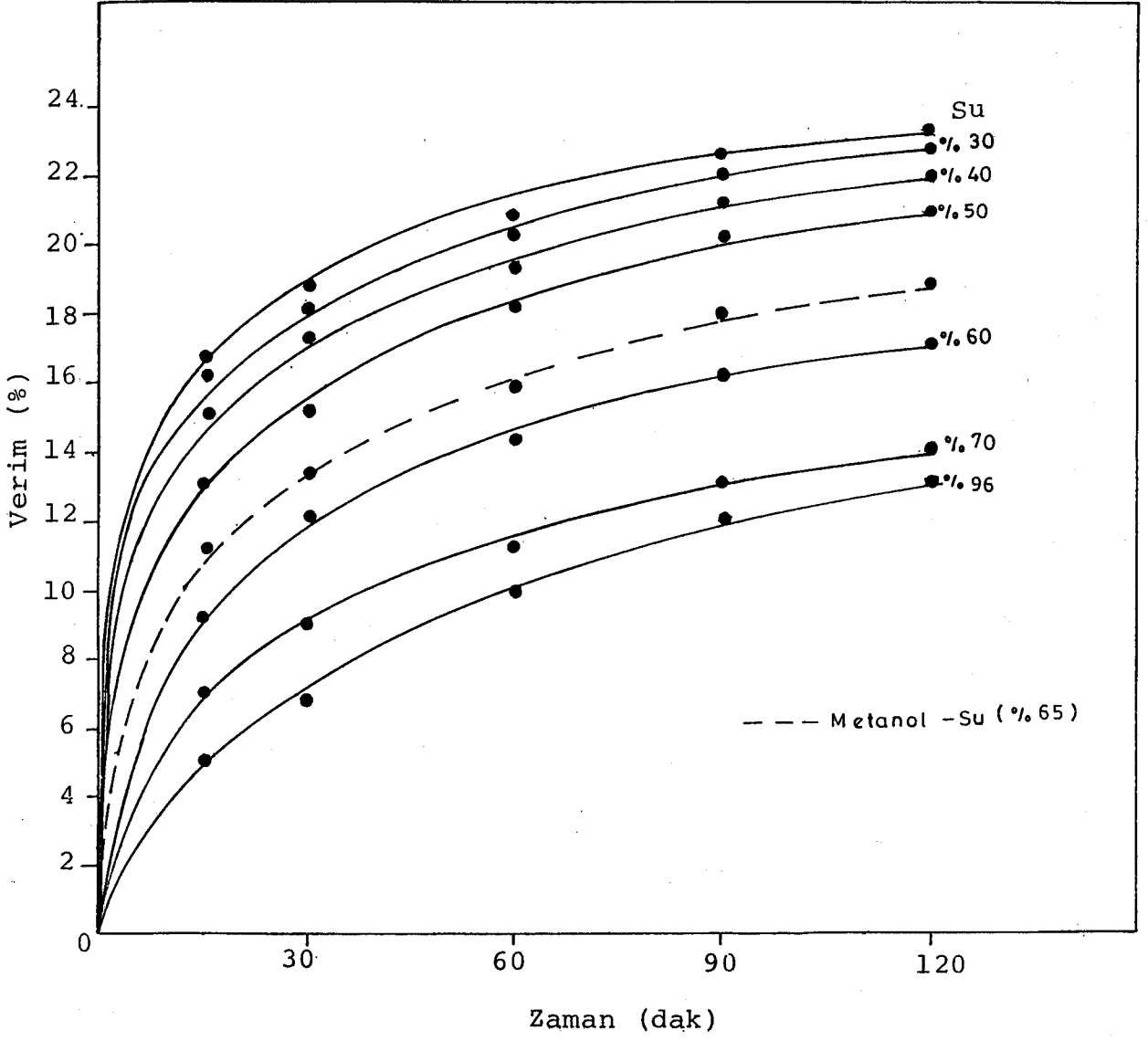
4.1.1 Çözücü sistemi seçimi

Bölüm 3.1.2' de verildiği şekilde, öğütülmüş atkestanesine, oda sıcaklığında karıştırmalı ekstraksiyon uygulanmıştır. Ekstraksiyonlarda, katı/çözücü oranı 1/10 olarak sabit tutulurken, farklı çözücüler denenmiştir. Yapılan ekstraksiyonların sonuçları kuru baz üzerinden, çözücü sistemi parametre olarak, zamana karşı toplam ekstraksiyon verimi olarak şekil 4.1' de verilmiştir.

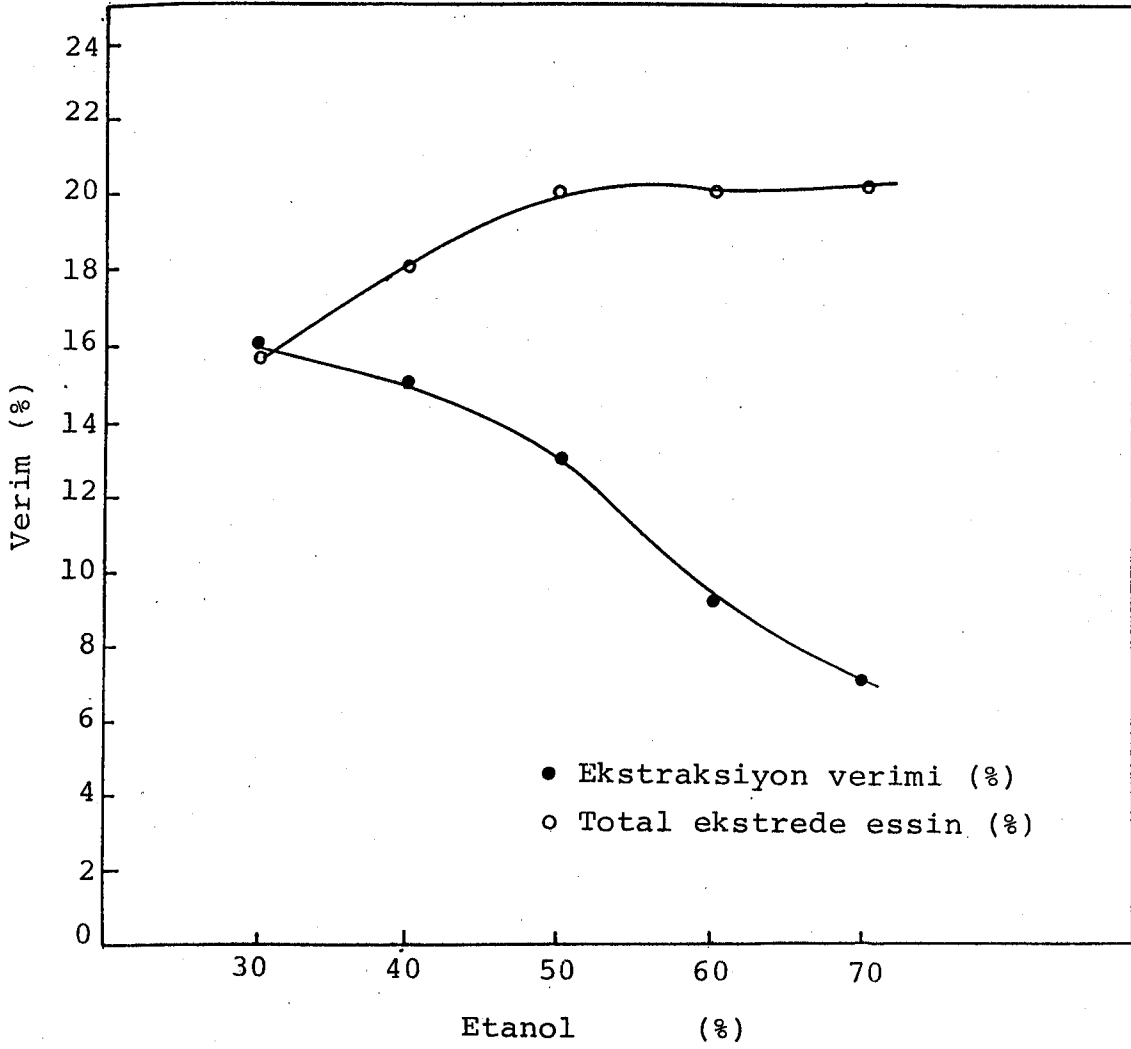
Ayrıca, ekstraksiyonlarda 15 dak. ve 90 dak. da elde edilen kuru total ekstreler üzerinde, essin yüzdesi tayinleri İTK-dansitometresi ve YBSK ile yapılmış ve sonuçları şekil 4.2 ve şekil 4.3' de gösterilmiştir.

Çalışmada, atkestanesi üzerinden, tüketilen essin miktarı şekil 4.4' de verilmiştir.

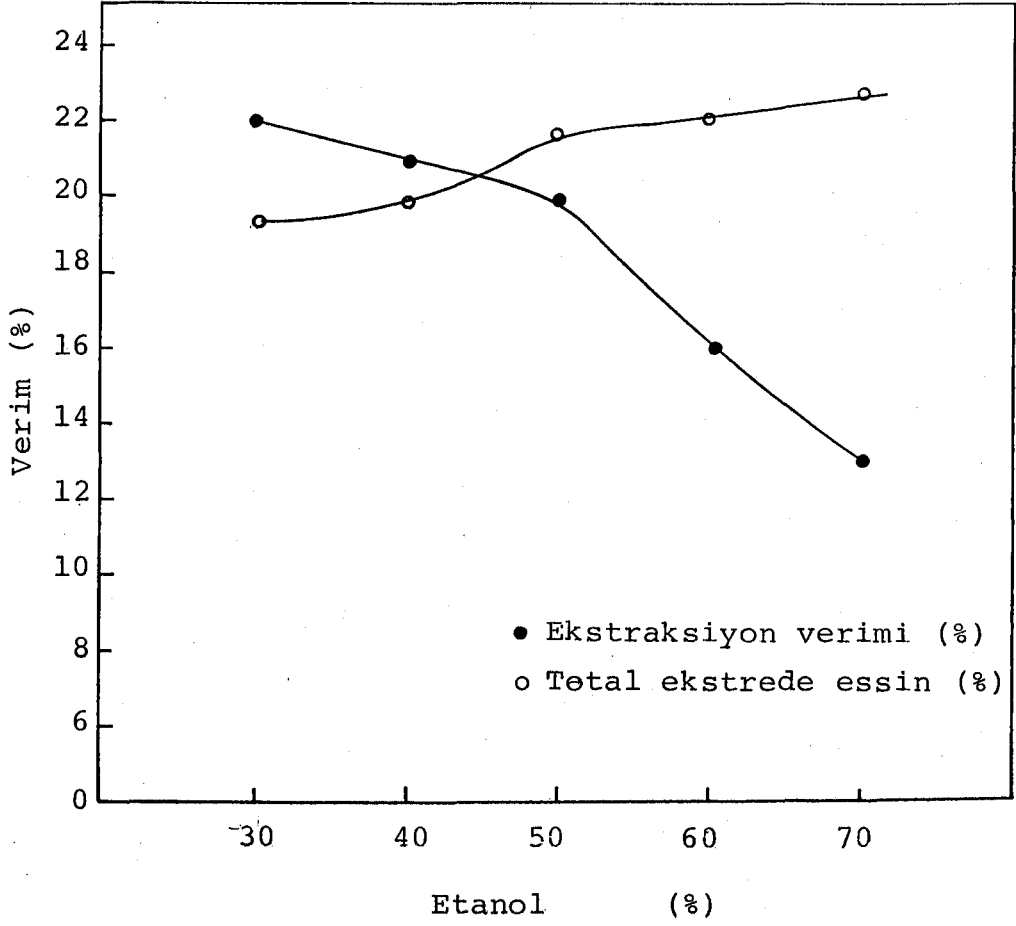
Şekil 4.1' den görüldüğü gibi, atkestanesi ekstraksiyonunda çözücüdeki etanol yüzdesinin artması, toplam ekstraksiyon veriminde bir düşmeye neden olmaktadır. Aynı durum şekil 4.2 ve 4.3'den de görülebilmektedir. Ekstraksiyonlarda etanol yüzdesi 30 dan 70 e yükseldikçe 15



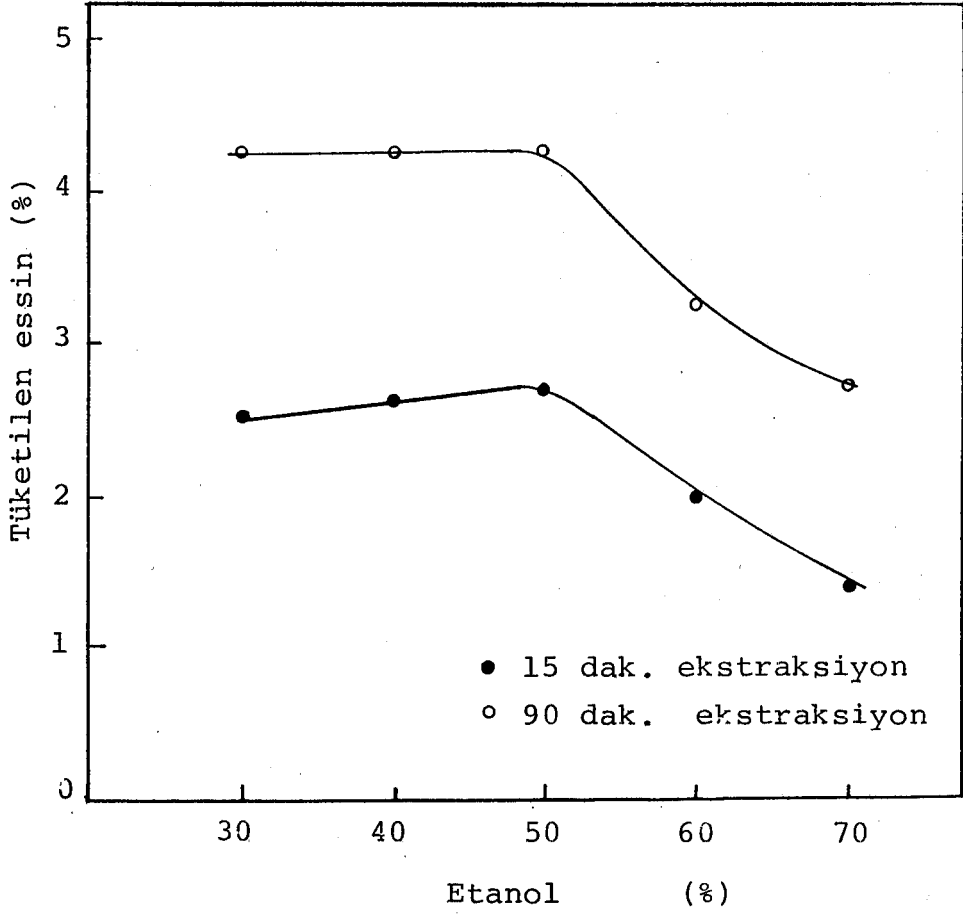
Şekil 4.1 Ekstraksiyon verimine çözücü sisteminin etkisi (Yüzdeler etanol yüzdesi olarak verilmiştir)



Şekil 4.2 Çözücü sisteminin 15 dak. ekstraksiyonda ekstraksiyon verimine ve kuru total ekstredeki essin yüzdesine etkisi



Şekil 4.3 Çözücü sisteminin 90 dak. ekstraksiyonda ekstraksiyon verimine ve kuru total ekstredeki essin yüzdesine etkisi



Şekil 4.4 Çözücü sisteminin atkestanesinde tüketilen essin miktarına etkisi

90 dak. ekstraksiyon verimleri yüzde 16 dan 8 e kadar düşme göstermekte, bunun yanında essin miktarları ise yüzde 16 dan 20 ye kadar yükselmektedir. Ayrıca, 90 dak. ekstraksiyon verimlerinde de aynı şekilde yüzde 21 den 12 ye bir düşme gözlenirken, essin miktarları yüzde 20 den 22 ye artmaktadır.

Bu durumda, yüksek ekstraksiyon verimi elde edilebilen, etanol yüzdesi düşük çözücülerle ekstraksiyon düşünülebilir ise de, bu çözücülerle ekstraksiyondan elde edilen kuru ekstredeki essin miktarlarının düşük olduğu görülmektedir.

Şekil 4.4'den görüldüğü gibi, yüzde 60 ve 70 etanol-su çözücü sistemleriyle ekstraksiyonlar sonucunda, atkestanesinde daha az essin çözeltiye alınabilmektedir. Oysa, yüzde 50, 40, 30, etanol-su çözücü sistemleriyle ekstraksiyonlar sonucunda, yaklaşık eşit miktarda essin tüketilmektedir. Yüzde 40, 30, etanol-su ile ekstraksiyonlarda toplam ekstraksiyon verimi fazla olmasına karşın, yüzde 50 etanol-su çözücü sistemine göre daha fazla essin tüketilememektedir.

Bu bulgular sonucunda, çalışmada yüzde 50 etanol-su uygun çözücü sistemi olarak seçilmiştir.

4.1.2 Atkestanesinde total ekstraksiyon verimi ve essin yüzdesinin belirlenmesi

Çözücü sisteminin belirlenmesinden sonra, öğütülmüş atkestanesi, %50 etanol-su çözücü sistemi ile, oda sıcaklığında, karıştırmalı olarak, 1/10 katı/çözücü oranıyla, 2 saat ekstre edilmiş, süzülüp, posa üzerine tekrar çözücü ilavesiyle ekstraksiyona devam edilmiş ve bu şekilde seri olarak, yürütülen ekstraksiyonların her birinden alınan örnekte İTK uygulanarak, kalitatif olarak

essinin tümüyle tüketilip tüketilmediği kontrol edilmiş ve tümü tüketilene kadar bu işleme devam edilmiştir. Çalışma sonuçları çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çalışma daha sonra, 55-60°C sıcaklıkta tekrarlanarak ekstraksiyonlara sıcaklığın etkisi gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.2' de gösterilmiştir.

Çalışmalar sonucunda elde edilen total kuru ekstrelerde, İTK-dansitometresi ve YBSK ile essin miktar tayinleri yapılmış ve bu yaklaşımla atkestanesindeki tüm essin miktarı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.1' den görüldüğü gibi, dördüncü ekstraksiyonda %1 çözünebilir madde alınmış, beşinci ekstraksiyon sonucunda ise dikkate değer miktarda maddenin çözünmediği gözlenmiş ve oda sıcaklığında atkestanesisinin yaklaşık %26 çözünebilir madde içerdiği bulunmuştur.

Sıcakta yapılan çalışmalarda ise üçüncü, ekstraksiyondan itibaren ekstrelerin kalitatif İTK uygulamasında essin görülmemiştir. Bu çalışmada da sıcakta atkestanesi ekstraksiyon veriminin yaklaşık %34 e yükseldiği gözlenmiştir. Ancak çizelge 4.3' den görüldüğü gibi, toplam ekstraksiyon veriminin yükselmesine karşın ekstredeki essin yüzdesinde düşme görülmüş ve sonuç olarak, her iki yaklaşımla da atkestanesindeki essin miktarı yaklaşık %5-5.5 olarak bulunmuştur.

4.1.3 Essin izolasyonu

Literatürde verilen yöntemler göz önüne alınarak laboratuvarında, etanol-su çözücü sistemiyle yapılan ekstraksiyonlardan ve ayrıca n-bütanol-su çözücü sistemiyle doğrudan essin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 Oda sıcaklığında seri ekstraksiyon sonuçları

Ekstraksiyon	Verim (%)	ITK da Essin
1	15	Görüldü
2	8	Görüldü
3	2	Görüldü
4	1	Görüldü
5	Eser	
Toplam	26	

Çizelge 4.2 Sıcakta seri ekstraksiyon sonuçları

Ekstraksiyon	Verim (%)	ITK da Essin
1	20	Görüldü
2	8	Görüldü
3	4	Görülmedi
4	2	Görülmedi
Toplam	34	

Çizelge 4.3 Atkestanesinde essin yüzdesi

Sıcaklık	Ekstraksiyon Verimi (%)	Toplam Ekstrede Essin (%)	Atkestanesinde Essin (%)
Oda sıcaklığında ekstraksiyon	26	21	5.46
Sıcakta ekstraksiyon	34	15	5.1

Etanol-su çözücü sistemiyle yapılan ekstraksiyondan essin izolasyonunda, atkestanesinde %2.5-3.0 ham essin ve daha ileri saflaştırma ile %2.0-2.5 essin elde edilebilmiştir. Elde edilen essinin saflığının YBSK ile %99 un üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Essinin, n-bütanol-su çözücü sistemiyle doğrudan izolasyonundan ise %97 nin üzerinde saflıkta essin elde edilmiştir. Sonuçlar, çizelge 4.4' de verilmiştir.

4.2 Pilot Ölçekte Ekstraksiyon Sonuçları

Pilot ölçekte, 10 litre kapasiteli perkolatörde, %50 etanol-su çözücü sistemiyle, parçacık boyutu, katı/çözücü oranı ve çözücünün yataktan geçme şeklinin, atkestanesi ekstraksiyonuna etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları bu bölümde verilmiştir.

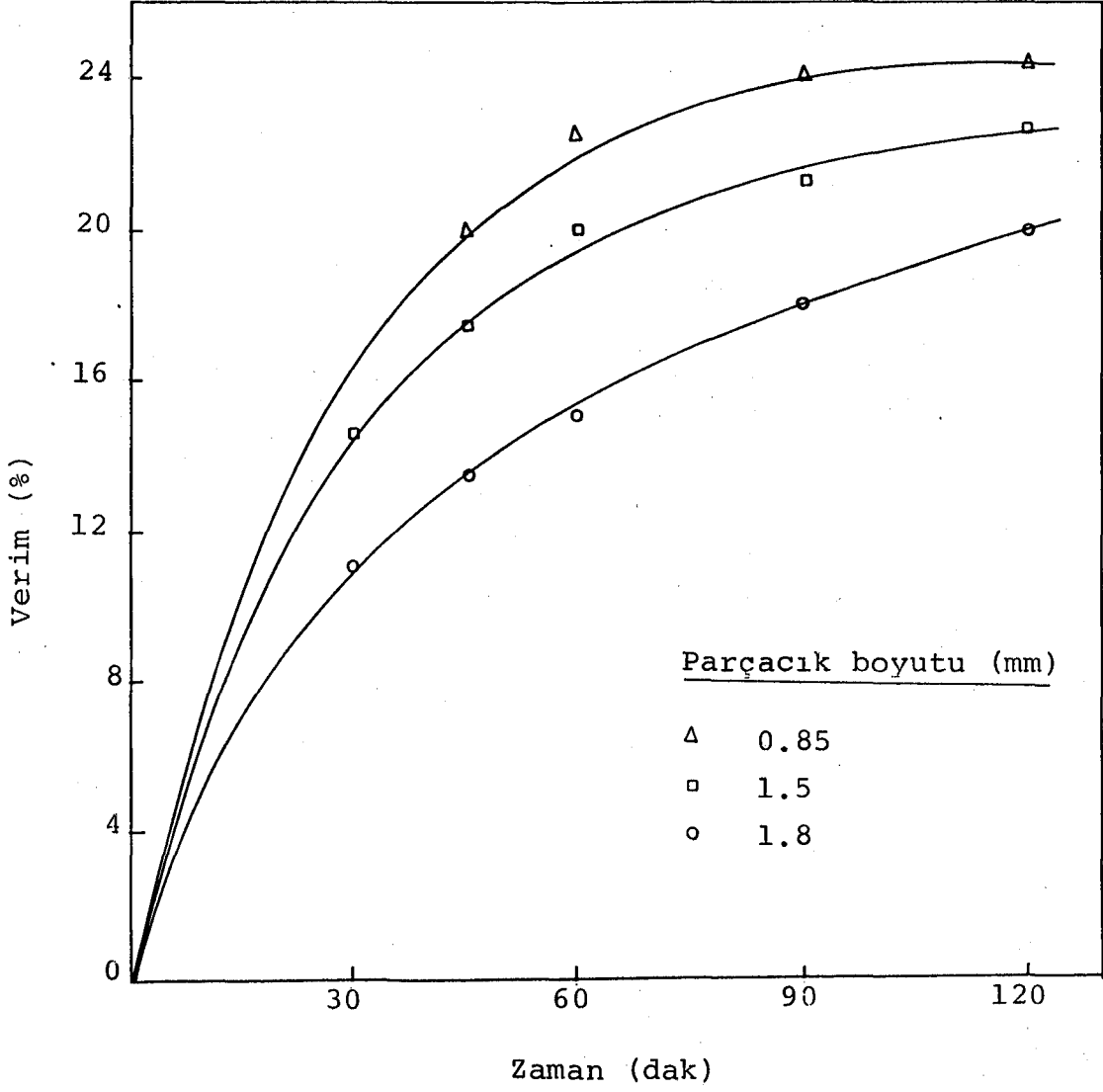
4.2.1 Parçacık boyutunun seçimi

Yapılan çalışmada, perkolatörde ekstraksiyon için parçacık boyutunun belirlenmesi amacıyla, bölüm 3.2.1' de verilen yöntemle, 0.215, 0.425, 0.85, 1.8, 1.5 mm parçacık boyutlarında örneklerle ekstraksiyonlar yapılmıştır. Yapılan çalışmada, 0.215, 0.425 mm boyutlu parçacıklar çözücünün yataktan geçişine izin vermemiş, ancak 0.85, 1.8, 1.5 mm parçacık boyutlu yataklar ise çözücü geçişine izin vermiştir.

Ekstraksiyonlara ait çalışma sonuçları, zamana karşı ekstraksiyon verimi olarak şekil 4.5' de verilmiştir. Görüldüğü gibi, 1.8 mm parçacık boyutlu yatakta ekstraksiyonda verim oldukça düşük kalmış, buna karşın 0.85 mm parçacık boyutlu yatakta oldukça yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiş, ancak bu yatakta da çözücünün yataktan geçiş hızı sınırlı kalmıştır. Böylece sonuçta, yataktan

Çizelge 4.4 Essinin n-bütanol-su çözücü sistemiyle ekstraksiyonu ile doğrudan izolasyonu
* Şekil 3.3 de işlem basamakları verilmiştir

Ekstre	Kuru drog üzerinden Verim (%)	Kalitatif İTK
I	8-10	Essin görülmedi
II	15-18	Essin görüldü
III	18-20	Essin görülmedi
IV	1-3	Essin görülmedi
V	8-10	Essin görüldü
VI	4-6	Essin görüldü
VII	3-4	Essin görüldü
VIII	2-2.5	Essin görüldü



Şekil 4.5 Pilot ölçekte perkolatörde, ekstraksiyon verimine parçacık boyutunun etkisi

çözücünün serbestçe geçişine izin verecek ve yüksek bir ekstraksiyon verimi sağlayacak parçacık boyutu olarak 1.5 mm seçilmiştir.

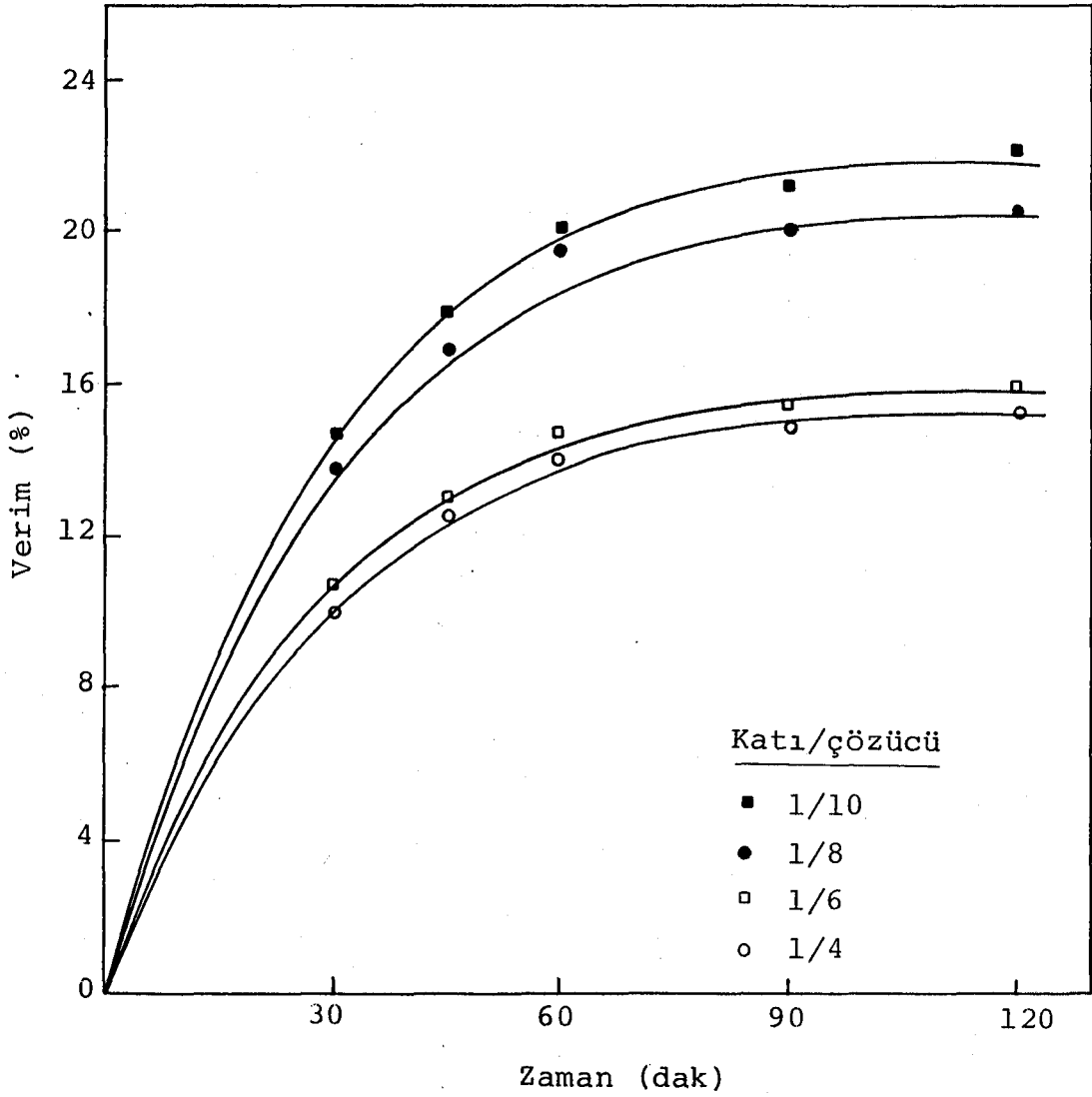
4.2.2 Katı/çözücü oranının belirlenmesi

Ekstraksiyonlarda kullanılacak katı/çözücü oranının belirlenmesi amacıyla, yapılan ilk grup çalışmada, katı/çözücü oranı, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10 olarak değiştirilmiş ve oda sıcaklığında, 1.5 mm parçacık boyutlu perkolatör yatağından belirli sürelerde geçirilerek, ekstraksiyon verimleri belirlenmiştir. Çalışma sonuçları şekil 4.6' da verilmiştir. Görüldüğü gibi, 1/8 ve 1/10 katı/çözücü oranının kullanılmasıyla, ekstraksiyon verimleri arasında büyük bir farklılık görülmemektedir.

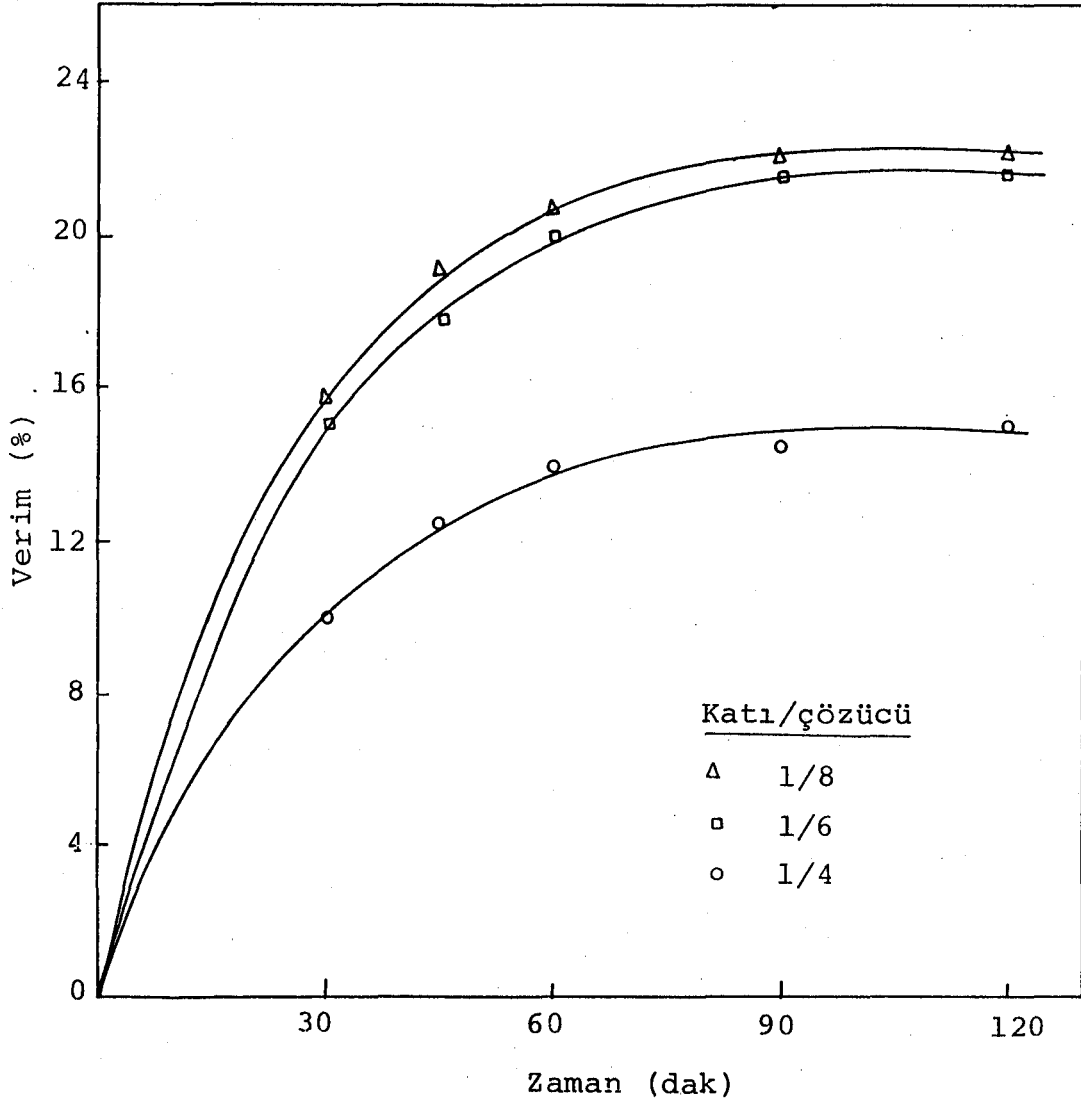
Bu durumda, ikinci grup çalışmada katı/çözücü oranı, 1/4, 1/6, 1/8 olarak değiştirilmiş ve ekstraksiyonlar oda sıcaklığında, sirkülasyonlu olarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon verimlerinin zamana karşı değişimi şekil 4.7' de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, sirkülasyonlu çalışmaların tümünde, özellikle 1/6 katı/çözücü oranında belirgin bir artış gözlenmiştir.

Sirkülasyonlu çalışmaların sıcakta (55-60°C) tekrarlanmasından elde edilen sonuçlar şekil 4.8' de verilmiştir. Bu ekstraksiyonlarda, daha öncede belirtildiği gibi ekstraksiyon veriminde bir artış görülmüş ve sıcakta çözünen, istenmeyen maddeler ekstreye geçmiştir.

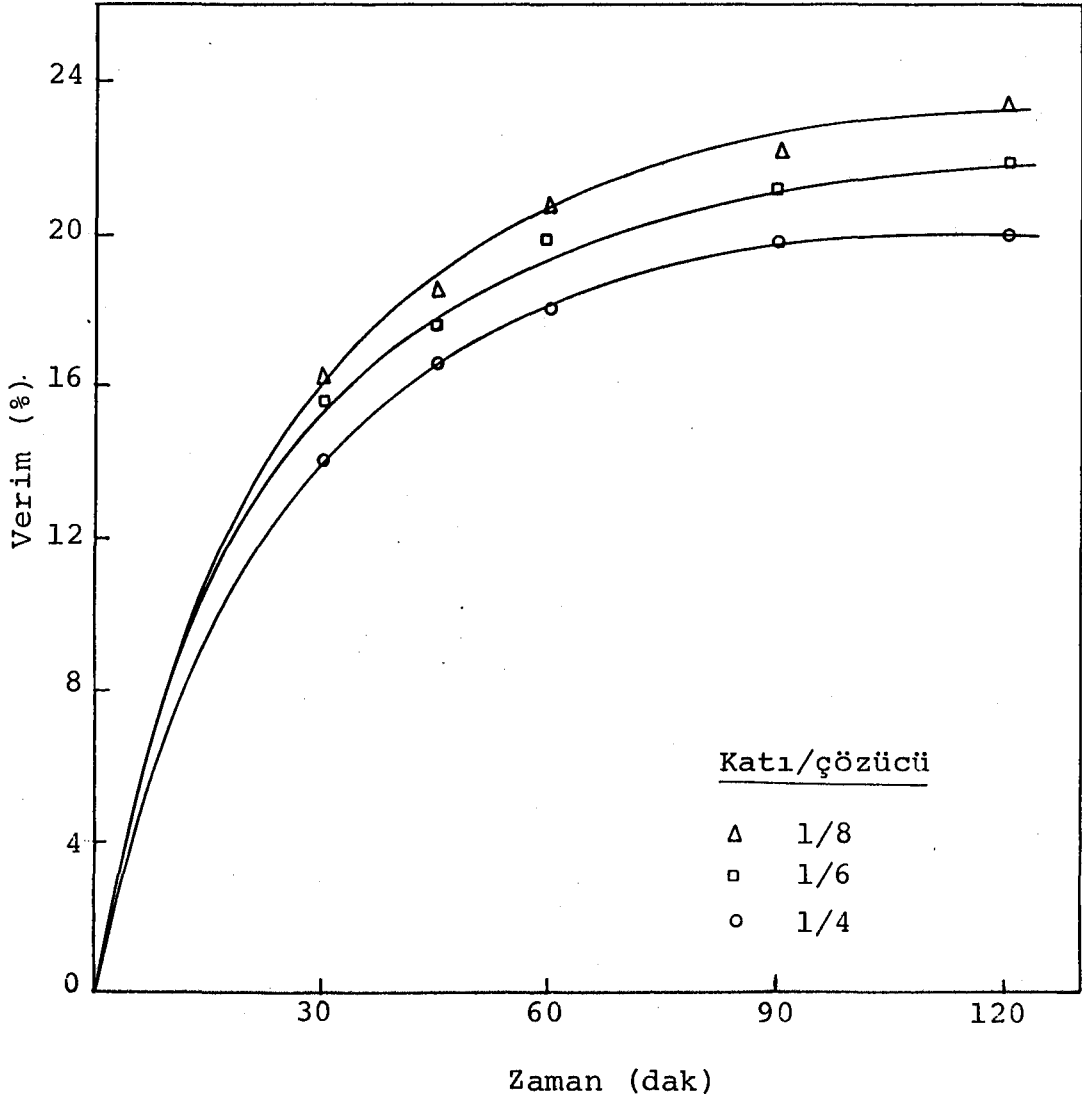
Böylece, ekstraksiyonlarda kullanılacak katı/çözücü oranı, 1/6 olarak belirlenmiş ve ekstraksiyonların oda sıcaklığında yapılmasının uygun olacağı görülmüştür.



Şekil 4.6 Pilot ölçekte perkolatörde oda sıcaklığında çözücünün yataktan bir kez geçisiyle yapılan ekstraksiyonda, katı/çözücü oranının ekstraksiyon verimine etkisi



Şekil 4.7 Pilot ölçekte perkolatörde, oda sıcaklığında sirkülasyonlu ekstraksiyonda katı/çözücü oranının ekstraksiyon verimine etkisi



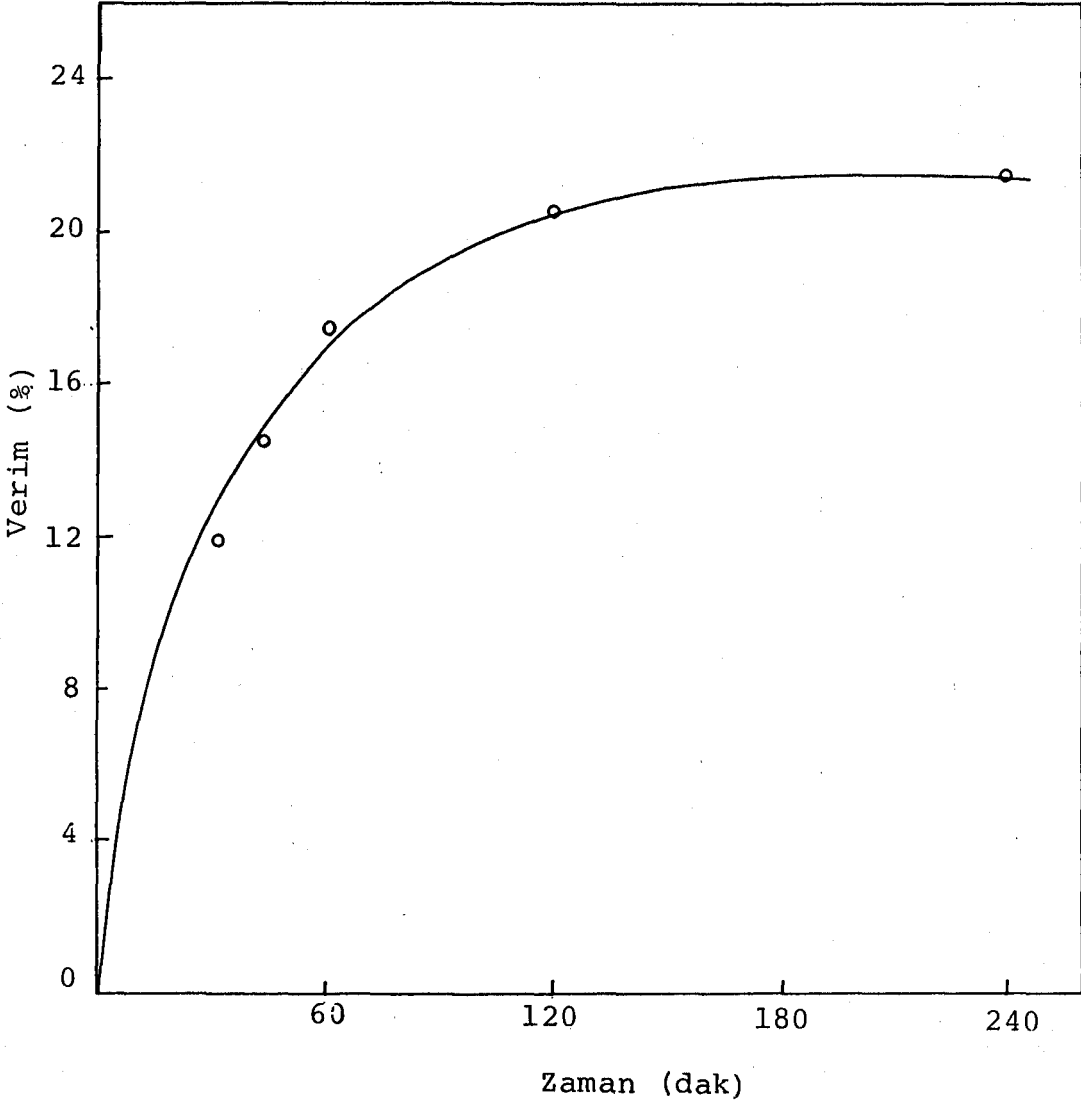
Şekil 4.8 Pilot ölçekte perkolatörde, sıcakta sirkülasyonlu ekstraksiyonda, katı/çözücü oranının ekstraksiyon verimine etkisi

4.2.3 Essin izolasyonu

Pilot ölçekte, 10 litre kapasiteli perkolatörde belirlenen ekstraksiyon şartlarında, bölüm 3.2.3' de verildiği şekilde yapılan izolasyon çalışmasında 4 kg 1.5 mm parçacık boyutundaki atkestanesi, 24 litre %50 etanol-su çözücü sistemiyle, oda sıcaklığında ekstre edilmiş ve % 20-21 ekstraksiyon veriminde, yaklaşık 20 litre ekstre elde edilmiştir. Kuru total ekstrede essin içeriği %20-21 olarak bulunmuştur. Sonuçta %95 in üzerinde saflıkta %2.6 verimle, 100 g ham essin elde edilmiştir. Ham essin, sıcak alkolde çözülmüş ve sıcak su ilavesiyle çöktürülerek yaklaşık %2.3 verimle, 90 g %99 un üzerinde saflıkta essin elde edilmiştir.

4.3 Yarı Endüstriyel Ekstraktörde Çalışma Sonuçları

Yarı endüstriyel ölçekte, 500 litre kapasiteli ekstraktörde, 60 kg 1.5 mm tanecik boyutlu atkestanesi, 360 litre %50 etanol-su çözücü sistemiyle oda sıcaklığında, sirkülasyonlu olarak ekstre edilmiş ve ekstraksiyon süresince verim gözlenmiştir (şekil 4.9). Sonuçta, 300 litre %20-21 verimde ekstre elde edilmiştir. Kuru total ekstrede essin yüzdesi, %20-21 olarak tayin edilmiştir. Perkolatör yatağında tutunarak kalan çözücü ise, çıplak buhar gönderilerek 60 litre %50 etanol-su olarak kazanılmıştır. Bölüm 3.3' de belirtildiği şekilde, çözelti katyon değiştiricili kolondan geçirilip, daha sonra yaklaşık 120 litre kalıncaya kadar deriştirilmiş ve essin çökmeye bırakılmıştır. Deriştirme esnasında geri kazanılan 180 litre çözücü, %75 etanol-su olarak elde edilmiştir. Çöken essin, vakum altında süzölmüş ve süzöntünün kuruluğa kadar çekilmesiyle, yaklaşık 11 kg kuru madde, %8-10 essin içeriğinde bulunmuştur. Elde edilen ham essin ise, yaklaşık %2.4 verimle, %95 in üzerinde saflıkta, 1390 g olarak



Şekil 4.9 Yarı endüstriyel ölçekte ekstraksiyon veriminin zamanla değişimi

bulunmuştur. Bu essinden belli miktarlarda alınarak, ileri saflaştırma ile %2.2 verimle %99 un üzerinde saflıkta beyaz renkli essin elde edilmiştir.

4.4 Elde Edilen Ürünlerin İncelenmesi Sonuçları

Deneysel çalışmalarda elde edilen ürünlerin incelenmesi sırasında uygulanan spektroskopik ve kromatografik yöntemlerden elde edilen bulgular, bu bölümde verilmiştir.

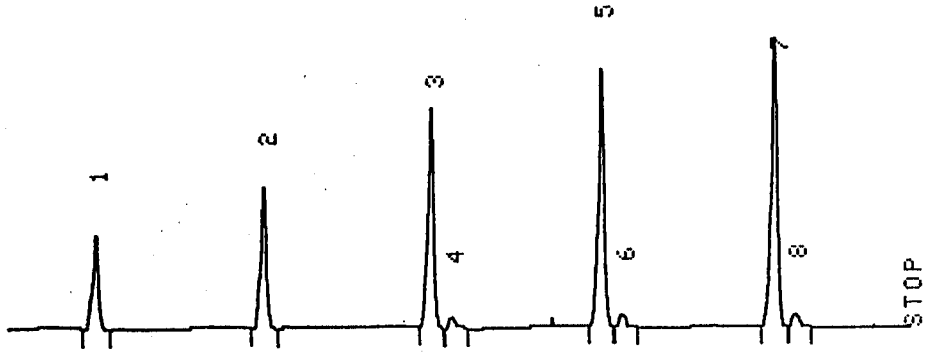
4.4.1 İnce tabaka kromatografisi-dansitometresi

Bölüm 3.4.1'de belirtildiği gibi yapılan standart essin çalışmasında, belirtilen derişim aralığında, CR3-A integratörden alınan (şekil 4.10) kromatogramların değerlendirilmesiyle, pik alanı (şekil 4.11) ve yüksekliği ile derişim arasında doğrusal ilişkiler olduğu bulunmuştur. Ayrıca, aynı doğrusal ilişki dansitometreden alınan alan değerinde de görülmüştür.

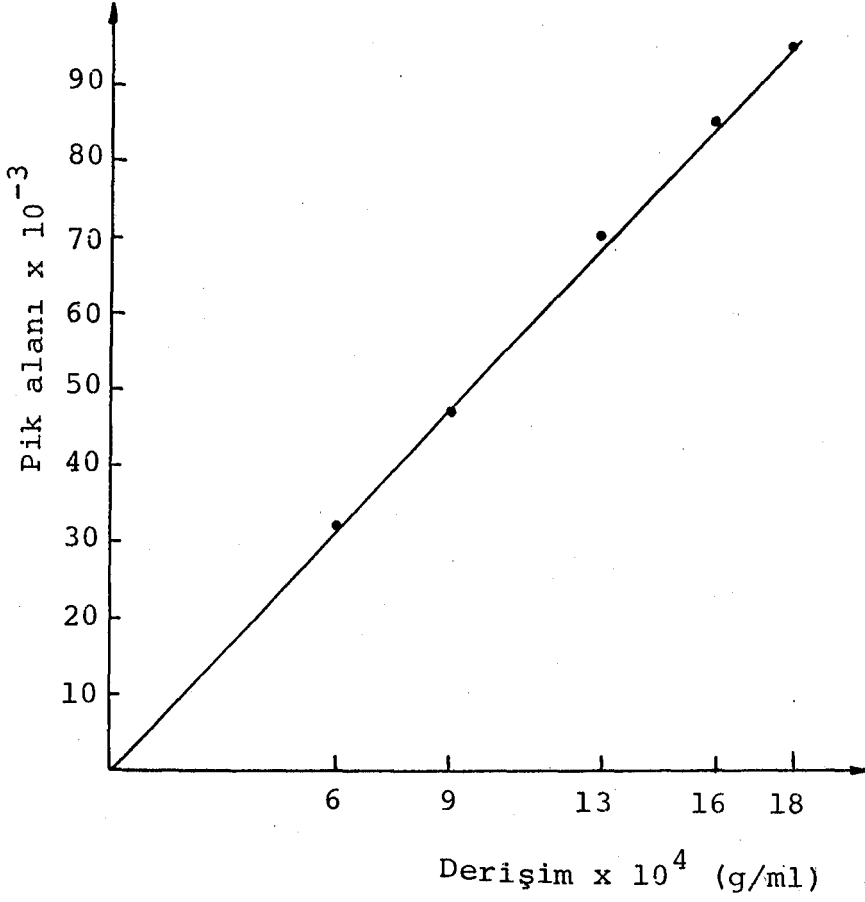
Çalışmalarda, verilen derişim aralığında absorbans ile derişim arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldükten sonra, tayinler dansitometre üzerindeki EXT2 yönteminin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Her bir total ekstre örneğindeki essin miktarının bulunmasında, şekil 4.12' de gösterildiği biçimde en az iki İTK plağı hazırlanmış, sonuçlar bunların ortalaması alınarak 0.9 standart hata ile verilmiştir.

Çalışmalarda elde edilen total ekstre ve izole edilen essinin İTK da kalitatif olarak standartla karşılaştırılması şekil 4.13' de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, elde edilen ürünler, standartlarla büyük bir benzerlik göstermektedir.



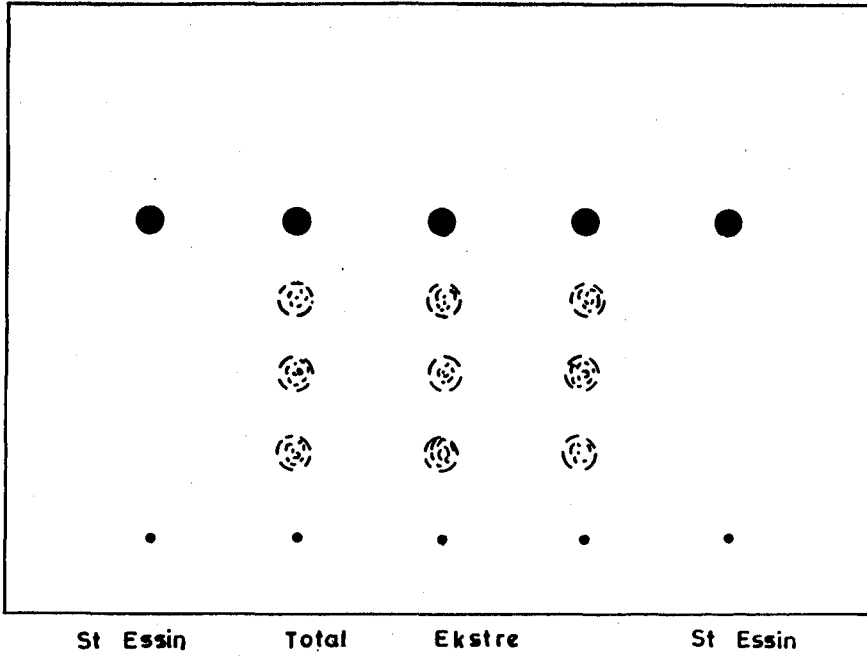
Şekil 4.10 İTK-dansitometresinde farklı derişimlerdeki standart essin kromatogramları



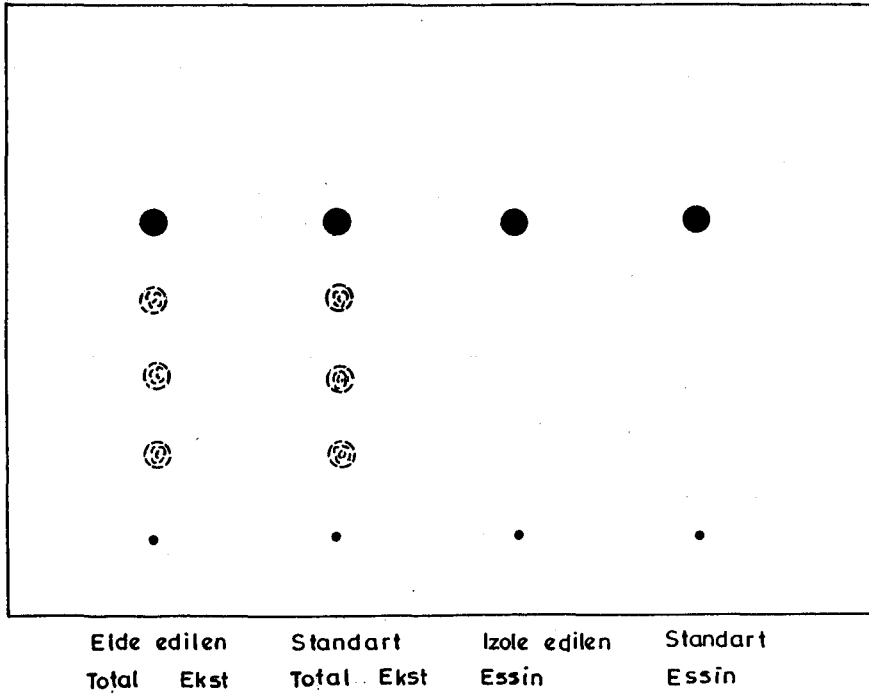
Şekil 4.11 ITK-dansitometresinde pik alanı-derişim arasındaki doğrusal ilişki

$$y = 52910884 x - 841$$

$$(c : 0.9998)$$



Şekil 4.12 İTK-dansitometresi tayininde hazırlanan plak



Şekil 4.13 Çalışmalarda elde edilen ürünlerin İTK da karşılaştırılması

4.4.2 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ITK-dansitometresinde EXT2 yönteminin kullanılmasıyla gerçekleştirilen, kuru toplam ekstredeki essin miktar tayinleri sonuçlarının kontrol edilmesinde ve izole edilen essinlerin saflıklarının belirlenmesinde YBSK kullanılmıştır. Yöntemde öncelikle yapılan standart essin çalışmasında beş farklı derişimdeki essin çözeltisi kullanılmış şekil 4.14' de gösterilen ve CR4-A integratörden elde edilen, kromatogramlardaki pik alanları toplamının derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle verilen derişim aralığında pik alanları toplamı ile derişim arasında şekil 4.15' de gösterilen doğrusal bir ilişki olduğu bulunmuştur.

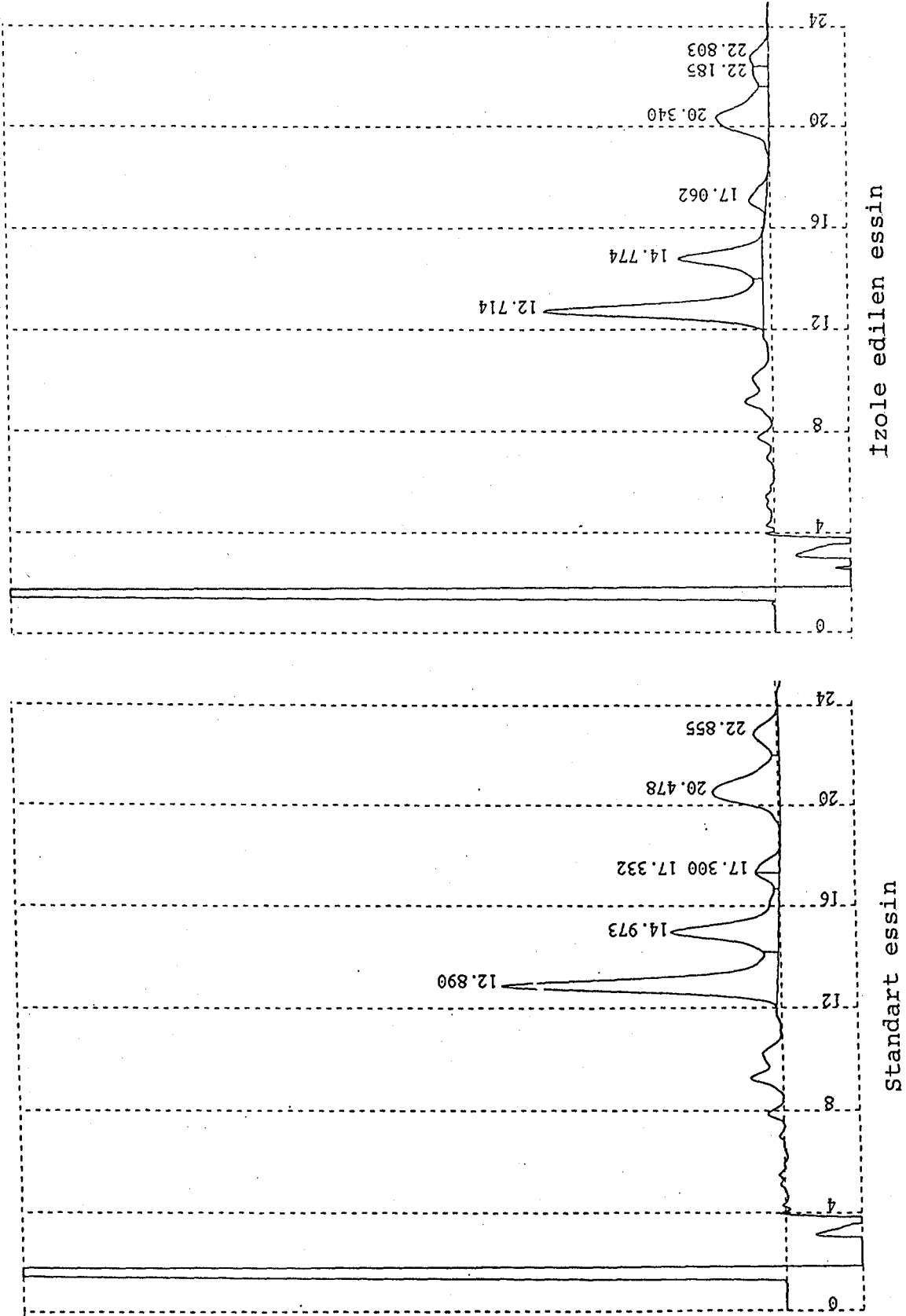
Essin miktar tayinlerinde, Örnek YBSK ile incelenmiş ve elde edilen pik alanları toplamından derişim hesaplanmıştır. Bu işlem her bir tayin için en az iki kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalamaları alınarak verilmiştir. Çalışmalarda, ITK-dansitometresi tayin sonuçları ile YBSK tayin sonuçları arasında büyük bir uyum olduğu görülmüştür.

4.4.3 Ultraviyole spektroskopisi (UV)

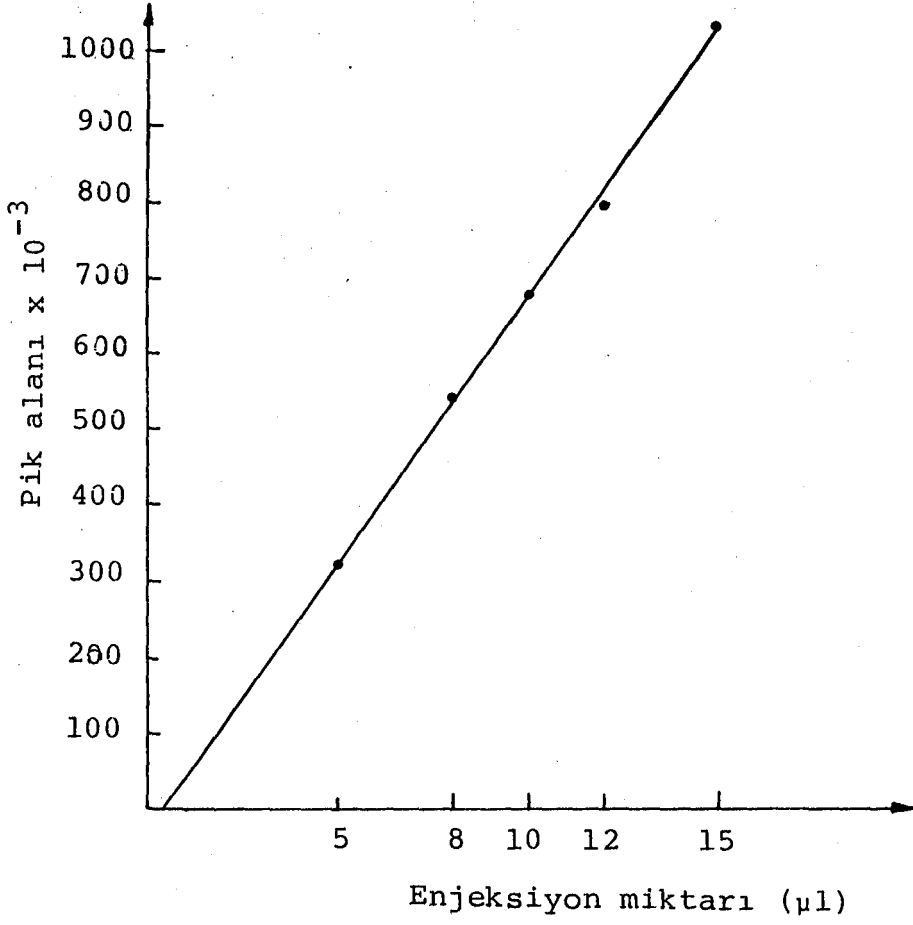
Çalışmalarda elde edilen total ekstre ve izole edilen essinin UV spektrumları alınıp standartlarla karşılaştırılmış, şekil 4.16 ve 4.17' de görüldüğü gibi aralarında büyük bir uyum görülmüştür.

4.4.4 Infrared spektroskopisi (IR)

Çalışmada izole edilen essinin IR spektrumu şekil 4.18' den görüldüğü gibi, standart essinin IR spektrumuyla karşılaştırılmış ve aralarında yine büyük bir uyum görülmüştür.



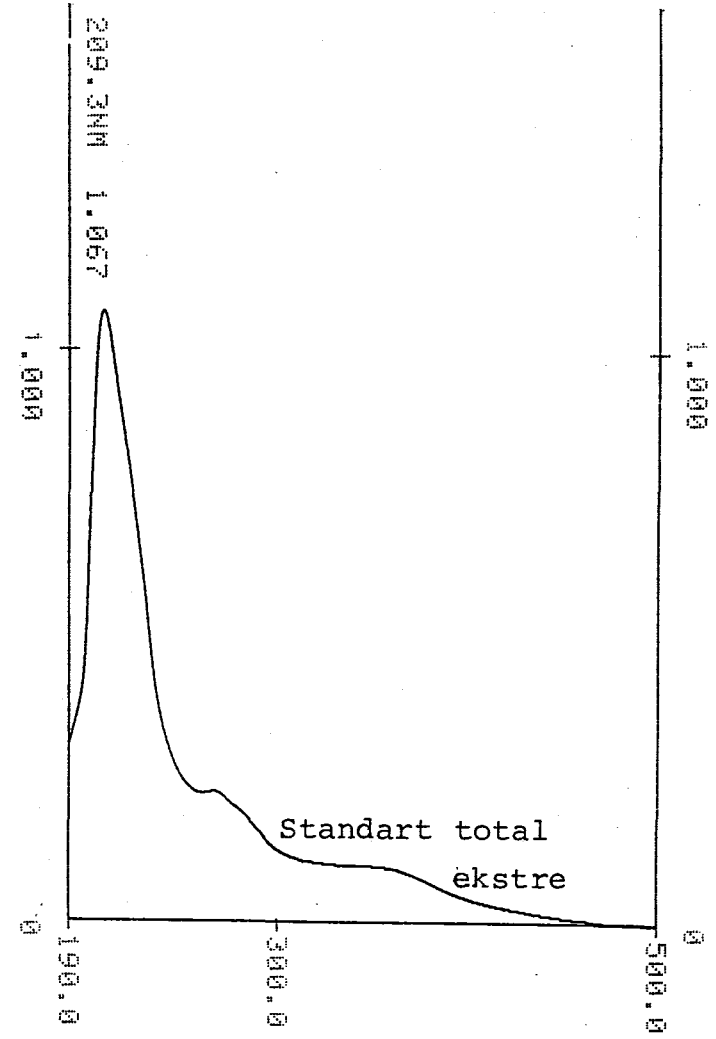
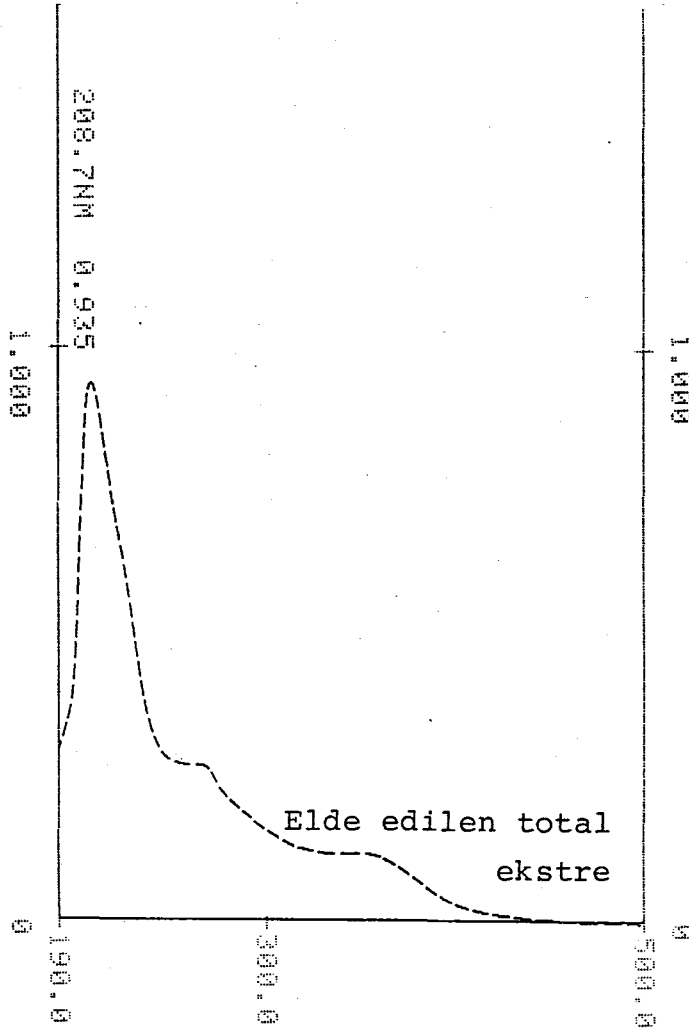
Şekil 4.14 Standart essin ve izole edilen essinin YBSK kromatogramları



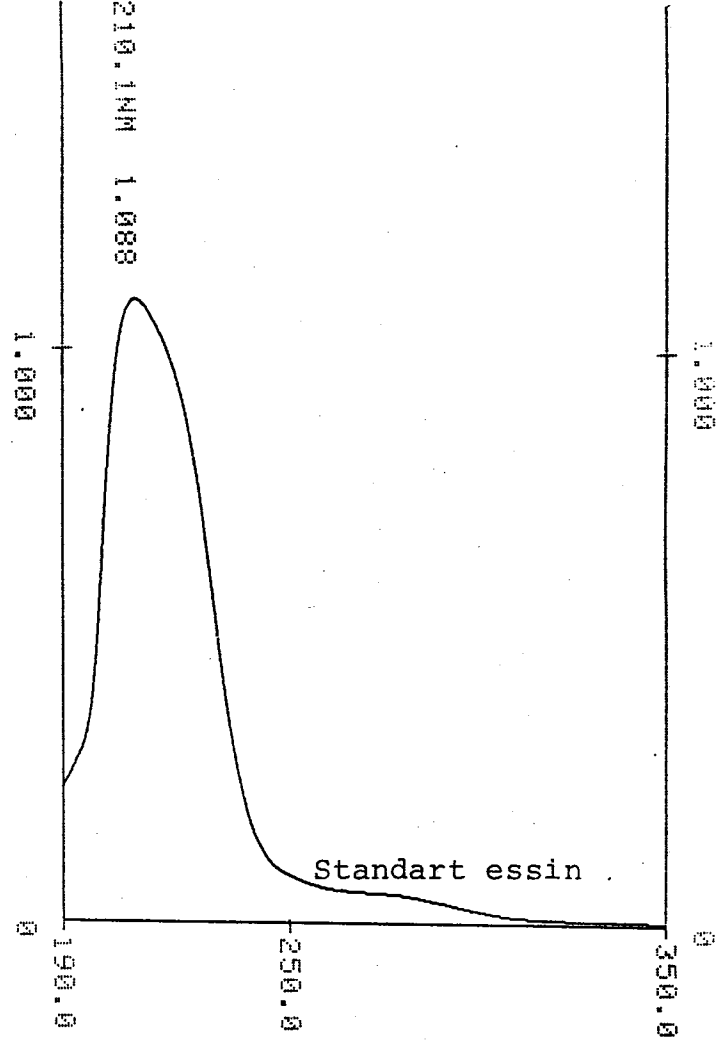
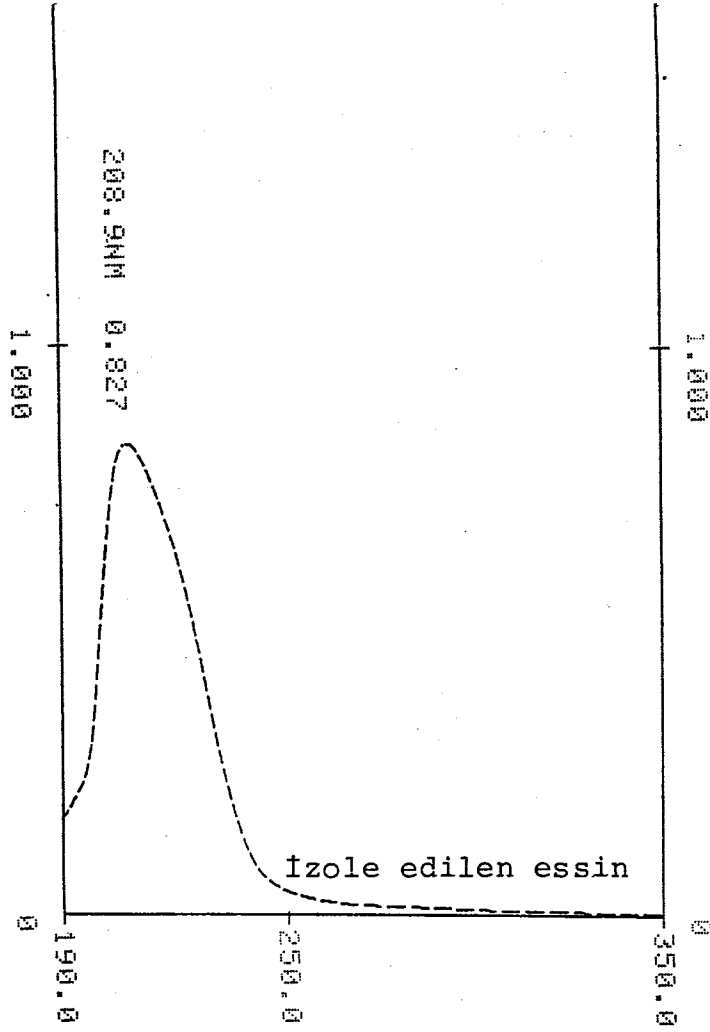
Şekil 4.15 YBSK de pik alanları toplamı ile derişim arasındaki doğrusal ilişki

$$y = 69228.2 x - 22887$$

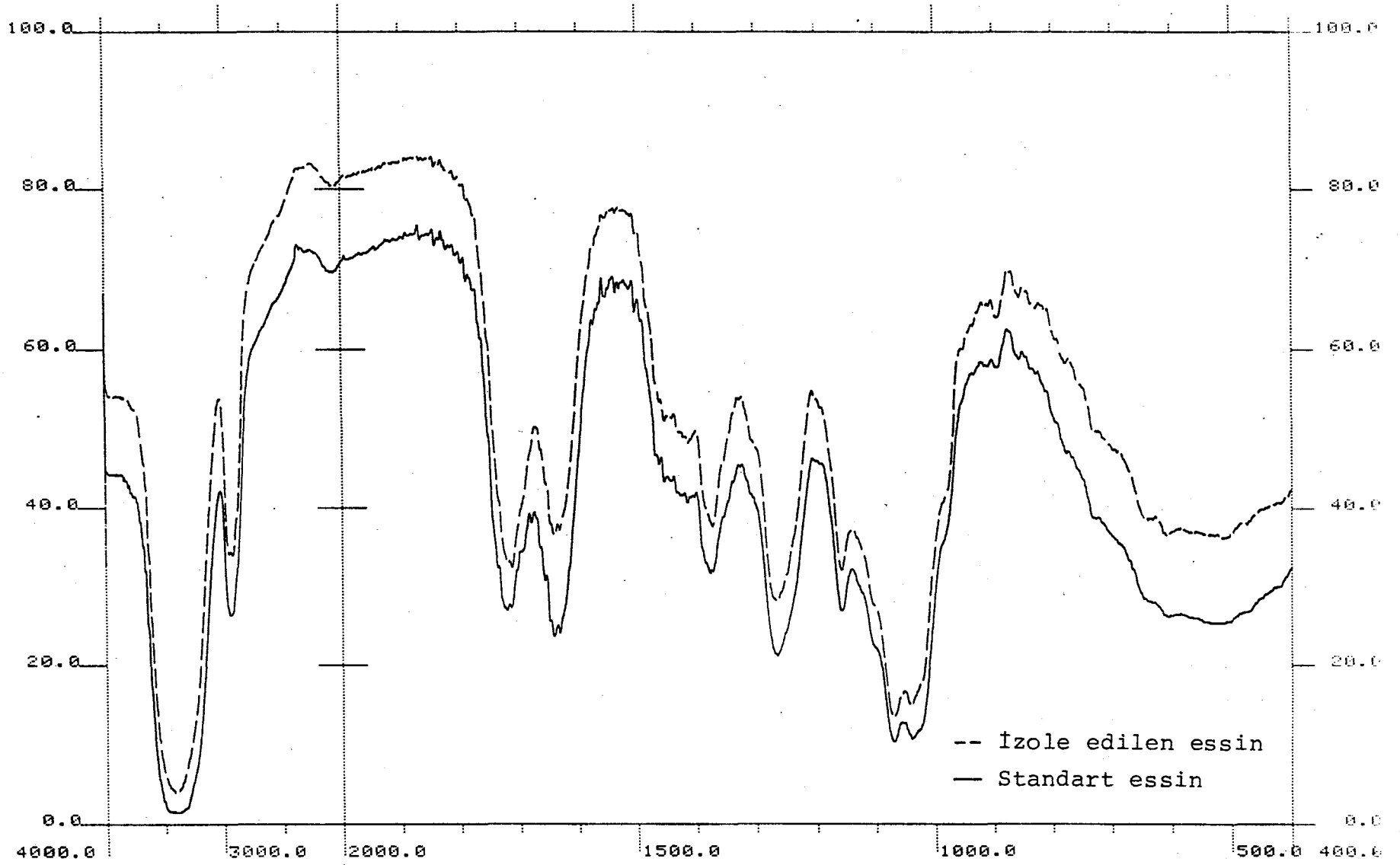
(c : 0.9998)



Şekil 4.16 Elde edilen total ekstre ve standart total ekstre nin UV spektrumları



Şekil 4.17 Standart essin ve izole edilen essinin UV spektrumları



Şekil 4.18 Standart essin ve izole edilen essinin IR spektrumları

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bir tıbbi bitki olan atkestanesinde elde edilen total ekstre ve etken madde essin, farmakolojik etkileri dolayısıyla, kozmetikte ve tıpta geniş ölçüde kullanım alanı bulmaktadır.

Atkestanesi ekstresi ve etken madde essin üzerine yurt dışında bir çok araştırma yapılmasına karşın, ülkemizde bu konuda yeterli araştırmanın yapılmadığı ve bu çalışmanın başlatılması gereği giriş bölümünde vurgulanmıştır.

Bu amaçla yapılan çalışmada, atkestanesinin total ekstre ve essin miktarları belirlenmiş, atkestanesinde total ekstre ve etken madde essin yarı endüstriyel ölçekte üretilmiştir. Ayrıca, çalışmanın her aşamasında elde edilen total ekstrelerin essin yüzdelerinin ve izole edilen essinlerin saflık derecelerinin belirlenebilmesi amacıyla, tarafımızdan geliştirilen ITK-dansitometresi ve YBSK yöntemleri uygulanmıştır.

Yapılan çalışmada, Eskişehir'den toplanan atkestaneleri kurutulup, %4-5 nem içeriğine geldikten sonra, laboratuvar ölçekte ön çalışmalara geçilmiştir. Laboratuvarda yapılan çalışmalarda, öncelikle atkestanesi ekstraksiyonunda kullanılacak çözücü sistemi araştırılmış ve %50 etanol-su sisteminin uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Atkestanesindeki total ekstre ve essin miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla oda sıcaklığında ve sıcakta yapılan ekstraksiyonlarda, bu çözücü sisteminin kullanılmasıyla, çözünebilir maddenin tamamı tüketilinceye kadar ekstraksiyonlara devam edilmiştir. Sonuçta, oda sıcaklığında yapılan ekstraksiyonla %21 essin içeren %26 kuru total ekstre ve sıcakta (55-60 °C) yapılan ekstraksiyonlarda ise %16 essin içeren %34 kuru total ekstre elde edilmiştir. Bu şekilde, her iki yaklaşımla da atkestanesindeki essin miktarı yaklaşık olarak %5-5.5

arasında bulunmuştur. Ancak, görüldüğü gibi, sıcakta yapılan ekstraksiyonda, total ekstre miktarı artmasına karşın, essin yüzdesinde bir düşme görülmekte, bir diğer deyişle sıcakta çözünebilen yabancı maddeler de ekstreya geçmektedir.

Essin izolasyon yöntemi üzerine laboratuvarında yapılan çalışmalarda, n-bütanol-su çözücü sistemi ile doğrudan essin izolasyonu ve etanol-su çözücü sistemi ile essin izolasyonu yöntemleri araştırılmış ve sonuçta, essinin n-bütanol-su çözücü sistemiyle doğrudan izolasyonunda %97 nin üzerinde saflıkta %2-2.2 verimle essin elde edilirken, etanol-su çözücü sistemiyle ekstraksiyonunda %2.5-3 verimle %99 un üzerinde saflıkta essin izole edilmiştir.

Laboratuvarında yapılan ön çalışmalardan elde edilen bulgular göz önüne alınarak, pilot ölçekte, 10 litre kapasiteli perkolatörde, parçacık boyutu, katı/çözücü oranı, çözücünün perkolatörden geçiş şekli, sıcaklık ve süre araştırılmıştır.

Perkolatörde yüksek bir ekstraksiyon verimi elde edilebilen ve çözücünün perkolatör yatağından serbestçe geçişine izin veren ortalama bir parçacık boyutu olarak 1.5 mm seçilmiştir. Parçacık boyutu 0.85 mm olan perkolatör yatağında daha yüksek bir ekstraksiyon verimi elde edilmesine karşın, yatak, çözücünün geçişine sınırlı olarak izin vermiş, bunun yanında, 1.8 mm parçacık boyutlu perkolatör yatağında ise ekstraksiyon verimi düşük olmuştur.

Ekstraksiyonda kullanılacak katı/çözücü oranının ve çözücünün perkolatörden geçiş şeklinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda, perkolasyonun, 1/6, katı/çözücü oranıyla sirkülasyonlu olarak yapılabileceği görülmüştür.

Sıcakta tekrar edilen çalışmalarda ise, ekstraksiyon verimi bir miktar artmış ancak, essin yüzdesinin düşük olması ve ekstredeki yabancı maddelerin izolasyon aşamasında sorunlar çıkartması nedeniyle, ekstraksiyonların oda sıcaklığında yapılmasının uygun olacağı belirlenmiştir.

Pilot ölçekte, 10 litre kapasiteli perkolatörde yapılan essin izolasyon çalışmasında %2.6 verimle %95 in üzerinde saflıkta ham essin ve daha ileri saflaştırmayla %2.3 verimle %99 un üzerinde saflıkta essin elde edilmiştir.

Laboratuvarda ve pilot ölçekte yapılan çalışmalardan sonra, atkeşanesinden total ekstre eldesi ve etken madde essin izolasyonu, yarı endüstriyel ölçekte, 500 litre kapasiteli, çok amaçlı ekstraksiyon ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, çalışmada kullanılan alkolün yaklaşık %94 ü geri kazanılmış ve %2.4 verimle %95 in üzerinde saflıkta ham essin ve daha ileri saflaştırmayla, %2.2 verimle %99 un üzerinde saflıkta essin elde edilmiştir.

Elde edilen total ekstrenin ve izole edilen essinin, standartlarla İTK da kalitatif olarak karşılaştırılmaları ve ayrıca UV spektrumlarının alınması sonucunda, aralarında tam bir uyum olduğu görülmüştür.

İzole edilen essinin ve standart essinin IR spektrumları alınmış ve yine aralarında tam bir benzerlik olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmada, etanol, ülkemizde, günümüz için kolay temin edilebilmesi nedeniyle, alkol olarak kullanılmıştır. Ancak, ileride yapılacak çalışmalarda n-bütanol-su çözücü sisteminin kullanılmasıyla essinin doğrudan izolasyonu, pilot ve yarı endüstriyel ölçekte denenebilir.

Bu çalışmada, atkestaneleri kabukları soyulmadan kullanılmıştır. Kabuk soyulması için kolay ve etkin bir yöntemin kullanılması halinde, kabukların soyularak ekstraksiyonun yapılması daha uygun olabilir.

Yapılan çalışmada, ham essin, çöktürülerek ayrıldıktan sonra kalan sznt, çalışmada da belirtildiği gibi essin içermektedir. Essini alınmış ekstrenin kullanılabileceği kozmetik alanlar yanında, szntden daha fazla essin izolasyonu araştırılabilir.

EK AÇIKLAMALAR A

ESSİN İÇİN FORMÜLASYON ÖRNEKLERİ

JEL:

Essin	1.0 g
Karbomer (Carbopol 934)	1.8 g
Sodyum hidroksit	0.6 g
Propilen glikol	10.0 g
Alkol	10.0 g
Koruyucular ve parfüm	y.m
Saf su ile tamamlama	100 g

KREM:

Essin	1.0 g
Polisorbat - 80	5.0 g
Sodyum lauril sülfat	2.0 g
Spermaceti	5.0 g
Hidrojene lanolin (Lanocerina)	12.5 g
Algin	0.5 g
Yağ asitleri karışımı (Eucerina)	7.0 g
Stearik asit	8.0 g
Koruyucular ve parfüm	y.m
Saf su ile tamamlama	100 g

TABLET:

Essin	20.0 g
Mısır nişastası	53.0 g
Silikajel tozu	5.0 g
Laktoz	20.0 g
Magnezyum stearat	2.0 g

LİYOFİLİZE EDİLMİŞ AMPUL

Essin

5.0 mg

Glisin

180.0 mg

EK AÇIKLAMALAR B

ATKESTANESİ KURU TOTAL EKSTRESİ İÇİN
FORMÜLASYON ÖRNEKLERİ

DAMLA:

Kuru ekstre	10.0 g
Polietoksilli hidrojenlenmiş Hint yağı	5.0 g
Polietilen glikol	10.0 g
Alkol	25.0 g
Glycamil (Monoamonyum glisirizinat)	0.8 g
Tatlandırıcı	y.m
Koruyucu (P-hidroksi benzoatlar karışımı)	0.2 g
Su ile tamamlama	100.0 g

KÖPÜK BANYOSU:

Kuru ekstre	2.0 g
Sodyum lauril sülfat (%27 WAS)	40.0 g
Cokamidopropylbetaine (%30 WAS)	25.0 g
Cokamide DEA	2.0 g
Oleamide DEA	2.0 g
PEG kaprilik/kaprik gliseriti	5.0 g
Koruyucular ve parfüm	y.m
Saf su ile tamamlama	100.0 g

JEL:

Kuru ekstre	2.0 g
Carbomer (carbopol + 934)	1.8 g
Sodyum hidroksit	0.6 g
Propilen glikol	10.6 g
Oleth - 20 (Volpo 20)	1.0 g
Koruyucular ve parfüm	y.m
Saf su ile tamamlama	100.0 g

TABLET:

Kuru ekstre	100.0 mg
Mısır nişastası	60.0 mg
Laktoz	20.0 mg
Silikajel tozu	7.0 mg
Sodyum karboksimetil seluloz (Nymcel)	5.0 mg
Polivinilpirolidon (M.W.25 000)	4.0 mg
Magnezyum stearat	4.0 mg

KAYNAKLAR DIZINI

- Aichinger, F., Giss, G. und Vogel, G., 1964, Neue befunde zur pharmakodynamik von bioflavonoiden und des rosskastanien saponins aescin als grundlage ihrer anwendung in der therapie, *Arzneim. Forsch.*, 14, 892.
- Albrecht, D., 1967, Aescin zur oedembehandlung in der urologie, *Urologe*, 6, 345.
- Ascher, P. W. und Platauf, F., 1970, Klinische untersuchungen ueber die pharmakodynamik von tritiummarkiertem aescin, *Arztliche Forschung*, 24, 294.
- Banchero, J.T. and Badger, W.L., 1979, Kimya mühendisliğine giriş I-II, (çev. İ. Çataltaş), İstanbul Üniversitesi Kimya Fakültesi, 888s.
- Başer, K. H. C. ve Kara, M., 1987, Bitkisel droglardan ilaç hammaddelerinin endüstriyel üretimi, IV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, 16-19 Mayıs 1986, 139.s, Ankara.
- Baytop, T., 1963, Türkiye' nin tıbbi ve zehirli bitkileri, İstanbul, 499s.
- Baytop, T., 1980, Farmakognozi I, Fatih Yayınevi Matbaası, 239s.
- Bianchini, F. and Corbetta, F., 1977, Health plants of the world, atlas of medicinal plants, (çev. M. A. Dejeý), Newsweek Books, 300p.
- Bonati, A., 1977, Derivatives from horse-chesnut tree used for treatment of vascular diseases, *Planta Medica Phytoterapia*, 11, 174-180.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Boquslavskaya, L. L. and Zykova, N., 1977, Quantitative determination of triterpenoic glycosides by the method of UV spectrophotometry, Pharm. Zh., 6, 53-55. CA: 88 141742x, 1978.
- Caminiti, G., Boccaletti, E., 1969, Escina nella sindrome lombosciatalgica, Min. Anest., 35, 749.
- Cazzulo, C. L., Torrigiani, G., 1969, Symptomatische hirnodeme klinische, elektroenzephalogra-phische und therapeutische erfahrungen mit dem preaeperat reparil, Med. Welt., 20, 1188.
- Cronquist, A., 1981, An integrated system of classification of flowering plants, Columbia University Press., 850p.
- Denner, A., 1973, Softening cream for the skin, 2, 249, 651 (cl.A61K), 1975, Appl., 73 39, 315. CA: 83 209332t, 1975.
- Di Pierro, A., 1969, L'escina nel trattamento degli edemi dei paraplegici, Min. Anest., 35, 233.
- Erbring, H., Vogel, G., 1963, Die bedeutung physikalischer zustandanderungen for die enterale resorption schwer resorbierbarer saponine, Arzneim. Forsch., 13, 467.
- Ferrero, A., Sacrini, M. L., Tiengo, M., 1968, Impiego dell'escina nelle gestosi e nelle esclampsie, Min. Anest., 34, 1414.
- Franck, Von H., 1977, Zur qualitativen und quantitativen analytik der saponine, Deutsche Apotheker-Zeitung, 115, 33, 1206-1208.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Fromantin, J. P., 1972, Hygienic compositions for hemorrhoids, 2, 177,626 (cl.a61k), 1973 Appl. 72 11, 608, 4pp.
- Garbin, O., Vartanian, V., 1972, Note preliminari sull'uso dell'escina nel trattamento della sclerosi multipla, Gazz. Med. It., 131, 29.
- Gasparic, J. and Churacek, J., 1978, Laboratory handbook of paper and thin-layer chromatography, John Wiley and Sons, 362p.
- Giannetti, A., Pelfini, C., 1968, Rillievi sull'uso di un sale sodico dell'escina nell'Herpes Zoster, Min. Dermatol., 43, 528.
- Giordano, P. L., Invernizzi, G., 1968, Tierexperrimentelle untersuchungen ueber die wirkung niedriger rontgendosen auf das zentralnervensistem und strahlen schutzversushe mit., arzneimittel., Arzneim Forch., 18, 1417.
- Girerd, R. J., Di pasquale, G., Steinetz, B. G., Beach, V. L., Pearl, W., 1961, The anti-edema properties of aescin, Arch. Int. Pharmacodyn., 133, 127.
- Glasl, H. und Ihrig, M., 1984, Quantitativa bestimmung von triterpensaponinen in drogen, Pharmazeutische Zeitung, 129, 43, 2619-2622.
- Götz, W., Sachs, A., Wimmer, H., 1980, Thin layer chromatography, Gustav Fischer Verlag, 114p.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Greifansteiner, H., 1966, Behandlung posttraumatischer Schwellungen mit repara'il, Munch. Med. Wschr., 108, 2172.
- Grollier, J. F. and Beauquey, B., 1979, Hair care product for washing and / or untangling hair based on saponoside containing plant extracts, 3, 018, 600 (cl.A61K7/06), 980, Appl., 81, 256. CA: 94 145180J 1981.
- Hammerstein, F. und Kaiser, F., 1972, Quantitative direktauswertung von arzneipflanzen-extrakten auf dunnschicht chromatogrammen, Planta Medica, 21, 5-15.
- Hampel, H., Hofrichter, G., Liehn, H.D., Schlemmer, W., 1970, Zur pharmakologie der aescin-isomere unter besonderer beru'cksichtigung von-aescin, Arzneim. Forsch., 20, 209
- Harrichhausen, K. H., 1968, Erfahrungen mit dem neuen venenthrapeutikum opino-gel, Therap. Gegenw., 107, 549.
- Hemmer, R., Diezemann, E., 1962, Die wirkung des rosskastaniensaponins, aescin auf den liquordruck. Klinische und tierexperimentelle untersuchungen, Arch. Psychiatr., 203, 407.
- Henschler, D., Hemple, K., Schultze, B., Maurer, W., 1971, Zur pharmakokinetik von aescin, Arzneim. Forsch., 21, 1682.
- Hepper, F., Ascher, W. P., Argyropoulos, G., 1967, Nevere Beobachtungen uber die Wirkung von aescin in der neurochirurgie, Wien Med. Wschr., 117, 706.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Hill, C. G. J., An introduction to chemical Engineering Kinetics & Reactor design, John Wiley & Sons , Newyork.
- Hiroshi, K., Yasoshi, A., Fumio, K., 1968, Cosmetics for hair containing Aesculus hippocastanum extract, 73, 12, 975,(cl. A61K, B 01d, C 079), 1973,Appl. 68 58, 503. CA: 80 100110f 1974.
- Hutzel, M., 1963, Erfahrungen mit reparil in der chirurgie und praxis, Med. Welt., 14, 1279.
- Inverni Della Beffa, 1979a, Escin, Teknik Rapor.
- Inverni Della Beffa, 1979b, Horse chestnut, Teknik Rapor.
- Jacker, H. J., 1977, Zur pharmakologie der rosskastanie, zbl. Pharma., 116, 959.
- Jonhe, H., 1964, Zur medikamentosen behandlung des varikosen simptomenkomplexes mit veno-reparil, Landarzt, 40, 1040.
- Joo, F., Csillik, B., Zoltan, O. T., 1970, Untersuchungen ueber das durch triaethylzinnsufat verursachte hirnoedem beider ratte. 6. mitt. ueber die protektive wirkung des aescin gegen die durch triathylzinnsulfat bedingte erhoehung der permeabilitaet der blut-hirn-schranke, Arzneim. Forsch., 20, 863.
- Jurenitsch, J., Aurada, E., Robien, W., Kubelka, W., 1984, Monoester von R₁-barrigenol, barringtogenol C, camelliagenin E und theasapogenol A mit kurzkettigen carbon sauren: zuordnung der 21-und 22- ¹H-NMR signale, Scientia Pharmaceutica, 52, 141-146.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Kirk Othmer, 1978, Concise encyclopedia of chemical technology, John Wiley and Sons, Newyork.
- Klauda, M., 1968, Erfahrungen mit einem neuartigen gel in der chirurgie, Landarzt, 44, 289.
- Konoshima, T. and Lee, K., 1986, Antitumor agents, 82. cytotoxic sapogenols from aesculus hippocastanum, Journal of Natural Products, 49, 4, 650-656.
- Kuriyama, H., Aikawa, Y., Kohno, F., 1968, Skin cosmetics containing aesculus hippocastanum extract, 73 05, 022 (cl.A61K,BOld, C 079), 1973, Appl. 68 63, 349. CA: 80 19402f, 1974.
- Lippert, T. H., Weinberg, K., 1967, Untersuchungen ueber den einfluss von dexamethason auf die oedemhemmende wirkung von aescin, Arzneim. Forsch., 17, 1598.
- Lorenz, D., Marek, M.L., 1960, Das therapeutisch wirksame prinzip des rosskastanie (Aesculus hyppocastanum)1. mit., Arzneim. Forsch., 10, 263.
- Lorenz, D., Reipper, F., 1967, Die oedemhenmende wirksamkeit von aescin und buphenin bei cutaner anwendung am kaolin-oedem der rattenpfote, Arzneim. Forsch., 17, 1083.
- Lotz, H., Eine neuartige applikationsform der lokalen behandlung von venenerkrankungen und traumatischen schaediguengen des bewegungsapparates, Landartz, 43, 1591.
- Lucas, J., 1963, Erfahrungen mit aescin in der internen therapie, Med. Welt., 14, 913.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ludwig, H., 1970, Untersuchungen zur wirksamkeit von heparinoid-aescin-gel, Med. Welt., 21, 194.
- Madaus, R., 1975, Aesculus hippocastanum saponins and salts, 2, 530, 941 (cl. c07h15/20), 1977 Appl., 1975.
- Manca, p., Passarelli, E., 1965, Aspetti farmacologici dell'escina, principio attivo dell'aesculus hypocastanum, Clin. Terap., 32, 297.
- Marissal, J., 1976, Cosmetic agent for the skin, 2, 720, 510 (cl.A61K7/48), 1977, Appl. 74, 900 CA: 88, 65872x, 1978.
- Marissal, J., Aubert, L. P., 1981, Thinnig and anticellutitic cosmetic composition based on saponin-containing plant extract, Arnica montana and cola nitida extracts, 2, 499, 405 (cl.A61K7/48), 1982, Appl., 81/2, 571.CA: 97 188327s, 1982.
- Mc Cabe, J. and Smith, J. M., 1976, Unit operation of chemical engineering, Mc Graw Hill, 1028p.
- Meyer-Bertenrath, J., Kaffarnik, H., 1970, Zur enteralen resorption von aescin, Arzneim. Forsch., 20, 147.
- Mussnug, G., 1969, Zur biochemie der entzündung und oedembildung sowie der pharmakokinetik des aescins, Arzneim. Forsch., 19, 1588.
- Niedling, H., 1967, Erfahrungen ueber die anwendung eines neuen venenmitteles, Med. Welt, 18, 2137.
- Oreal, S. A., 1980, Cosmetik composition based on a powder of vegetable origin, 886, 941 (cl. A61K), 30, 1981, Appl. 80/93. CA:95 103149W, 1981.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Parmeggiani, G., 1968, Sperimentazione clinica in ortopedia e traumatologia di un nuovo preparato ad azione antiedematosa, Gazz. Med. It., 129, 61.
- Perry, R. H. and Chilton, C. H., 1984, Chemical engineers' handbook, 6th ed.
- Petkov, V., 1982, Modern phytotherapy, Medicina Fizkultura.
- Preziosi, P., Manca, P., 1965, Die antiödem und die antiinflammatorische wirkung von aescin und ihre beziehung zur hypophysen-nebennieren-achse, Arzneim. Forsch., 15, 404.
- Proserpio, G., Gatti, S., Genesi, P., 1980, Cosmetic uses of horse-chesnut (*Aesculus hippocastanum*) extracts, of escin and of the cholesterol/escin complex, Fitoterapia, 11, 2.
- Rawlins, E. A., 1982, Bentley's textbook of pharmaceutics, Bailliere Tindall, London, 725p.
- Rucman, R. and Jankovic, S., 1976a, Isolation of escin from horse-chesnuts, 2, 361, 420 (cl.C07J63/00), 10 Mar. 1978, Appl. 76/1, 990, 12 Aug. 1976.
- Rucman, R. and Jankovic, S., 1976b, Isolation of escin from horse-chesnut, 2, 733, 204 (cl.C07H15/20), 1978, Appl. 76/1, 990, 1976.
- Rucman, R. and Jankovic, S., 1978, Isolation of escin from horse chesnut, 455, 693 (cl.C07D), 1978, Appl. 464, 693, 1978.
- Scheibe, G., 1966, Behandlung des sudeck-syndroms mit reparil, Landarzt, 42, 439.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Schoen, J., Wefers, J., 1968, Erfahrungen mit einem lokalen venentherapeutikum, Hippokrates, 39, 227.
- Schweitzer, P. A., 1979, Handbook of separation techniques for chemical engineers, Mc Graw Hill, 1979.
- Stahl, E., 1969, Thin layer chromatography a laboratory hand book, springer-verlag Berlin, 1041p.
- Stayanov, N., 1982, Tıbbi bitkilerimizi değerlendirelim, (cev. B. Makaklı), Akgün Yayınevi, 399s.
- Stoppani, L., Trassini, R., Lo Cuoco, A., 1969, L'escina nella terapia delle flebopetia degli arti inferiorio, Gazz. Int. Med. Chir., 74, 540.
- Tcheknavorian, A. A. and Wijesekera, R. O. B., Medicinal and aromatic plants for industrial development UNIDO/IO. 505, 3 June 1982.
- Tetenyi, P., 1977, Les principes actifs d'marronnier d'inde l'escine, l'esculoside et la de'toxication des saponines, Plantes Medicinales et Phytotherapie, 11, 158-164.
- Thomae, K., 1965, Hair treating compositions, 6, 609, 031 (cl.A61K), 1967, Appl. CA: 67 36348S, 1967.
- Torelli, L., 1969, La prevention de l'oedeme larynge dans l'instubation orotracheale prolongee avec le sel sodique d'escine, Agressologie, 10, 81.
- Touzet, A., 1972, Cosmetic composition, 2, 191, 878 (cl.A61K), 1974, Appl. 7225, 482. CA: 81 126691S, 1974.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Trease, G. E. and Evans, W. C., 1980, Pharmacognosy, Spottiswoode ballantyne ltd., 784p.
- Treybal, R. E., 1981, Mass tranfer operations, Mc Graw Hill, 784p.
- Tschesche, R., Wulff, G., 1973, Costitution des principaux composants de l'aescina, Fortschritte Chemie organ. Natustoffe, 30, 530.
- Tyler, V. E., Brady, L. R., Robbers, J. E., 1981, Pharmacognosy, Lea and Febiger, 520p.
- Tzavellas, O., Finke, J., 1970, Aescin bei zerebralen durchblutungsstoerungen klinische und ophthal modynamographische be obachtungen, Wien. Klin. Wschr., 82, 714.
- Tzonos, T., Reibling, H., 1968, Die aescin Wirkung auf das experimentelle hirnoedem der ratte, Arzneim. Forsch., 18, 225.
- Uebel, H., Patt, P., 1960, Das therapeutisch wirsame prinzip der rosskastanie (aesculus hyppocastanum) 4. Mitt. zur toxikologie des wirkstoffes, Arzneim. Forsch., 10, 280.
- UNIDO, 1978, Report of technical consultation on production of drugs from medicinal plants in developing countries, Lucknow, India, 13-30 March 1978, ID/222, (ID/WG. 271/6).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Vanhalen, M. and Vanhalen-Fastre, R., 1983, Quantitative determination of biologically active constituents medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography-densitometry, *Journal of chromatography*, 281, 263-271.
- Varkonyi, T., Csillik, B., Zoltan, O. T., Foeldi, M., 1969, Untersuchungen ueber das durch triaethylzinnsulfat verursachte hirnoedem. 4. Mitt. elektronenoptische untersuchungen, *Arzneim. Forsch.*, 19, 293.
- Vogel, G., Marek, M. L., 1962, Zur pharmakologie einiger saponine, *Arzneim. Forsch.*, 12, 815.
- Vogel, G., Marek, M. L., Stoeckert, L., 1963, Weitere untersuchungen zum wirkungsmekanismus des rosskastanien saponins aescin, *Arzneim. Forsch.*, 13, 59.
- Vogel, G., Marek, M. L., Oertner, R., 1970, Untersuchungen zum mechanismus der therapeutischen und toxischen des rosskastanien-saponins aescin, *Arzneim. Forscgg.*, 20, 699.
- Wagner, H., Blant, S., Zqainski, E. M., 1984, *Plant drug analysis*, Springer-Verlag, 320p.
- Wagner, V. H., Reger, H., Bauer, R., 1985, Saponin haltige drogen und fertigarzneimittel, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 125, 30, 1513-1518.
- Wagner, J. V., Schlemmer, W., Hoffmann, H., 1970, Uber inhaltsstoffe des robkastaniensamens, *Arzneim. Forsch.*, 20, 2, 205-209.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Wagner, H. and Wulff, P., 1977, Proceedings in live sciences new natural products and plant drug with pharmacological biological or therapeutical activity, Springer-Verlag.

Wampola, H., 1968, Therapieetfahrungen mit einem neuartigen gel bei sogenannten beinleiden, Arztl. Praxis, 20, 820.

Windholz, M., 1976, An encyclopedia of chemicals and drugs the merk index, Merc and co., 1313.

Wolfram, St., 1968, Ueber die intravenose behandlung mit reparil, 118, 490.

Wulff, G. und Tschesche, R., 1968, Uber triterpene XXVI¹ über struktur der rosskastaniensaponine (aescin) und die aglycone verwandter glykoside, Tetrahedron, 25, 415-436.

Zoltan, O. T., Gorini, S., 1970, Das verhalten des liquordruckes beim experimentell druch triaethylzinnsulfat verursachten hirnoedem. wirkung der therapie mir aescin, Arzneim. Forsch., 20, 1939.

Zotan, O. T., Fekete, E., Domonkos, H., Földi, M., 1969, Untersuchungen ueber das triaethylzinnsulfat verursachte hirnodem bei ratte I. mitt. veränderungen des wassergehaltes der hirnssubstanz und derenteraputische beeinflussung mit aescin, Arzneim. Forsch., 19, 287.

Zoltan, O. T., Foeldi, M., 1969, Untersuchungen ueber das durck triaethylzinnsulfat verursachte hirnoedem. Z. mitt. die wirkung von aescin auf die mortalitaet, Arzneim. Forsch., 19, 288.