

**T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**ÜLKEMİZDE YETİŞEN FARKLI ARMUT TÜRLERİNİN MEYVE, DAL VE
YAPRAKLARINDA ARBUTİN ANALİZİ METOT OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İŐİL AÇIKGÖZ SAĞLAM

**MART 2016
UŞAK**

ÜLKEMİZDE YETİŞEN FARKLI ARMUT TÜRLERİNİN MEYVE, DAL VE YAPRAKLARINDA ARBUTİN ANALİZİ. METOT OPTİMİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Işıl Açıkgöz Sağlam

UŞAK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2016

ÖZET

Arbutin birçok tıbbi bitkide bulunan doğal aktif bir bileşendir. Başta cilt kanseri tedavisinde, idrar yolu enfeksiyonları tedavisinde, sistit ve böbrek taşları tedavisinde, yetişkinlerin ciltlerinde oluşan lekelerin tedavilerinde kullanılır. Doğal arbutinin bitki yapraklarından ekstraksiyonu için çevre ve insan sağlığını olumsuz etkileyecek toksik kimyasalların kullanıldığı, üretim süreleri uzun ve maliyeti yüksek ekstraksiyon yöntemleri yerine kısa ekstraksiyon zamanı, minimum organik solvent tüketimi olan yüksek verime sahip ekonomik, çevre dostu kolay uygulanabilir Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada ekstraksiyon verimi üzerine metanol konsantrasyonu, ekstraksiyon zamanı ve sıcaklık gibi parametrelerin etkileri incelenmiştir. Optimizasyon için Yüzey Yanıt Metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Bunun için, ekstraksiyon verimi üzerine etkin deneysel koşullar: metanol konsantrasyonu (25-75 %), katı/solvent oranı (50 mL/200 mg numune), pH:1, ekstraksiyon süresi (15-45 dakika), sıcaklık (30-60 °C) olarak seçilmiştir. Bu parametrelerin en iyi muhtemel kombinasyonları Yüzey Yanıt Metodolojisi ile elde edildi. Çalışmamızın sonucunda; en iyi ekstraksiyon verimi için işletme koşulları pH:1, metanol konsantrasyonu (%): 56,81, ekstraksiyon zamanı: 29,66 dakika, sıcaklık: 43,37⁰C olarak belirlendi. Bu işletme koşullarında arbutinin deneysel verimi % 3,10'dur. Elde edilen bu sonuçlar armut yapraklarından Arbutin etken bileşenin ekstraksiyonu için Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) etkili bir metot olabileceğini göstermiştir.

Bilim Kodu : Kimya Anabilim Dalı
Anahtar Kelimeler : Arbutin, Armut, Ekstraksiyon, Optimizasyon
Sayfa Adedi : 113
Tez Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK

**THE FRUITS OF DIFFERENT PEAR SPECIES GROW IN OUR COUNTRY,
ANALYSIS OF ARBUTIN IN THE LEAVES AND BRANCHES. OPTIMIZATION
METHOD**

(M. Sc. Thesis)

Işıl AÇIKGÖZ SAĞLAM

USAK UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 2016

ABSTRACT

Arbutin is a natural active ingredient that is found in many medicinal plants. In the beginning the treatment of skin cancer, urinary tract infections, cystitis and kidney stones in the treatment of skin used in the treatment of stains that occur in adults. Natural arbutin from the leaves of the plant that can adversely affect environmental and human health toxic chemicals are used for the extraction, where the extraction time is long instead of short production time and high cost extraction methods, minimum organic solvent consumption, high efficiency, economical, environmentally friendly and viable Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) method has been developed. In this study, methanol concentration on extraction efficiency, the effects of parameters such as extraction time and temperature were investigated. For optimization response surface methodology (RSM) was used. For this, the effect on extraction yield experimental conditions: methanol concentration (25-75 %), solid/solvent ratio (50 mL/200 mg sample), pH:1, extraction time (15-45 min), temperature (30-60°C) was selected as the. The best possible combinations of these parameters were obtained by response surface methodology. As a result of our study; the best pH for extraction efficiency operating conditions:1, methanol concentration (%): 56,81, extraction time: 29,66 minutes, temperature: 43,37⁰C has been identified as. The experimental conditions in this business arbutin yield % 3,10. The leaves of the pear arbutin component factor of this result for the extraction of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) have shown that it can be an effective method.

Code Of Science : Department of Chemistry
Keywords : Arbutin, Pear, Extraction, Optimization
Number Of Page : 113
Adviser : Yrd. Doç.Dr. İbrahim BULDUK

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleŐtirilmesinde, alıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danıŐman hocam Yrd. Do. Dr. İbrahim BULDUK, alıŐma sÜresince tÜm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan annem Aysel AÇIKGÖZ'e, babam Sabri AÇIKGÖZ 'e ve kardeŐim Gözde AÇIKGÖZ'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım. Bana gösterdiği sabrı, hoŐgörüsü ve desteği için eŐim Sami SAğLAM'a ve değerli ailesine teşekkür ederim. Ayrıca bu alıŐma 114Z132 numaralı Tübitak projesi kapsamında yapılmıştır. Finans desteği için Tübitak'a teşekkür ederiz.

İŐıl Açıkgöz SAğLAM

UŞak, Mart 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. Armut	3
2.1. Armutun Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Armut Çeşitleri.....	5
Pyrus Amygdaliformis	5
Pyrus Anatolica	5
Pyrus communis	6
Pyrus Elaeagrifolia	7
Pyrus nivalis	7
Pyrus salicifolia.....	8
Pyrus serikensis.....	9
Pyrus syriaca	9
2.2.Arbutin	10
2.2.1.Tarihi ve Önemi	11
2.2.2.Uygulamaları.....	12
2.2.3.Kimyasal özelliği.....	12
2.2.4.Genel Üretim Süreci.....	13
2.2.5.Mevcut Formülasyonlar	13
2.2.6.Biyolojik Aktivite.....	13
2.2.7.Kullanıldığı Bazı Alanlar	14
2.2.7.1. Hiperpigmentasyon	14
2.2.7.2.Yaş Lekeleri	14
2.2.7.3. Melazma ve Chloasma	15

2.2.7.4.Çiller.....	15
2.3.EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ.....	16
2.3.1.Örnek Önışlemleri.....	16
2.3.2.Soxhlet Ekstraksiyonu.....	18
2.3.2.1.Uygulamaları.....	20
2.3.3.Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (Pressurized Liquid Extraction, PLE).....	21
2.3.3.1.Uygulamaları.....	25
2.3.4.Mikrodalga-Destekli Solvent Ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction, MAE) .	26
2.3.4.1.Uygulamaları.....	29
2.3.5.Ses Dalgaları-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu (Sonication-Assisted Liquid Extraction, SAE)	31
2.3.5.1.Uygulamaları.....	33
2.3.6.Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE).....	35
2.3.6.1.Uygulamaları.....	37
2.4.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	38
2.4.1.HPLC Sistemleri.....	39
2.4.2.Hareketli Faz.....	40
2.4.3.Sabit Faz.....	40
2.4.4. Pompa.....	40
2.4.5. Kolon.....	41
2.4.6. Dedektör.....	41
2.5. HPLC Türleri.....	42
2.5.1. Normal Faz Kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC):.....	42
2.5.2. Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC):.....	43
2.5.3. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC):.....	43
2.5.4. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC):.....	43
2.6. HPLC Kullanım Alanları.....	44
2.7. Alıkonma Parametreleri.....	45
2.8. Bant Genişliğı.....	45
2.9. Kolon Verimliliğı.....	46
2.10. HPLC’de Kolon Dolgu Maddeleri.....	48
2.10.1. Silika Jel.....	49
2.10.2. Polar Gömülü (Embedded) Fazlar.....	51
3.MATERYAL VE METOT.....	54

3.1. HPLC Analiz Metodu ve Validasyonu	54
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	54
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı.....	54
pH metre.....	54
Ultrasonik Banyo.....	54
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.1.3. HPLC Analiz Metodu.....	55
3.1.4. Validasyon Çalışmaları	56
3.2. Ekstraksiyon.....	56
3.2.1. Uygun Solventin Belirlenmesi Çalışmaları.....	59
3.2.2. En Uygun Ekstraksiyon pH sınırın Belirlenmesi Çalışmaları	59
3.2.3. En Uygun Solvent/Katı Oranının Belirlenmesi Çalışmaları	61
3.2.4. En Uygun Ekstraksiyon Verimi İçin Tane Boyutunun Belirlenmesi Çalışmaları.....	61
3.2.5. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu Çalışmaları	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	63
4.1. HPLC Analiz Metodu Validasyonu Çalışmaları.....	63
4.2. Uygun Solventin Belirlenmesi Çalışmaları	65
4.3. En Uygun Ekstraksiyon pH sınırın Belirlenmesi Çalışmaları.....	68
4.4. En Uygun Solvent/Katı Oranının Belirlenmesi Çalışmaları.....	71
4.5. En Uygun Ekstraksiyon Verimi İçin Tane Boyutunun Belirlenmesi Çalışmaları	73
4.6. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu Çalışmaları.....	74
4.6.1. İstatistiksel Analizler.....	75
4.6.2. Optimizasyon Sonuçları	75
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Proses Değişkenlerinin Etkisi.....	75
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Zamanının Etkisi	77
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi ..	78
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Metanol Konsantrasyonunun Etkisi	79
RSM İle Yapılan Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu	80
Model Uydurma	83
4.6.3. Ultrason Gücü ve Solvent/Katı Oranının Optimizasyonu Çalışmaları.....	88
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Solvent/Katı Oranının Etkisi	90
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ultrason Gücünün Etkisi	90

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Metanol Konsantrasyonunun Etkisi	91
RSM İle Yapılan Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu	92
4.7. Tıbbi Bitkilerde Arbutin İçeriğinin Belirlenmesi Çalışmaları	95
5. TARTIŞMA.....	101
KAYNAKÇA.....	102
ÖZGEÇMİŞ	113



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Bitkisel ilaçların kronolojisi [4]	2
Çizelge 2. 1. Dünya’da armut üretimi [16].....	4
Çizelge 2.3. 1. En yaygın kullanılan örnek önışlem teknikleri.....	17
Çizelge 2.3.2. Poliaromatik hidrokarbonların tayini için geliştirilen yöntemlerden bazıları	35
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	55
Çizelge 3. 2. HPLC analiz metodu	55
Çizelge 3.2 1. Box-Behnken Tasarımı Kullanılan Bağımsız Değişkenler, Kodları ve Gerçek Değerleri.....	62
Çizelge 4. 1. Validasyon için kullanılan arbutin standartlarının konsantrasyonları	63
Çizelge 4. 2. Arbutin standartlarının konsantrasyonları ve elde edilen pik alanları.....	63
Çizelge 4.3.Arbutinin HPLC Analiz Metodu kalibrasyon verileri istatistiksel değerlendirilmesi	64
Çizelge 4. 4. Tekrarlanabilirlik sonuçları	65
Çizelge 4. 5. Farklı solventlerle ekstraksiyon verimleri.....	66
Çizelge 4. 6. Farklı metanol solventlerinde ekstraksiyon verimleri	67
Çizelge 4. 7. Farklı pH larda ekstraksiyon verimleri.....	69
Çizelge 4. 8. Farklı solvent miktarlarında ekstraksiyon verimleri	72
Çizelge 4. 9. Farklı tane boyutlarında ekstraksiyon verimleri.....	73
Çizelge 4.10. Box-Behnken Tasarımı kullanılan bağımsız değişkenler, kodları ve gerçek değerleri.....	75
Çizelge 4.11. Bağımsız değişkenlerin(X1, X2, X3) Box-Behnken Tasarımları ve ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar	76
Çizelge 4. 12. Yüzey yanıt ikinci dereceden model için (ANOVA) varyans analizleri.....	85
Çizelge 4. 13. Optimizasyon sonucu	86
Çizelge 4.14. Box-Behnken Tasarımı kullanılan bağımsız değişkenler, kodları ve gerçek değerleri.....	88
Çizelge 4.15. Bağımsız değişkenlerin (X1, X2, X3) Box-Behnken Tasarımları ve ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar	89
Çizelge 4. 16. Optimum koşullar.....	95
Çizelge 4. 17. Toplam optimum koşullar	95
Çizelge 4. 18. Farklı bitki yapraklarında arbutin içerikleri	96
Çizelge 4.19. <i>Pyrus elaeagnifolia</i> , <i>Pyrus anatolica</i> ve <i>Pyrus amygdaliformis</i> ’nin yaprak, dal, ve meyvesinde bulunan arbutin miktarı.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4. 1. Arbutin standart solüsyonlarının doğrusallık grafiği.....	64
Şekil 4. 2. Farklı solventlerde Arbutin verimi	66
Şekil 4. 3. Farklı metanol solventlerinde arbutin verimi	67
Şekil 4. 4. Farklı pH larda ekstraksiyon verimleri.....	70
Şekil 4. 5. pH 1 ekstraktının kromatogramı.....	70
Şekil 4. 6. pH 7 ekstraktının kromatogramı.....	71
Şekil 4. 7. pH 14 ekstraktının kromatogramı.....	71
Şekil 4. 8. Solvent miktarı ile arbutin veriminin değişimi.....	72
Şekil 4. 9. Solvent miktarı ile arbutin veriminin değişimi.....	74
Şekil 4. 10. Ekstraksiyon zamanının ekstraksiyon performansı üzerine etkisi	77
Şekil 4. 11. Ekstraksiyon sıcaklığının ekstraksiyon performansı üzerine etkisi	78
Şekil 4. 12. Ekstraksiyon performansı üzerine metanol konsantrasyonunun etkisi	79
Şekil 4. 13. Model denklem kullanılarak hesaplanmış değerlere karşı deneysel olarak elde edilmiş ekstraksiyon verimi değerleri arasındaki ilişki	81
Şekil 4. 14. Metanol konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	81
Şekil 4. 15. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	82
Şekil 4.16. Metanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığı etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	82
Şekil 4. 17. Standart solüsyonun kromatogramı (konsantrasyon: 150 ppm).....	87
Şekil 4. 18. Armut yaprağı ekstraktının kromatogramı	87
Şekil 4. 19. Solvent/Katı oranının ekstraksiyon performansı üzerine etkisi	90
Şekil 4. 20. Ultrason gücünün ekstraksiyon performansı üzerine etkisi	91
Şekil 4. 21. Ekstraksiyon performansı üzerine metanol konsantrasyonunun etkisi	92
Şekil 4.22. Metanol konsantrasyon ve ultrason gücünün etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	93
Şekil 4.23. Ultrason Gücü ve Solvent/Katı Oranının etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	94
Şekil 4.24. Metanol Konsantrasyonu ve Solvent/Katı Oranının Etkileşimli Etkilerini Gösteren Arbutin Ekstraksiyonu için üç Boyutlu bir Yüzey Yanıt ve Kontur Grafikleri ...	94
Şekil 4.25. Karadut yaprağı ekstraktının kromatogramı.....	97
Şekil 4. 26. Kızılcık yaprağı ekstraktının kromatogramı.....	97
Şekil 4. 27. Mersin yaprağı ekstraktının kromatogramı	97
Şekil 4. 28. Yaban Mersini yaprağı ekstraktının kromatogramı.....	98
Şekil 4. 29. Civanperçemi ekstraktının kromatogramı	98
Şekil 4. 30. Beyazdut yaprağı ekstraktının kromatogramı	98
Şekil 4. 31. Ayı Üzümü Yaprağı Ekstraktının Kromatogramı	99
Şekil 4. 32. Armut yaprağı ekstraktının kromatogramı	99

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2. 1. Armut bitkisi ve yaprakları	5
Resim 2. 2. <i>Pyrus Anatolica</i> meyvesi ve yaprakları	6
Resim 2. 3. <i>Pyrus communis</i> çiçek ve yaprakları	6
Resim 2. 4. <i>Pyrus Elaeagrifolia</i> meyve ve yaprakları.....	7
Resim 2. 5. <i>Pyrus nivalis</i> meyve ve yaprakları.....	8
Resim 2. 6. <i>Pyrus salicifolia</i> meyve ve yaprakları	8
Resim 2. 7. <i>Pyrus serikensis</i> meyve ve yaprakları	9
Resim 2. 8. <i>Pyrus sriaca</i> meyve ve yaprakları	10
Resim 2.2. 1. Arbutin yapısı	12
Resim 2.2. 2 Yaş lekeleri.....	14
Resim 2.2. 3. Çiller.....	15
Resim 2.3. 1. Soxhlet ekstraktör cihazı	19
Resim 2.3 2. PLE sistemi	23
Resim 2.3 3. MAE’de kapalı ve açık sistem	28
Resim 2.3 4. Isıtma modelleri.....	29
Resim 2.3 5. Dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi	32
Resim 2.3.6.Dinamik ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonun analiz sistemine bağlanmasının şematik gösterimi	33
Resim 2.3.7. Küçük kolonlarda ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi..	34
Resim 2.3.8. SFE sistemi.....	37
Resim 2.4.1. Bir HPLC cihazı	39
Resim 2.10. 1. Tipik bir polar gömülü (embedded) faz gösterimi	51
Resim 3.2. 1. Numune ve solventin erlenlere alınması	57
Resim 3.2. 2. Ultrasonik banyo ve ekstraksiyon	57
Resim 3.2. 3. Ekstraktın whatman beyaz bant filtre kâğıdı ile süzülmesi.....	58
Resim 3.2. 4. Ekstraktın enjektör ucu filtre ile süzülmesi.....	58
Resim 3.2. 5. Farklı pH larda ekstraktlar.....	60
Resim 3.2. 6. Farklı pH larda ekstraktlar.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

RSM	Response Surface Metadolojisi
UAE	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon
UVB	Utraviole
GC	Gas Chromatography
ECD	Electron Yakalama Dedektörü
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
PLE	Pressurized Liquid Extraction
MAE	Microwave Assited Extraction
SAE	Sonication Assited Liquid Extraction
SFE	Supercritical Fluid Extraction
LC	Liquid Chromatography
FL	Floresans
EC	Elektrokimyasal
MS	Mass Spectrometer
RI	Refractive Index
NPC	Normal Phase Chromatography
RPC	Reversed Phase Chromatography
SEC	Size Exclusion Chromatography
IEC	Ion Exchange Chromatography

1.GİRİŞ

Eski çağlardan beri birçok bitkinin tıbbi amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Tıbbi bitkiler ve onların kullanımları ile ilgili en eski bilgiler Çin, Mısır ve Yunan tarihinden gelmekte, Anadolu'da ise Hitit'ler döneminde bazı drogların üretilip ihraç edildiği bilinmektedir.

Günümüzde ise kullanılan bitki sayısının 20,000 kadar olduğu, bunlardan 4,000 drogun yaygın şekilde kullanıldığı, yaklaşık 400 kadarının ise ticaretinin yapıldığı bildirilmektedir. Türkiye'de tıbbi amaçlı kullanılan bitki sayısı ise 600 civarındadır [1]. Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmaları neticesinde, dünya nüfusunun %80'ninin bitkisel ilaçlarla tedavi edildiği görülmüştür [2]. Bir diğer araştırmaya göre de, kullanılan ilaçların gelişmiş ülkelerde % 25'i, gelişmekte olan ülkelerde ise % 75'i bitki ve bitki türevlerinden elde edilmektedir [3]. Bitkilerden elde edilen ilk aktif bileşikler striknin, morfin, atropin ve kolşisin gibi alkaloidlerdir. Söğüt ağacının kabuklarından elde edilen aspirin ise 1897 yılında sentezlenmiştir.

Cilt kanseri tedavisinde, böbrek rahatsızlıkları tedavisinde, cilt lekeleri tedavisinde ve lekeler için cilt beyazlatma ajanı olarak kullanılan arbutin ise armut, ayı üzümü, buğday gibi bitkilerden elde edilmektedir. Bitkilerden doğal arbutin ekstraksiyonu geleneksel solvent ekstraksiyonu yöntemiyle yapılmaktadır. Bu ekstraksiyon tekniklerinde çevre ve insan sağlığını olumsuz etkileyecek toksik kimyasallar kullanılmakta, üretim süreleri uzun ve maliyet yüksektir. Kısa ekstraksiyon zamanı, minimum organik solvent tüketimi ve çevre dostu yeni ekstraksiyon tekniklerine ihtiyaç vardır. Ultrasonik destekli ekstraksiyon; ucuz, basit ve geleneksel tekniklere alternatiftir.

Arbutinle ilgili çalışmalar yıllardan beri yapılmaktadır. Örneğin; A.K. Chakraborty, Y.Funasaka, M. Komoto ve M. Ichihashi: İnsan melanositlerinde melanojenik proteinlerine arbutin etkisini araştırmıştır. Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y, Fukuda M ise melajonez hücreleri üzerinde biyokimyasal olarak kültürlü B16 hücreleri kullanılarak arbutin etkisini incelemişlerdir.

Bir diğ er ç alışmada M.O. Masse ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Onlarda deri beyazlatıcı kozmetiklerdeki kojik asit ve arbutinin tanımlanması ve kantitatif analizi üzerine ç alışmışlardır.

Çizelge 1. 1. Bitkisel ilaçların kronolojisi [4]

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

2. Armut

2.1. Armutun Genel Özellikleri

Her iki yarıkürenin ılıman iklim kuşağı ülkelerinde yetiştirilen armut, dünyanın en önemli meyve ağaçlarından biridir. Armut ağacı tepeye doğru genişleyen ve olgunlaştığında 13 m'ye ulaşan boyuyla elma ağacından daha uzun ve daha diktir [5].

Armut sistematikte *Roseaceae* familyasının *Pomoideae* alt familyasına dâhildir. Cins adı *Pyrus*'dur. Bu cins içinde birçok tür bulunmasına rağmen 13 tür önem kazanmıştır [6]. *Pyrus* cinsi içerisinde türler doğu ve batı armutları olarak sınıflandırılmıştır [7]. Yapılan bu sınıflandırmada batı armutlarında 20 den fazla tür bulunurken, doğu armutları 5 gruba ayrılmıştır. Batı armutları Avrupa, Kuzey Afrika, Yakın Doğu, İran ve Orta Asya bölgelerini kapsamaktadır. Doğu armutları Ussurian armudu, Çin beyaz armut, Çin kumlu armut, Xinjiang armut (*P.sinkiangensis* Yu) ve Japon armudu olarak belirtilmektedir. Doğu armudu olarak adlandırılan türlerin yetiştiricilikte anaç olarak kullanımı oldukça önemli bir yere sahiptir [8].

Orijinleri ve ticari üretimine göre yapılan bir diğer sınıflandırmada Avrupa armudu (*Pyrus communis* L.), Japon armudu (*P. pyrifolia* Burm.) ve Çin armudu (*P. bretschneideri* Rehd. ve *P. ussuriensis* Maxim) olarak belirtilmektedir [7-11].

Dünyada en önemli yere sahip olan tür *Pyrus communis* L' tur. Anavatanının Anadolu, Kafkasya ve Orta Asya olduğu belirtilmektedir. Bulunduğu bölgenin iklimine ve toprak yapısına adaptasyonu çok fazla olan bu türün 600' ü aşkın çeşitleri bulunmaktadır [6]. Ayrıca Anadolu, *Pyrus* türlerinden *P. elaeagrifolia* (ahlat), *P. salicifolia*, *P. amygdaliformis*, *P. elagrifolia*, *P. syriaca* ve *P. salicifolia* türlerinin de anavatanı olarak bilinmektedir [12,13] ve bu türler kendiliğinden veya aşılansarak yetiştirilmiştir [8].

Pyrus communis türü ülkemizde de yaygın olarak yetiştirilmektedir ayrıca *Pyrus communis* ssp. *sativa* ve *Pyrus amygdaliformis*; Çanakkale, Balıkesir, İzmir, Manisa, Aydın, Muğla, Uşak, Kütahya ve Antalya'da yetişmektedir.

Pyrus elaeagrifolia; Kütahya, Eskişehir, Bolu, İstanbul, Kastamonu, Sivas, Ankara, Antalya ve Kayseri, *Pyrus syriaca* ve *Pyrus hakkiarica*; Hakkari çevresinde, *Pyrus anatolica* Uşak, *Pyrus bulgarica* Tekirdağ ve Kırklareli, *Pyrus salicifolia*; Erzurum çevresinde, *Pyrus boissiriana*; Kars çevresinde yayılmıştır. Karadeniz bölgesinde yaygın olarak görülen armut türü *P. piraster*' dir [14]. Armutlarda tür, alt tür ve Yerel çeşitlerin belirlendiği birçok çalışma yapılmıştır [15].

Çizelge 2. 1. Dünya'da armut üretimi [16]

Ülkeler	Üretim (ton)
ÇİN	17 440 751
A.B.D	795 557
ARJANTİN	722 324
İTALYA	743 029
TÜRKİYE	461 826
İSPANYA	425 700
GÜNEY AFRİKA	343 203
HİNDİSTAN	340 000
HOLLANDA	327 000
JAPONYA	294 400
KORE	282 212
DÜNYA TOPLAM	25 203 753 62

Armutlar, meyve şekillerine ve olgunlaşma zamanlarına göre sınıflandırılmaktadır. Meyve şekillerine göre sınıflandırma yağ armutları, yarım yağ armutları, bergamot, yarı bergamot, yeşil uzun, sürahi, iri, paslı, misket, erimez, tarçın, uzun hoşaf, yuvarlak hoşaf, uzun şıra şeklinde olurken, olgunlaşma zamanlarına göre yazlık, güzlük ve kışlık çeşitler olarak sınıflandırılmaktadır [15].



Resim 2. 1.Armut bitkisi ve yaprakları

2.1.1. Armut Çeşitleri

Pyrus Amygdaliformis

Badem yapraklı armut olarak bilinen *Pyrus amygdaliformis*, Rosaceae ailesinden bir bitki türüdür [17]. Güney Avrupa, Akdeniz ve Batı Asya'ya özgü bir armut türüdür. 3-10 metre (9,8-32,8 ft) yüksekliğe kadar yetişir. Nisan-Mayıs aylarında beyaz renkli çiçekleri açar. Meyve acı ve buruk tada sahiptir. Bu tür *Pyrus communis* ve *Pyrus pyraeaster* türleri ile iyi melezleşir [18].

Pyrus Anatolica

Türkiye'de Uşak ilinde bulunan endemik bir armut türüdür.



Resim 2. 2. Pyrus Anatolica meyvesi ve yaprakları

Pyrus communis

Avrupa armudu ya da ortak armut olarak bilinen *Pyrus communis*, Orta ve Doğu Avrupa ve Güneybatı Asya'ya özgü yerli bir türüdür. Armut bahçeleri en çok Avrupa, Kuzey Amerika yetişen ve Avustralya'da geliştirilmiştir. Ilıman bölgelerde yetişen önemli meyvelerinden biridir [5].



Resim 2. 3. Pyrus communis çiçek ve yaprakları

Pyrus Elaeagrifolia

Pyrus elaeagrifolia (ahlat) , Anadolu'da yaygın olarak yetişen yabani bir armut türüdür. Genelde ahlat yaygın adıyla bilinir. Bazı yörelerde çakal armudu, çördük gibi yöresel isimleri de vardır. Ahlat, Anadolu'nun hemen her yerinde bulunan, bir ağaç türüdür. Kuraklığa ve hava kirliliğine dayanıklı bir türdür. Kurak yerlerde, orman açıklıklarında, antropojen bozkırlarda özellikle ormandan açılmış tarla içlerinde çeşitli alıç (*Crataegus*) türleriyle birliktemeyvesi ve gölgesi için bırakıldığı yerlerde yaygın olarak bulunur. Yetiştirme koşullarına bağlı olarak 3-10 metre arasında boylanabilen çoğunlukla ufak bir ağaçtır. Yaprakları dar, gri-yeşil yoğun tüylü ve tam kenarlıdır. Nisan ayında çiçek açar, meyvesi sonbaharda olgunlaşır. Meyvesi üç dört cm. çapında, oldukça buruk lezzettedir [5].



Resim 2. 4. Pyrus Elaeagrifolia meyve ve yaprakları

Pyrus nivalis

Genellikle kar armut olarak bilinen *Pyrus nivalis*, Batı Asya ve Güney-Doğu Avrupa'da doğal olarak yetişen bir armut türüdür. Hafif ekşi bir tadı vardır. Ağacı en fazla 10 metre yüksekliğinde ve yaklaşık 8 metre genişliğinde uzayabilir. Az su kaynağına, çok yüksek ya da düşük sıcaklıklara dayanabilen çok dayanıklı bir bitkidir [5].



Resim 2. 5. Pyrus nivalis meyve ve yaprakları

Pyrus salicifolia

Ortadoğu'ya özgü yerli armut bir türdür. Sarkık olmasından dolayı ağlayan armut gibi çeşitli isimleri vardır. Ağaç yüksekliği 10-12 metreye ulaşır. Söğüte çok benzer; sarkık gümüş yaprakları vardır. Çiçek tomurcukları kırmızı uçlu olmasına rağmen siyah-beyaz uçlu organlarındaki ile göze çarpar. Küçük yeşil meyveler sert ve ekşidir, yenmezler bu nedenle süs ağacı olarak dikilirler [5].



Resim 2. 6. Pyrus salicifolia meyve ve yaprakları

Pyrus serikensis

Serik armudu veya halk arasında ‘Zingit’ veya ‘Gurmut’ olarak adlandırılmaktadır. Ülkemizde sınırlı yayılışa sahip olan Zingit’in (Serik Armudu) taksonomik durumu 1994 yılında yeniden değerlendirilerek Prof. Dr. Adil Güner ve Prof. Dr. Hayri Duman tarafından ayrı bir tür olduğu belirtilerek literatüre “*Pyrus serikensis*” adıyla geçirilmiştir. Türün neslinin tükenmekte olduğunun fark edilmiş olması sonucunda, 1990 yılında Bakanlar Kurulu ile “Belek Özel Koruma Bölgesi” olarak ilan edilen 11200 hektarlık alanda koruma altına alınmıştır. Serik armudu Ülkemizde nesli tehlikede olan endemik bir türdür. Ağaç ya da çalı formunda 10 m’ye kadar boylanabilen bu bitki genellikle tarla ve yol kenarları ile dere ve kanal boylarında 150 m’ye kadar rakımlarda dağınık halde bulunurlar [5].



Resim 2. 7. *Pyrus serikensis* meyve ve yaprakları

Pyrus syriaca

Suriye armudu, Rose ailesinin yaprak döken bir armut türüdür. Genellikle Akdeniz maki, Celile ve Golan toprak cinslerinde yetişir. Ağacı Mart ve Nisan aylarında beyaz çiçekler açar. Meyvesi Eylül ve Ekim aylarında olgunlaşır [5].



Resim 2. 8. *Pyrus sriaca* meyve ve yaprakları

2.2.Arbutin

Arbutin (4-hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside) bir p- glycosylated hydroquinone dur. Arbutin ilk olarak 1881 yılında Schiff ve Michael 1882 yılında Macbeth ve Mackay tarafından doğal kaynaklardan izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Pek çok bitki türünün yapraklarında çok yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur. Örneğin *Arctostaphylos uva-ursi* (bearberry) yapraklarında (% 7) [19] ve *Vaccinium vitis-idaea* (cowberry) [20] gibi diğer bitkilerde de bulunur.

Arctostaphylos uva-ursi (bearberry), arbutin varlığı nedeniyle olan onun idrar söktürücü ve idrar antiseptik özellikleri geleneksel tıpta kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir. Arbutinin aglikonu hidrokinon anında kuruyan tutkalın üretiminde güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle endüstriyel olarak kullanılır.

Arbutin ve onun metaboliti hidrokinon *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* un in-vitro gelişimini engellediği rapor edilmiştir [21]. Alımından sonra, arbutin hydroquinone metabolitini vermek üzere, bağırsak florasında hidrolize edilir. Daha sonra emilir ve glukoronati ve sülfat esterleri idrarla atılır [20].

İdrar alkali (pH 8) iken bu aktif hidrokinon türevleri idrar mukoza üzerinde bir antiseptik ve sıkılaştırıcı etki gösterirler. Ureaplasma urealyticum ve Mycoplasma hominise karşı önleyici büyüme etkinliği de rapor edilmiştir.

Ayrıca Arbutin biraz antitüsif etkiye de sahiptir: ağızdan alınan 50-100 mg/kg vücut ağırlığı dozu öksürük ataklarını ve sıklığını büyük oranda azaltmıştır. Arbutin ayrıca melanin sentezini engelleyerek kozmetik preparatlarda renk giderici (cilt beyazlatma) ajan olarak kullanılır [22]. Özellikle Asya ülkelerinde kozmetik ürünlerde cilt beyazlatma ajanı olarak kullanılmasına rağmen, bu uygulama çok tartışmalıdır. Kozmetik ürünlerinde arbutinin kullanımını uzun süreli stabilitesinin belirsizliği ve sonuçta toksik olması nedeniyle Avrupa Birliği ülkelerinde henüz onaylanmamıştır.

Arbutin içeren ilaçlar, başta cilt kanseri tedavisi olmak üzere; idrar yolları enfeksiyonlarının tedavisi, böbrek taşı tedavisi, yetişkinlerin cildinde görülen çil ve lekelerin tedavisi, yaşlılıktan ve ozon tabakasının delinmesinden kaynaklanan lekelerin tedavisinde cilt beyazlatma ajanı olarak kullanılır. Arbutin, doğal buğday, armut derileri ve yaban mersini ve kızcık yapraklarında bulunur ve idrarla atılan ürünün çoğu hidrokinon üretmek için vücut tarafından metabolize edilir. Arbutin lokal uygulanması en az düzeyde sistemik emilimi ile melanin üretimini inhibe eder [23].

2.2.1.Tarihi ve Önemi

Arbutin ayı üzümü (Arctostaphylos UVA ursi) gibi, bitki yapraklarından ekstre aktif bir bileşendir. Tarihsel, özü bir idrar söktürücü olarak ve idrar yolu enfeksiyonları, sistit ve böbrek taşları tedavisi için kullanılmıştır [24]. Arbutin hidrokinon, antimikrobiyal, sıkılaştırıcı bir fenolik madde ve dezenfekte edici özelliklerine vücutta dönüştürülür [24]. Topikal hidrokinon hiperpigmentasyon için ortak bir tedavi yöntemidir. Arbutin glikosile benzokuinon olduğu kabul edilir.

Çünkü bu hidrokinon hiperpigmentasyon koşullarında etkili olmayan fenolik madde olarak dönüştürür. 1990 yılında, hidrokinon toksisite uva-ursi özleri diyet olmayan reçete sözlü ilaçlar ve / adet diüretik ürünlerin men edilmesi istenir [24,25].

2.2.2.Uygulamaları

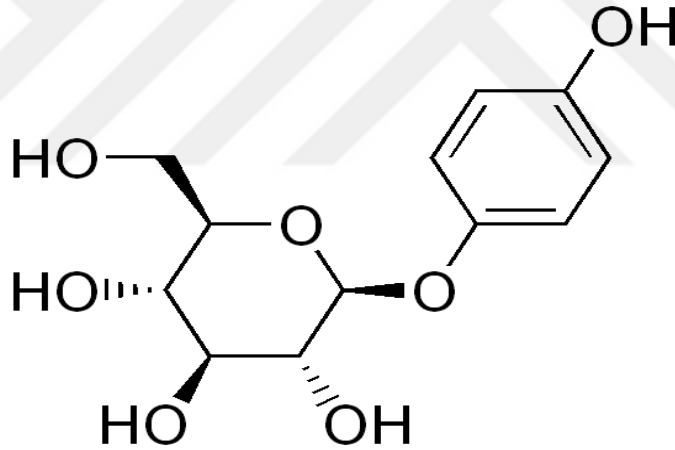
Arbutin renkli fotoğraf, diüretikler, üriner sistem için anti-enfeksiyon için bir stabilize edici olarak kullanılır ve deri aydınlatıcı madde olarak faydalıdır. Arbutin melanin oluşumunu inhibe hidrokinon gibi benzer etkilere sahiptir.

2.2.3.Kimyasal özelliği

Kimyasal adı: arbutin, arbutin veya hidrokinon beta-D-glukopiranosid

Moleküler formül: hidrokinon hidrolize edilir Glucosulated hidrokinon (eter ve glikosit her ikisi).

Moleküler formül: $C_{12}H_{16}O_7$



Resim 2.2. 1. Arbutin yapısı

Arbutin takviyeleri veya formülasyonlar eklenen suda çözülebilir olan beyaz bir kristal tozudur. Arbutin bu tür çaylar ve kapsüller gibi bitkisel ilaçlar, içinde uva-ursi bitkisinden bir ezilmiş yaprak veya toz olarak mevcuttur.

Arbutin de ticari olarak acetobromglucose ve hidrokinon arasından, ya da fosfor oksiklorürün mevcudiyetinde beta-D-glikoz pentaasetat ve hydroquinonemonobenzyl eter reaksiyonundan sentezlenebilir [25].

2.2.4.Genel Üretim Süreci

Armut özü, tirozin, oksidasyon reaksiyonları melanin oluşumunu engellemeye yardımcı olmak için bir indirgeyici ile birleştirilmiştir. Diğer tirozinaz inhibitörleri gibi portakal özü, limon özü ve salatalık özü gibi tamamlayıcı malzemeler ile birlikte hipoalerjenik asit, laktik asit, eritromisin eklenerek formülasyon olmasına yardımcı olunabilir.

2.2.5.Mevcut Formülasyonlar

Arbutin cilt ağartıcı kremler ve serumlar dahildir. Örneğin retinol ve alfa hidroksi asitler gibi diğer maddeler dermal katmanlarına arbutin penetrasyonunu arttırmak üzere eklenebilir [25].

2.2.6.Biyolojik Aktivite

Sistemik arbutin mide-bağırsak yolunda absorbe edilir ve biyo elde edilebilir hidrokinon haline dönüştürülür. Hidrokinon, böylece melanin DOPA dönüşüm azaltarak melanin üretimini etkileyen enzim tirozinazı inhibe eder [24]. Enzim inhibisyonu melanozomların ve melanosit yıkımını destekler. Arbutin lokal uygulanması daha yüksek konsantrasyonlarda daha az toksisite ve tahriş ile hidrokinon lokalize bir etki sağlar. Çalışmalar arbutin tirozinaz aktivitesi ve melanositlerde melanin içeriğinin bir doza-bağlı düşüşü ürettiğini göstermiştir [25,26].

2.2.7.Kullanıldığı Bazı Alanlar

2.2.7.1. Hiperpigmentasyon

Arbutin post inflamatuvar hiperpigmentasyon ve etkili hiperaktif mesane ile karakterize dolaşan pislikleri temizleyip tedavi etmek için kullanılır. [25].

2.2.7.2.Yaş Lekeleri

Lentigolarda kalıcı karaciğer lekeleri, yaşlılık lekeleri ya da güneş lekeleri olarak bilinen benekler derinin pigment bozukluğu nedeniyle oluşur. Arbutinin topikal uygulanması sonucunda zamanla biriken melanin içeriğinin bozulmasını önlenir [27].



Resim 2.2. 2 Yaş lekeleri

2.2.7.3. Melazma ve Chloasma

Melazma genellikle geniş hormonal değişimler nedeniyle hamile kadınlarda tecelli eder. Arbutin içeren jelle tedavi klinik çalışmalarda, hastaların pigment yoğunluğunda önemli bir düşüş sergilenmiştir [27].

2.2.7.4.Çiller

Çiller açık tenli bireylerde daha çok görülen, baskın konsantre melanin kümeleri olarak tanımlanan cilt lekeleridir. Formasyonu ve renk yoğunluğu melanositler tarafından melanin üretimini uyarır ve UVB tarafından tetiklenebilir. Arbutin melanosit aktivitesini inhibe eder ve keratojen tabaka melanin içeriğinin bozulmasına desteklemeye yarar [27].



Resim 2.2. 3. Çiller

2.3.EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Nitel ve nicel analiz, bir örnek hazırlama işlemine karar verici bir etkidir. Ekstraksiyon basamağı, çoğu analitik işlemlerin vazgeçilmez bir parçasıdır. 1879 yılında F. Soxhlet tarafından geliştirilen ve 1980'lerin ortalarına kadar çok popüler olan Soxhlet ekstraksiyonu günümüzde hala rutin laboratuvarların çoğunda kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişmiş ekstraksiyon tekniklerine artan bir talep olmuştur. Bunun nedeni, otomasyona uygun olması, ekstraksiyon zamanının kısalması, organik solvent tüketiminin azalması, analitik laboratuvarlarında kirliliğin önlenmesi ve örnek hazırlama maliyetindeki azalmadır [29,30].

Yeni teknolojilerin gelişimine paralel olarak, ekstraksiyon prensiplerinin temel anlayışı ilerlemiştir. Bu ilerleme, örnek hazırlamada yeni yönelimlere yol açmıştır. Bunlar, mikroekstraksiyon, minyatürleştirme ve analitik işlemlerde kullanılan örnekleme, ayırma ve kantitasyon basamaklarının entegrasyonudur [31]. Bu yüzden örnek hazırlamada, klasik ekstraksiyon tekniklerinin yerini mikrodalga-destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu (veya hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu), sonikasyon-destekli sıvı ekstraksiyonu gibi teknikler almıştır. Bu teknikler arasındaki benzerlik, ekstraksiyon olayının hızını önemli ölçüde artıran, yüksek sıcaklık ve basınçta çalışma olasılığıdır.

2.3.1.Örnek Önışlemleri

Bir örneğin analizi; örnekleme, örnek hazırlama, örnek analizi ve veri işleme olmak üzere dört farklı basamaktan oluşur. Örnek önışlemleri, modern analitik metodolojinin örnek hazırlama basamağında önemli bir rol oynar ve örnekleme ile birlikte anahtar basamaklardan birisidir. Aynı zamanda, analizin en fazla hataya eğilimi olan kısmıdır. Örnek önışleminin amacı, ilgilenilen analitleri matriksten izole etmek ve analizin seçiciliğini, tayin edilebilirliğini, güvenilirliğini, doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini artırmaktır.

Örnek hazırlama, kirli olarak adlandırılan kompleks örnekler için çoğunlukla temizleme işlemlerini içerir. Buna ilaveten, genellikle analitlerin analitik yöntem tarafından ölçülebilen uygun seviyeye zenginleştirilmesi gereklidir. Gerekli örnek hazırlama, örneğin doğasına ve kullanılan analitik metoda bağlıdır. Örnek matrisleri, organik veya inorganik olarak sınıflandırılabilir ve katı, sıvı veya gaz şeklinde alt gruplara ayrılabilir. Örneğin homojenizasyonu ve kurutması, genelde örnek işleminin ilk basamaklarıdır. Bir sonraki örnek ön işlem basamağı genellikle ekstraksiyondur [32].

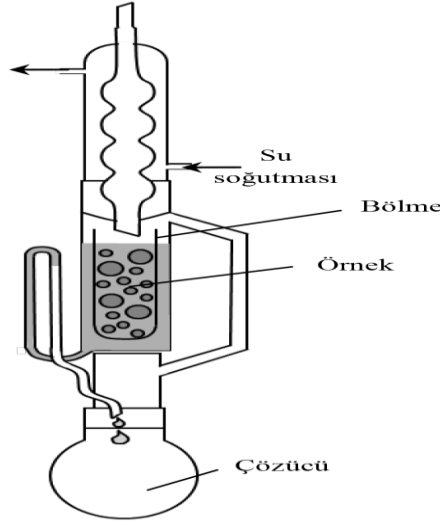
Çizelge 2.3. 1. En yaygın kullanılan örnek ön işlem teknikleri

Yöntem	Örnek tipi
Tartma	Tartma Sıvı, katı
Kurutma	Gaz, sıvı, katı
Fitrasyon	Sıvı
pH ayarlama	Sıvı
Homojenizasyon	Katı
Öğütme (Grinding)	Katı
Çöktürme	Biyolojik örnekler
Karıştırma	Gaz, sıvı, katı
Özümseme (Digestion)	Katı biyolojik örnekler
Hücre parçalanması (cell disruption)	Katı, sıvı biyolojik örnekler
Diyaliz	Sıvı
Ultrafiltrasyon	Sıvı

2.3.2.Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu özel bir cihazda gerçekleştirilir (Şekil 2.3.1.). Katı veya yarı-katı numuneler için uygundur. Soxhlet ekstraktörü, en eski ekstraksiyon sistemlerinden biridir ve hala geniş ölçüde kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü, bir solvent şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden meydana gelmiştir. Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölgesinin içine yerleştirilir. Solvent bunun altındaki solvent şişesinin içine konur. Solvent kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır ve kaynayan solventten gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu kondansatöre hareket eder; yoğunlaşır, örneğe doğru damlar. Solvent örneği ıslatır ve daha sonra solvent seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, solvent tüm örnek bölgesini boşaltarak, solvent şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak solvent birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur.

Ekstrakte olan analitler solvent şişesinin içinde kalırken, yalnızca temiz solvent buharlaştığından, her dolaşımında taze solvent kullanılır. Çevrim sayısını ve ekstraksiyon zamanını rapor etmek daha iyi bir karşılaştırma için önemlidir. Tipik ekstraksiyon zamanları 6 saatten 24 saate kadardır ve oldukça büyük solvent hacimleri (100-500 mL) gereklidir. Ekstraksiyon solventleri genellikle saf organik solventler veya bunların karışımlarıdır. Soxhlet ekstraksiyonu, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonunda kullanılır. Bileşikler, solventin kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır. Eşzamanlı ekstraksiyona izin veren Soxhlet cihazı çok düşük maliyetle temin edilebilir. Yöntemin kullanılması esnasında karşılaşılan problemler örnek bölgesinin temizliğinden kaynaklı olabilir. Kullanmadan önce, temiz bir solventle ekstrakte ederek temizlemek en iyisidir [32].



Resim 2.3. 1. Soxhlet ekstraktör cihazı

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonu bazı cazip avantajlara sahiptir. Örnek, sürekli olarak taze solvent ile temas halindedir. Böylece matriksten analitin uzaklaştırılması artar. Distilasyon balonuna uygulanan ısıyla, ekstraksiyon kavitesine ulaşıldığından, sistemin sıcaklığı oda sıcaklığından daha yüksek olur. Sistem bu yüksek sıcaklıkta değişmeden kalır.

Ayrıca, özütlemeyen sonra filtrasyona gerek kalmaz ve örnekten üretilen madde miktarı, birkaç eşzamanlı ekstraksiyon paralel olarak gerçekleştirilerek artırılabilir. Düşük maliyetli basit ekipman kullanılması buna olanak sağlar. Dahası, Soxhlet ekstraksiyonu az uğraş gerektiren çok basit bir metodolojidir. En son kullanılan alternatiflerinin çoğundan (mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu gibi) daha fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilebilir [33,34].

Soxhlet ekstraksiyonunun diğer katı örnek hazırlama teknikleriyle karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları, uzun zaman gerektirmesi ve büyük miktarda organik solvent kullanmasıdır. Çok miktarda solventin zararsız hale getirilmesi yalnızca pahalı değil, aynı zamanda çevresel problemlerin kaynağıdır. Örnekler genellikle solventin kaynama noktasında uzun süre ekstrakte edilir. Bu da termal olarak kararsız olan hedef türlerin bozunmasına yol açabilir.

Geleneksel Soxhlet cihazı, sürecin hızlanmasına yardımcı olan çalkalama sağlamaz. Büyük miktarlarda solvent kullanıldığından, ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağı zorunludur. Soxhlet tekniği solvent seçiciliği ile sınırlıdır ve otomasyonu zordur [35,36].

Aynı temel prensibe dayanan Soxhlet ekstraktörlerinin modern versiyonları geliştirilmiştir. Bunlar, basınçlı Soxhlet ekstraksiyonu, otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyonu, ses dalgaları destekli Soxhlet ekstraksiyonu ve mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonudur. Soxhlet ekstraksiyonu yüzyıldan fazla zamandır avantajlarını kanıtlamıştır. Bu avantajlar çoğu eksikliklerin üstesinden gelmiştir. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

1. Basınçlı Soxhlet ekstraksiyonunda, örnek kartuşuna uygulanan basıncın artmasıyla, solventin katı örneğe nüfuz etmesi kolaylaşmıştır. Bunun sonucu ekstraksiyon zamanı kısalmış ve solvent hacmi de azalmıştır. Bununla beraber yüksek basınçta çalışmak, deneysel kurulumu zorlaştırmaktadır.

2. Otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan farklı özellikteki birkaç ticari ekstraktörün ortak paydası: ekstraksiyon süresini kısaltma, ekstraktant (ekstraksiyon yapan madde) hacmini azaltma ve birkaç örneğin eş zamanlı ekstraksiyonuna olanak sağlamaktır. Bu cihazların en önemli kusuru yüksek maliyet ve çok yönlü olmamasıdır.

3. Dış enerjilerle ekstraksiyonun desteklenmesi (ultrasonik enerji ve mikrodalga kullanımı) Soxhlet ekstraksiyonunun eksiklerinin giderilmesi için en iyi alternatiftir [35].

2.3.2.1.Uygulamaları

Soxhlet ekstraksiyonu hem çevresel analizlerde, hem de gıda analizlerinde uygulanmıştır. Falandysz ve arkadaşları balıkta poliklorlu bifenilleri tayin etmişlerdir. Balıkların kas dokuları alınmış ve homojenize edilmiştir. Petri kaplarında dondurulmuş ve liyofilize edildikten sonra hekzan ile Soxhlet cihazının gelişmiş bir versiyonunda (Soxtec HT6) ekstrakte edilmiştir. Analiz gaz kromatografisi-elektron yakalama dedektöründe (GC-ECD) gerçekleştirilmiştir [37].

Diagne ve arkadaşları, Soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle fasülyeden organofosforlu bir insektisit olan fenitrotiyon kalıntılarını ekstrakte etmişlerdir [38]. 10 g örnek 24 saat boyunca 200 mL diklormetan ile solventin kaynama sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra uçurularak zenginleştirilen örnek yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve GC-ECD ile tayin edilmiştir.

2.3.3. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (Pressurized Liquid Extraction, PLE)

Ekstraksiyon için oldukça yeni bir tekniktir. Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu olarak da adlandırılır. Örneği sızdırmaz bir yüksek basınç ortamında tutarak, geleneksel solventler için daha yüksek sıcaklıklar kullanılmasına izin veren bir ekipman kullanır. Yükseltilmiş basınç, solventin daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde bulunmasını sağlar. PLE’de verim ve seçiciliği etkileyen kritik faktörlerden biri ekstraksiyon sırasında uygulanan sıcaklıktır.

Yüksek sıcaklıkların kullanımı, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekim gibi analit-örnek matriksi etkileşimlerinin bozulmasına yardımcı olarak ekstraksiyon verimini artırır [39]. Termal enerji kullanımı benzer moleküller arasındaki kohezyon ve farklı moleküller arasındaki adhezyon kuvvetlerinin üstesinden gelinmesine yardımcı olur. Bu durumda geribırakma (desorpsiyon) süreci için gerekli aktivasyon enerjisi azalır. Yükseltilmiş sıcaklık solventin, çözünenin ve matriksin yüzey gerilimini düşürür. Bu yüzden örneğin ıslanması artar. Solvent yüzey geriliminde azalma, solvent kavitesinin daha kolay oluşmasını sağlar. Böylece analitlerin solventte daha hızlı çözünmesine izin verilir [40].

Artan sıcaklık sıvı solventin viskozitesini azaltır ve matriks partiküllerinin içine girmesini kolaylaştırır. Sıcaklık, güçlü analit ve matriks etkileşimlerinin bozulmasına yardım eder ve denge zamanını kısaltan difüzyon hızlarını artırır. Bu durum özellikle difüzyon kontrollü örneklerde daha hızlı ekstraksiyonlara izin verir. PLE’nin temel özelliği, gerekli solvent miktarını önemli ölçüde azaltırken, ekstraksiyon sürecinin hızını artıran yüksek difüzyon sıvıları kullanmasıdır [41].

Yükseltilmiş sıcaklık nedeniyle ekstraksiyon kinetiği de daha hızlıdır. PLE'nin amacı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanarak sıvı ekstraksiyonunu geliştirmektir. Yüksek sıcaklık ve basınç, solventin örnek matriksinin içine nüfuz etme kabiliyetini artırır.

Genellikle ekstraksiyon, solventin atmosferik kaynama noktasının üstündeki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Analitlerin yayılma gücü ve çözünürlüğü, artan sıcaklıkla artmaktadır. Bu ekstraksiyonu daha hızlı ve daha etkin yapmaktadır [39,42]. Ekstraksiyon sırasında uygulanan basıncın temel avantajı, sıcaklık kaynama noktasının üzerine çıksa bile solventin sıvı durumunda kalmasıdır. Ekstraksiyon esnasında yüksek basınç, solventin analite ulaşmasını engelleyen, matrikste bulunan hava kabarcıkları ile ilgili problemleri kontrol eder. Bu koşullar analitin çözünürlüğünü ve matriksten desorpsiyon kinetiğini artırır [43].

Bu yüzden tüm süreç Soxhlet ekstraksiyonundan daha hızlıdır. Isıtma sonrasında ekstraksiyon hücresi, solventin normal kaynama sıcaklığının altına kadar soğutulur. Daha sonra hücreye yüksek basınç uygulanır. Bu basınç, solvent ve ekstrakte edilen materyali bir filtreden geçerek dışarıya çıkmaya zorlar. Ekstraksiyon kinetiğini artıran 200°C'ye kadar yükseltilmiş sıcaklıkların kullanılmasından dolayı, solventin kaynamasını önlemek için 20 MPa kadar basınç gereklidir. Gerekli solvent miktarı, geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan miktardan daha azdır [44].

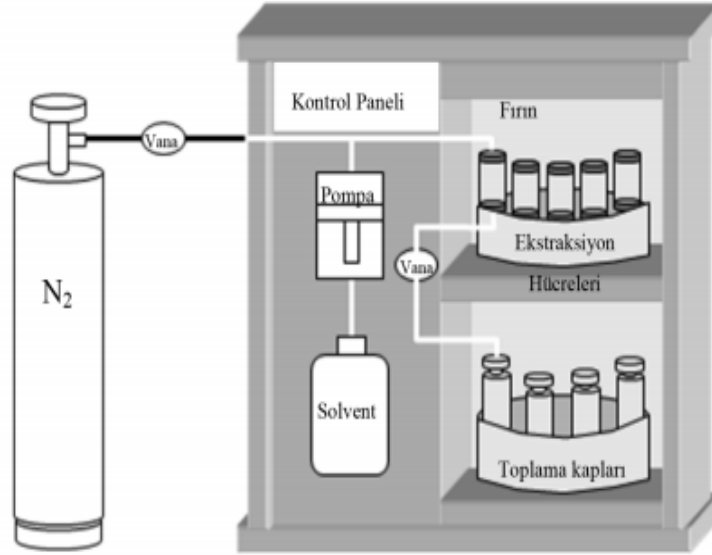
PLE'nin sınırlaması, ısıl kararlı olmayan örnekler için uygun olmamasıdır [44]. Bununla birlikte olası en yüksek sıcaklık ve basınç, mutlaka en yüksek verimle sonuçlanmaz. Bozucu etki de yapabilir. Ayrıca ekstraksiyon verimini etkileyen birkaç değişken daha vardır. Bunlar; ekstraksiyon zamanı, solvent seçimi, solvent hacmi ve yüklenen örnek miktarıdır. Orijinal örneğin bileşimine (organik bileşim, su içeriği, partikül boyutu ve heterojenite) ek olarak, örnek ön hazırlama teknikleri de (kurutma, öğütme gibi) sonucu etkileyebilir [45].

PLE statik modda, dinamik modda veya bunların kombinasyonu ile gerçekleştirilebilir. Dinamik modda, solvent örneğin içinden akar. Statik basınçlı sıvı ekstraksiyonu manuel olarak kapalı bir kaptaki gerçekleştirilebilir. Fakat ekstraksiyon daha çok otomatik bir enstrümanla gerçekleştirilir. Tipik bir PLE sistemi, bir fırın, ekstraksiyon hücresi, pompa ve basınç altında tutan sistem, birkaç vana ve toplama kaplarından oluşur [46].

Statik ekstraksiyon modu şu basamakları içerir:

1. Ekstraksiyon hücresine örneğin yüklenmesi
2. Hücrenin organik solvent ile doldurulması
3. Hücrenin sıcaklık ve basıncının ayarlanması
4. Örneğin belirli bir zaman ekstrakte edilmesi
5. Basıncın serbest bırakılarak solventin toplama kabına transfer edilmesi. Tüm ekstraktın toplama kaplarına ulaşmasını sağlamak için hücrenin temiz solventle yıkanması
6. Uygun bir gaz kullanarak örnekten solvent atıklarının temizlenmesi

PLE sisteminde toplanan hacim miktarı hücre büyüklüğüne bağlıdır. 10-100 mL arasında olabilir. Bu yüzden son ekstraktı deriştirmek için buharlaştırma basamağı gereklidir [46].



Resim 2.3 2. PLE sistemi

Örnek ekstraksiyon hücresine yüklenmeden önce, genellikle önışlem uygulanır. Toprak ve benzeri matriclere hava ile kurutma (24-48 saat) ya da dondurarak kurutma uygulanır [47,48]. Örneğin kurutulması önemlidir. Çünkü matricteki su ekstraksiyon verimini düşürür. Soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, yüksek miktarda suyla başa çıkmak için örneğe sodyum sülfat eklenmesi önerilmiştir [49,50]. Kurutma basamağını çoğunlukla eleme (2 mm elek) 22 veya örneğin 100-1000 µm aralığında bir boyuta öğütülmesi izler [32]. Örneğin daha küçük boyutlara öğütülmesi (<15µm), kısaltılmış difüzyon yol uzunluğundan dolayı analitin partikül yüzeyine taşınmasını kolaylaştırmada avantaj sağlayabilir [45].

Ekstraksiyon verimi, örnek matricinin doğasına, ekstrakte edilen analite ve analitin matric içindeki yerine bağlıdır. Heterojen örneklerin ekstraksiyon süreci Pawliszyn tarafından 2003 yılında bir model çizilerek açıklanmıştır [12]. Bu model örnek partikülünün gözenekli ve bir organik katman tarafından sarıldığını varsaymıştır. Ekstraksiyon ve analitin örnek matricinden geri kazanımı birkaç basamakta belirtilebilir. İlk olarak analitin ekstraksiyon kabından uzaklaştırılabilmesi için, bileşik örnek matricindeki etkin bölgelerden geri bırakılır. Daha sonra matric sıvı arayüzeyine ulaşabilmek için, matricin organik kısmına doğru difüze olur. Bu safhada analit, ekstraksiyon fazına dağılır. Sonra porların içinde bulunan ekstraksiyon fazı arasından difüze olur ve taşınım yoluyla ekstraksiyon fazı kısmına ulaşır. Ekstraksiyon sürecinin son aşaması ekstrakte edilen analitin toplanmasıdır [31,46].

Ekstraksiyon sürecindeki kritik bir basamak, analitin örnek matrici içindeki pozisyonudur. Beş farklı pozisyon olduğu varsayılmıştır.

1. Matric yüzeyine adsorbe olması
2. Bir solvent gözenğinde çözünmesi ve/veya yüzeye adsorbe olması
3. Matricin mikro/nano gözenğinde çözünmesi/adsorplanması
4. Matric kimyasal olarak bağlanması
5. Ekstraksiyon solventinde çözünmesi [31].

Ekstraksiyon sürecinde hız sınırlayıcı basamak ekstrakte edilen matriksin doğasına bağlıdır. Doğal tortu (sediment), toprak ve çamur örneklerinin çalışıldığı çevresel uygulamalarda, solut–matriks etkileşimlerinin üstesinden gelmek zor olduğundan, yüzeyden bırakma basamağı genellikle hız-sınırlayıcı basamaktır. Bitki materyallerinde hız-sınırlayıcı basamak daha yaygın olarak çözünme veya difüzyon basamaklarıdır [55,56].

2.3.3.1.Uygulamaları

PLE, katı ve yarı-katı örneklerin ekstraksiyonu için geliştirilmiş bir tekniktir. Örnekler genellikle toprak, tortu veya gıda örnekleridir. Çoğu durumda, PLE için organik solventler kullanılır. Kritik altı (subcritical) su ekstraksiyonu veya basınçlı sıcak su ekstraksiyonu olarak adlandırılan teknikte, suyun ekstraksiyon solvent olarak kullanılması da mümkündür. Bir solvent olarak suyun özellikleri, yüksek sıcaklıkta ve basınçta önemli ölçüde değişir. Gıda endüstrisinin polifenoller açısından değerli yan ürünlerinden biri, nar kabuklarıdır.

Geleneksel olarak bitki materyallerinden organik solventler yardımıyla (özellikle metanol) ekstrakte edilir. Çam ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada polifenollerin ekstraksiyonu için basınçlı su ekstraksiyonu araştırılmıştır [57]. Ekstraksiyon sonuçlarını etkileyen en önemli faktörlerin partikül boyutu, sıcaklık ve statik zaman olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, basınçlı su ekstraksiyonunun geleneksel metanol ekstraksiyonu kadar efektif olduğunu göstermektedir. Misel ortam gibi katkılar, sıvı ve çevresel örneklerden organik kirleticilerin ekstrakte edilmesi için alternatif olarak kullanılabilir [58]. Son zamanlarda, non-iyonik yüzey aktif çözeltiler alternatif bir solvent sistemi olarak kullanılmıştır [59].

Luthria ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada soya fasülyesinde isoflavonların ekstraksiyonu için sistematik bir çalışma gerçekleştirilmiştir [60]. Yedi farklı solvent karışımı değerlendirilmiştir: asetonitril-su; etanol-su; metanol-su; dimetilsülfoksit-etanol-su; dimetilsülfoksit-asetonitril; Genapol-su.

Bu değerlendirme altı farklı ekstraksiyon tekniği kullanılarak yapılmıştır: Çalkalama, vorteksleme, sonikasyon, karıştırma, Soxhlet ve PLE. Soya fasülyesi örneklerinden optimum geri kazanım dimetilsülfoksit–etanol–su (5:70:25, h/h/h) solvent karışımının kullanıldığı PLE yöntemi ile elde edilmiştir.

Zhu ve arkadaşları herbisitlerin topraktan ekstraksiyonunda, kuru topraklar için ekstraksiyon verimine basıncın az etkisi olduğunu gözlemişlerdir ve 100-150°C sıcaklıkta verimin arttığını bulmuşlardır [61]. Bununla birlikte toprağın nemli olması durumunda 500 psi'dan 1500 psi'ya artan basınç, pestisitlerin daha iyi çözünmesinden dolayı faydalıdır [62].

Bernal ve arkadaşları, sertifikalı patates, havuç, zeytinyağı ve liyofilize edilmiş balık doku örneklerindeki organoklorin pestisitleri ve poliklorlu bifenilleri tayin etmişlerdir. Örnekleri izole etmek için basınçlı-Soxhlet ekstraksiyonunu kullanmışlardır [63]. Bu uygulamada ekstraktant olarak CO₂ kullanılmıştır. CO₂'nin yoğunlaşması için ekstraksiyon sistemi, soğutucu su (0°C) pompalayan sıcaklık ayarlı banyo içine daldırılmıştır.

2.3.4.Mikrodalga-Destekli Solvent Ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction, MAE)

Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (300-300000 MHz). Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalga'nın direkt etkisi temeline dayanır. Çoğu uygulamalarda bu iki mekanizma eş zamanlı meydana gelir. İyonik iletim, bir manyetik alan uygulandığında iyonların elektroforetik göçüdür. Çözeltinin bu iyon akışına direnci friksiyon (sürtünme) ile sonuçlanır ve böylece çözelti ısınır. Dipol rotasyonu, uygulanan manyetik alanla dipollerin yeniden düzenlenmesi anlamına gelir. Ticari sistemlerde kullanılan 2450 MHz'de dipoller düzenlenir ve saniyede 4.9×10^9 defa rasgele dağılır. Bu zorlanmış moleküler hareket, ısınmayla sonuçlanır [30,46].

MAE’de mikrodalga ışıması, ekstraksiyon solventini ve böylece de örneği ısıtmak için kullanılır. Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun solvent seçimi çok önemlidir. Seçilen solventlerde mikrodalga ışımasını absorplaması, solventin matrisle etkileşimi ve analitin solventteki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. Daha büyük dipol momente sahip olan solvent, mikrodalga ışıması altında daha hızlı ısınacaktır. Örneğin hekzan gibi nonpolar bir solvent (dipol moment <0.1) ısınmayacak, oysa 2.69 dipol momente sahip aseton birkaç saniye içinde ısınacaktır [64].

Eğer ekstraksiyonda hekzan ve toluen gibi nonpolar solventler gerekliyse, solventleri su metanol ve aseton gibi yüksek bir dipol momente sahip polar solventlerle karıştırmak önerilir. Seçilen solvent çok kuvvetli ısınmaya neden olursa, bileşiklerin degradasyonundan kaçınılamaz. Bu yüzden yaygın uygulama, yalnızca biri mikrodalga ışımayı absorplayan ikili karışımların (örneğin hekzan-aseton, 1:1) kullanımınıdır [65].

Diğer önemli faktörlerden biri de, ekstraksiyon solventi ile ekstraktın analizinde kullanılan analitik metodun uyumluluğudur. Gaz kromatografik analizler için daha az polar solventler, sıvı kromatografik analiz ve immunoassay teknikler için daha polar solventler tercih edilir. MAE’nin seçiciliği üzerine çok az literatür rapor edilmiştir. Örneğin içindeki tüm maddeler ekstrakte edildiğinden seçici bir ekstraksiyon tekniği olduğu söylenemez ve hemen hemen her durumda ekstraksiyon sonrası temizleme basamağı gereklidir [64].

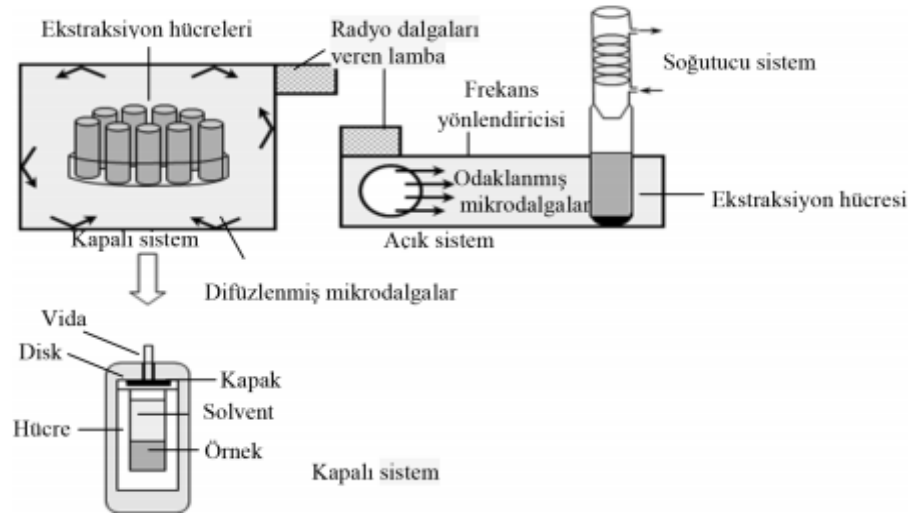
Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kaptaki gerçekleştirilir. Bu durumda basınç artar ve solvent kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ısıtılabilir. Çoğu solvent için (aseton, aseton-hekzan, diklormetan-aseton gibi) kabın içindeki sıcaklık, solventin kaynama noktasının 2-3 katıdır. Temel olarak iki tip MAE sistemi kullanılabilir: Kapalı kap sistemi (kontrollü sıcaklık ve basınç altında) ve açık kap sistemi (atmosfer sıcaklığında). Her iki sistem de (Şekil 2.3.3.)’de gösterilmiştir [66]. Kapalı kap sisteminde hücreler eşzamanlı olarak ısıtılırken, açık sistemde kaplar sıralı olarak ısıtılır.

Açık kaplarda sıcaklık solventin atmosferik basınçta kaynama noktasıyla sınırlıyken, kapalı kaplarda sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilir [67]. Kapalı kap sistemi uçucu bileşikler olması durumunda en uygun görünmektedir. Bununla birlikte, kapalı kaplarda, ekstraksiyon sonrasında kap açılmadan önce sıcaklığın düşmesini beklemek gereklidir. Bu ekstraksiyon süresini artırır (yaklaşık 20 dakika).

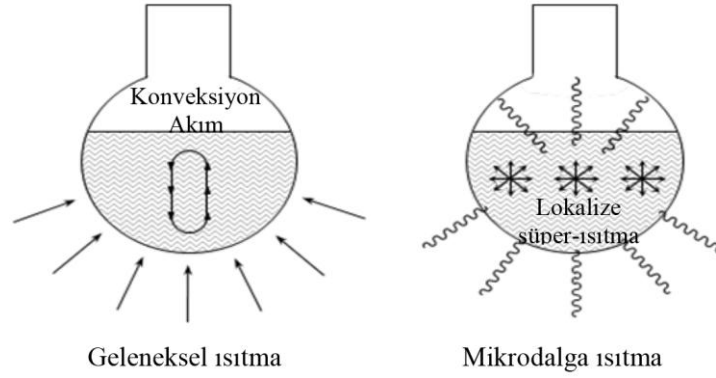
Her iki sistem ekstraksiyon verimlerine göre karşılaştırıldığında, toprak örneğinden poliaromatik hidrokarbonların ekstraksiyonunda, benzer performans göstermişlerdir [68]. Kapalı kap teknolojisi, PLE teknolojisiyle çok benzerdir. Her iki sistemde de solvent ısıtılır ve basınç uygulanır. Temel fark, ısıtmadır. Biri mikrodalga, diğeri geleneksel fırın ısıtmasıdır (Şekil 2.3.4) [59]. PLE’de, etkili parametrelerin sayısı azalır. Bu nedenle bu tekniğin uygulanması pratikte daha basittir.

Kullanılan ticari kapalı kap MAE sistemleri, bir manyetron tüp (çok kısa radyo dalgaları veren bir lamba), içinde döner bir tablada ekstraksiyon kaplarının bulunduğu fırın, sıcaklık ve basıncın kontrolü için izleme cihazları ve birkaç elektronik bileşenden oluşmaktadır.

Ekstraksiyon süreci, ekstraksiyon hücresine örneğin yüklenmesiyle başlar. Mikrodalga ışımı uygulanır ve solventi ayarlanan değerlere ısıtmak için, ön-ekstraksiyon basamağı başlatılır. Bu değerlere ulaşmak için gerekli zaman hem örnek sayısına hem de örnek türüne bağlıdır. Normal olarak ısıtma 2 dakikadan daha az bir zaman alır. Daha sonra örnek ışınlanır ve genellikle 10-30 dakika aralığında ekstrakte edilir [30].



Resim 2.3 .3. MAE’de kapalı ve açık sistem



Resim 2.3 4. Isıtma modelleri

2.3.4.1.Uygulamaları

MAE, sıvı örnekler için de uygun olmasına rağmen, tipik olarak katı örnekler için kullanılır. MAE uygun bir solvent seçimiyle, organik bileşikleri dekompoze etmek ve yükseltgemek için kullanılabilir. Ekstraksiyon genellikle 20-50 mL solvent gerektirir [32]. MAE genellikle çevresel analizlerde kullanılır.

Tortu ve toprak gibi matrislerden, poliaromatik hidrokarbonlar, polikloro bifeniller ve organoklorlu pestisitlerin ekstraksiyonları çalışılmıştır [70,71]. Zaman, sıcaklık, basınç ve nem içeriği gibi değişkenlerin ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmıştır. Çoğu çalışmada matris neminin ekstraksiyon verimini artırdığı bulunmuştur [30,69].

MAE gıda analizlerine de uygulanmıştır. Bouaid ve arkadaşları portakal kabuğunda atrazin ve dört organofosforlu pestisiti tayin etmişlerdir [72]. Ekstraksiyon hekzan/aseton (1:1) karışımında, 90°C sıcaklıkta, 10 dakikada ve 475 watt (w) mikrodalga gücünde yapılmıştır. Ekstraktlar gaz kromatografisi-azot-fosfor dedektör (GC-NPD) ile analiz edilmiştir. Papadakis ve arkadaşları, susam tohumlarında 16 organoklorin insektisitinin ekstraksiyonunu MAE ile gerçekleştirmişlerdir [73].

Solvent karışımı olarak su:asetonitrilin (5:95, v/v) kullanıldığı ekstraksiyon, 100°C sıcaklıkta, 10 dakikada gerçekleşmiştir. Ekstraksiyon basamağını, ekstraktın Florisil ile temizlenme basamağı ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analizi izlemiştir.

Franke ve arkadaşları serumdan ilaç ekstraksiyonunda mikrodalga ışımasını kullanmıştır ve sonuçları klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla karşılaştırmışlardır [74]. Model ilaç olarak lidokain, metadon, diazepam, nordiazepam, proksifen ve norproksifen test edilmiştir. Kantitasyon GC-NPD ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem birkaç adli vakaya başarıyla uygulanmıştır.

Desrosiers ve arkadaşları, iskelet dokularından ilaç (pentobarbital, ketamin, diazepam) ekstraksiyonu için MAE kullanmışlardır. Doku ekstraktları enzim-bağlı immunosorbent testi (ELISA) ile analiz edilmiştir [75].

Diğer bir uygulama alanı terpenler, alkaloidler, uçucu yağlar, karotenoidler gibi doğal ürünlerin ekstraksiyonudur. Paprikada renk pigmentleri ekstrakte edilmiştir.

Aseton-su (1:1, v/v) solvent karışımı kullanılarak elde edilen optimal koşullar; 120 saniye ekstraksiyon zamanı ve 50 W enerjidir. MAE koşullarında örnek sıcaklığı 60°C'nin altında tutulmuştur. Bunun nedeni daha yüksek sıcaklıkta ısıtma karotenoid moleküllerinin yeniden düzenlenmesine ve toplam karotenoid içeriğinde azalmaya neden olabilir. Hidrofobik karotenoidlerin daha hidrofilik bileşiklere yükseltgenmesiyle termooksidasyon da gerçekleşebilir [76].

Ayçiçeği tohumlarındaki pestisit atıklarının tayini için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak diklormetan solventiyle hızlı bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Ekstraksiyon verimini etkileyen mikrodalga gücü, ışınlama zamanı, ekstraktant hacmi ve devir sayısı optimize edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra orijinal ekstraktın lipid fraksiyonundan pestisit atıklarını izole etmek için, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve Florisil makro kolon kullanımıyla temizleme basamağı uygulanmıştır. Daha sonra örnek GC-MS sistemine enjekte edilmiştir [77].

Topraktan nitratlanmış polisiklik aromatik hidrokarbonların hızlı ekstraksiyonu için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu önerilmiştir. Işınlama gücü, zamanı, devir sayısı ve solvent hacmi, deneysel dizayn metodolojisi kullanılarak optimize edilmiştir. Nitro-poliaromatik hidrokarbonlar, amino-poliaromatik hidrokarbonlara indirgenmiştir. İndirgenmiş analitler heptaflorobutirik anhidrit ile türevlendirilmiş ve GC-ECD ile tayin edilmiştir [78].

2.3.5.Ses Dalgaları-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu (Sonication-Assisted Liquid Extraction, SAE)

Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon olarak da adlandırılır. Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar.

Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar [79]. Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır. Katı örneklerin ekstraksiyonu, dijesyonu ve bulamaç oluşumu işlemini destekler. Sıvı örneklerde ise, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, homojenizasyonu veya emülsiyon haline getirmeyi desteklemek için kullanılır [80].

Katı örneklerden analitlerin ekstraksiyonu, su banyosuna ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla veya prob (ultrasonik aygıtların ucunda bir alıcı bulunan hareketli kısmı) gibi diğer cihazlarla gerçekleştirilir [81]. En çok kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur [82]. Ayrıca örneklerin sonikasyonu için güçlü silindirik bir prob kullanan daha etkin bir sistem geliştirilmiştir [83].

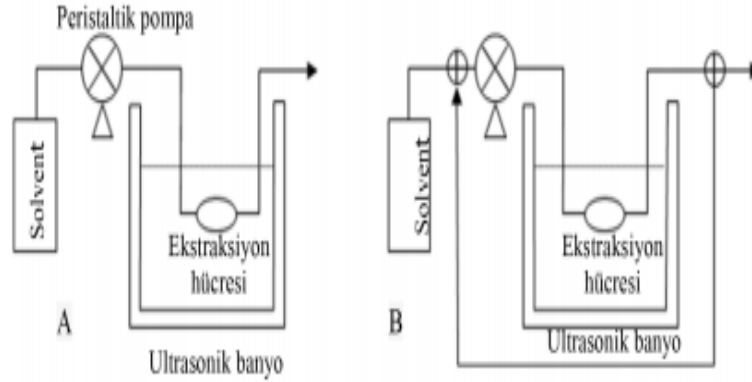
Banyo ve prob arasındaki seçim analizin gerekliliklerine bağlıdır. Eğer amaç toplam katı-sıvı ekstraksiyonu ise, etkili bir prob kullanımı daha iyi olabilir. Çünkü ekstraksiyon için gerekli zaman daha azdır. Bununla birlikte, çok sayıda örneğin ultrasonik banyo ile analiz edilmesi daha iyi bir seçenektir. Sonikasyon problemlerinin ultrasonik banyoya karşı kullanımı, enerji dağılımında homojeniteyi sağlar. Fakat ultrasonik uçlar daha pahalıdır, ömrü daha kısadır ve daha düşük sayıda örnek işlenmesine izin verir [80].

Ekstraksiyon verimini artırmak için solvent türü, sıcaklık ve sonikasyon genliği koşulları gibi farklı faktörleri optimize etmek gereklidir. Ekstraksiyon verimini etkileyen diğer parametreler; sonikasyon zamanı, örnek partikül boyutu, örnek miktarı ve kullanılan cihazdır.

Son zamanlarda, solvent miktarını azaltmayı sağlamak için analitik örnek hazırlama işlemlerine özel önem verilmektedir. Ultrason radyasyonunun ilginç bir uygulaması dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyondur.

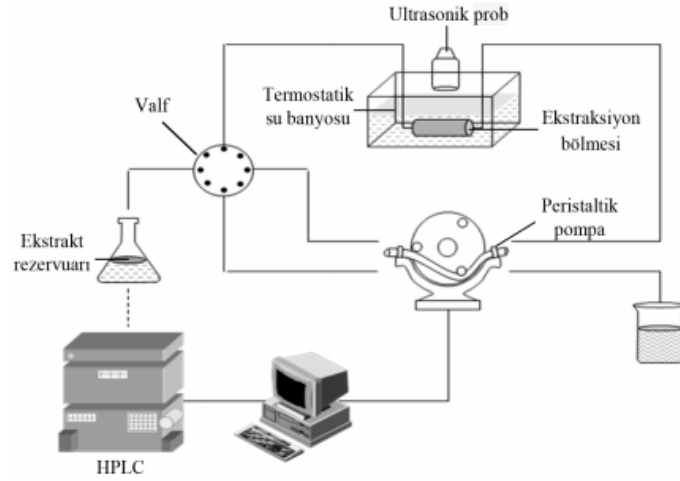
Burada numune ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi [84,85] veya ultrasonik problu bir su banyosu içine konulur. Bu sistem taze ekstraksiyon solventinin sürekli olarak örneğe pompalandığı, artan analit transferi olan açık bir sistem veya ekstraktın seyrelmesini engelleyen ekstraksiyon solventinin yeniden dolaştığı kapalı bir sistem olarak kullanılabilir (Şekil 2.3.5.) [80]. MAE sistemi gibi, SAE sistemi de statik veya dinamik bir sistem olabilir. Analitler katı matriksten solvante transfer olur olmaz uzaklaştığından, dinamik ekstraksiyon kullanımı daha avantajlıdır.

Diğer bir avantajı da, dinamik sistemde örneğin sürekli olarak taze solvante maruz kalmasıdır. Bu durum analitlerin örnek matriksinden solvante transferini artırır. Ekstraksiyon tipik olarak 20-200 mL solvent gerektirir ve ekstraksiyon zamanı 2 ila 20 dakika aralığındadır. Ayrıca, dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyon ile enstrümantal analiz yönteminin çevrim içi bağlanması mümkündür (Şekil 2.3.6.).



Resim 2.3 5. Dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi

A) Açık sistem B)Kapalı sistem



Resim 2.3.6. Dinamik ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonun analiz sistemine bağlanmasının şematik gösterimi

2.3.5.1.Uygulamaları

SAE sıvı ve katı örneklerin her ikisi için veya organik ya da inorganik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılabilir. Ses dalgaları organik bileşiklerin yükseltgenmesi veya ayrışmasında yardım için de kullanılabilir [44]. Sánchez-Brunete ve arkadaşları toprakta pestisitlerin tayini için küçük kolonlarda ses dalgaları- destekli ekstraksiyon olarak adlandırılan minyatürize edilmiş bir teknik geliştirmişlerdir [87]. Şekil 2.3.7'de toprak ekstraksiyonu şematik olarak gösterilmiştir.

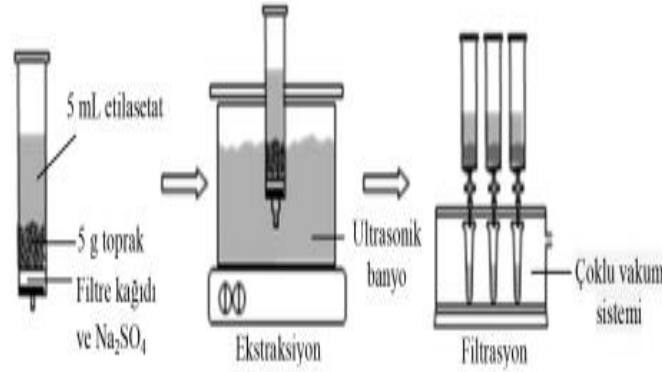
Bu teknik daha yüksek polaritedeki karbamat pestisitlerin ekstraksiyonuna uygulanmıştır. Ekstraksiyon solventi olarak, % 82 ile % 99 aralığında geri kazanım elde edilmesini sağlayan metanol seçilmiştir [88]. Son zamanlarda, farklı kimyasal sınıfta ve geniş polarite aralığında 50 pestisit eş zamanlı analizinde uygulanan bu yöntemde etil asetat ekstraksiyon solventi olarak kullanılmıştır.

Yüksek tekrarlanabilirlik ve düşük gözlenebilir limitleri elde edilmiştir [89]. Çizelge 2.3.2.'de toprakta SAE uygulanarak poliaromatik hidrokarbonların (PAH) tayini için geliştirilen birkaç analitik yöntem özetlenmiştir.

Ekstraksiyon genellikle ultrasonik banyoda gerçekleştirilmiştir. Toprakta antibiyotik, hormon gibi farmasötik bileşiklerin derişiminin tayin edilmesinde farklı SAE yöntemleri geliştirilmiştir (Çizelge 2.3.2.). Bu yöntemler gıdalarda pestisit kalıntılarının, poliaromatik hidrokarbonların, antibiyotiklerin, endüstriyel kirleticilerin, inorganik kirleticilerin tayininde kullanılmaktadır [94,97].

Ses dalgaları destekli Soxhlet ekstraksiyonu ayçiçeği, kolza ve soya fasülyesi tohumlarından toplam yağ içeriğini ekstrakte etmek için kullanılmıştır. 10 g örnek, selüloz ekstraksiyon kartuşüne yerleştirilmiştir. Kartuş, Soxhlet cihazına konulduktan sonra, cihaz 75°C sıcaklıktaki termostatlı su banyosu içine yerleştirilmiştir.

Kartuşa ses dalgaları uygulanmıştır. Ekstraksiyonda 100 mL n-hekzan kullanılmıştır. Örnek kartuşüne ses dalgaları uygulanması, yağın kantitatif ekstraksiyonu için gerekli Soxhlet ekstraksiyon çevrim sayısını çok büyük ölçüde azaltmış böylece ekstraksiyon zamanı geleneksel işlemlere kıyasla yarı yarıya azalmıştır [63].



Resim 2.3.7. Küçük kolonlarda ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi

Çizelge 2.3.2. Poliaromatik hidrokarbonların tayini için geliştirilen yöntemlerden bazıları

Tayin edilen PAH sayısı	Ses dalgaları-destekli ekstraksiyon koşulları				Temizleme	Tayin	Referans
	Solvent	Zaman (dk)	Sıcaklık (°C)	Tip			
16	Aseton	15*2	Oda Sıcaklığı	UB	SPE-C18 aseton	LC-FD LC-MS	61
16	EtOAc	15*2	Oda Sıcaklığı	UB		GC-MS	62
16	n-Hekzan-DCM (1:1, v/v)	10*3	Oda Sıcaklığı	UB	SPE-aluminyum: n-hexane-DCM (10:1,v/v)	GC-MS	63
16	DCM	75	Oda Sıcaklığı	UB	SPE-C18:aseton	LC-UV	64

UB: Ultrasonik banyo; EtOAc: Etilasetat; DCM: diklormetan

2.3.6.Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

SFE’de, ekstraksiyon sıvısı, kritik üstü haldedir. Süperkritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı üzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı üzerinde basınç uygulanan bir element, madde veya karışım olarak tanımlanır.

Bir süperkritik akışkan tek bir faz halinde bulunur (ne gaz ne de sıvıdır) ve basıncın veya sıcaklığın artmasıyla sıvılaştırılmaz veya buharlaştırılmaz. Bu yüzden süperkritik akışkan, bir gaz ve bir sıvı arasındaki maddenin ara formunu gösterir.

Sıvının gibi yüksek yoğunluk ve çözme gücü, gazın gibi düşük viskozite, sıfır yüzey gerilimi ve analitler için yüksek difüzyon hızına sahiptir. Daha yüksek difüzyon katsayıları ve düşük viskoziteleri nedeniyle, süperkritik akışkanların katı gözenekli materyallere nüfuz etmesi çok uygundur. Çözme ve yayılma gücü sıvılara göre daha fazla olduğundan, hızlı reaksiyon kinetiğine sahiptirler [102,103].

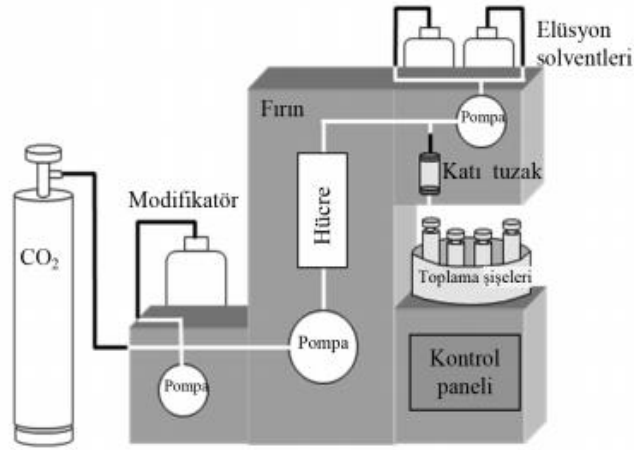
Normal sıvıların tersine, süperkritik akışkanlar sıkıştırılabilir ve bu yüzden yoğunlukları geniş bir aralıkta değiştirilebilir. Yoğunluk ve diğer özellikleri, sıcaklık ve basıncın ayarlanmasıyla kolaylıkla değiştirilebilir. Bu önemlidir, çünkü süperkritik akışkanının daha yüksek yoğunluğu, onun daha iyi çözme kabiliyeti anlamına gelmektedir. Yoğunlukla süperkritik akışkanlardaki maddelerin çözünürlüğü, sıvılardaki çözünürlüğünü geçer.

Süperkritik akışkan çeşitli örnek matrisleri için mükemmel bir ekstraksiyon ortamı oluşturur. Sıcaklık ve basınç değiştirilerek çözme gücüyle oynanmasıyla yüksek seçicilik de sağlanır [102]. SFE’de, akışkan sürekli olarak örnek içinden geçmeye zorlanır. Bu yüzden kantitatif veya tam bir ekstraksiyon sağlayabilir [104]. Süperkritik akışkan olarak genellikle düşük kritik sıcaklık ve basınca sahip olduğundan karbondioksit (Kritik koşulları = 30,9°C ve 73,8 bar) kullanılır.

Karbondioksit ayrıca toksik değildir, alev almaz ve oldukça ucuzdur. Nonpolar olduğundan, daha polar analitlerin ekstraksiyonunu artırmak için karbondioksite modifikatörler eklenir. Tipik modifikatörler metanol ve diklormetandır. SFE’de süperkritik akışkan üretimi, basınç, sıcaklık ve akış hızı kontrolü sağlayan bir cihazla gerçekleştirilir (Resim 2.3.8.) [46]. Genellikle ekstraksiyon dinamik moda uygulanır. Fakat statik veya statik/dinamik birleştirilmiş ekstraksiyon da uygulanabilir. Ekstrakt ya uygun bir solvent içinde veya katı-faz tuzağında (trap) toplanır. Ekstraksiyon 10-20 mL solvent gerektirir ve ekstraksiyon süresi 20-60 dakika aralığındadır.

Geleneksel yöntemlere göre belirgin avantajı kısa ekstraksiyon zamanı ve organik solventlerin az kullanımınıdır. Bazı çalışmalar 20-60 dakikalık SFE’nin, birkaç saatlik Soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek geri kazanımlar sağladığını göstermiştir [105,106]. Referans standart materyaller olan tortu ve kas dokusundan poliklorlu bifenillerin, SFE ve Soxhlet ekstraksiyonuyla tayini yapılarak yöntemlerin karşılaştırılması sağlanmıştır.

SFE ile poliklorlu bifenillerin tayininde ekstraksiyon süresi 18-24 saatten 50 dakikaya indirilmiş ve Soxhlet ekstraksiyonu ile 250 mL olan organik solvent kullanımı 7,5 mL ye düşürülmüştür [107]. Genelde, SFE katı örneklerden organik analitlerin ekstraksiyonu için kullanılır. Isısal olarak kararsız analitler için de uygundur.



Resim 2.3.8. SFE sistemi

2.3.6.1.Uygulamaları

SFE, çevresel, farmasötik, polimer ve gıda analizlerinde kullanılmaktadır. Ham sebze yağları gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. İstenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için tüketilmeden önce yağların rafine edilmesi gerekir. Saflaştırma süreci sırasında, yağdaki faydalı bileşikler de kaybolabilir. Buğday tanesi yağında [108]. preslenerek elde edilen yeşil kahve yağında [109], ham palmiye yağında [110] ilgilenilen bileşiklerle zenginleştirilmiş ekstraktlar elde etmek için alternatif bir saflaştırma metodu olarak SFE önerilmiştir.

Yeşil çaydan seçici olarak kafein ekstraksiyonunda yardımcı solvent olarak su ile süperkritik CO₂ kullanılmış ve matriksten antioksidanların ekstraksiyonu önlenmiştir [111]. Uçucu yağlar, yağ asitleri [112] ve/veya karotenoitler gibi biyoaktif bileşikler [113] meyve ve sebzelerden süperkritik CO₂ kullanarak ekstrakte edilmiştir. Daidzein ve genistein gibi izoflavonlar 350-500 bar arasındaki yüksek basınçlarda sulu metanol ve süperkritik CO₂ kullanılarak ekstrakte edilmişlerdir [114]. SFE'nin en ilginç uygulamalarından biri, genetik olarak değiştirilmiş farklı mısır ve soya türlerinde aminoasit ilişkisini belirlemede kullanılmasıdır.

Amino asitleri ekstrakte etmek için %35'lik metanol ile modifiye edilmiş süperkritik CO₂, 80°C sıcaklık ve 120 bar basınçta kullanılmıştır. Ekstraktlar GC-MS ile analiz edilmiştir [115]. SFE gıda endüstrisinde yan ürünleri değerlendirmede geniş ölçüde kullanılmaktadır. Yan ürünlerin ekstraksiyonu, yararlanılmayan fakat değerli bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlar.

SFE uzun zamandan beri bitki materyallerinden spesifik aktivite gösteren etkin bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılmaktadır. İnsan faaliyetlerinin çevreye etkisini belirlemek önemlidir ve toprak ile tortu bu etkinin önemli göstergeleridir. Miyawaki ve arkadaşları, toprak ve tortularda poliklor dibenzo-p-dioksin, poliklor dibenzofuran, poliklor bifenil ve dioksin tayini için hızlı bir strateji geliştirmişlerdir [125]. Tarımsal ve endüstriyel toprak örnekleri suyla modifiye edilmiş süperkritik CO₂ kullanarak 300 bar basınçta, 130°C sıcaklıkta ve 50 dakika süreyle ekstrakte edilmiştir.

Kirlilikler alumina ile doldurulmuş SPE kartuşu kullanılarak tuzaklanmış ve hekzan ile geri alınmıştır. Derişimler GC-MS ile belirlenmiştir. Klasik ekstraksiyon işlemleri ile 3 güne ihtiyaç duyulurken, SFE ile toplam analiz süresi 2 saate indirilmiştir.

2.4.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografik yöntemler, sabit faz ve hareketli faz arasında olan kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir. Bu yöntemlerden biri olan sıvı kromatografisi, 1900'lü yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça duyarlı bir yöntemdir (LC Applications).

Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı (analitler), yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi (resolution parameter), analitler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır ve önemlidir.

Sabit faz, kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Analitler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir [126].

2.4.1.HPLC Sistemleri

HPLC sistemi, Resim 2.4.1.'de de görüldüğü gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözünmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin kalbi, ayırmanın gerçekleştiği kolondur.

Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır [126].



Resim 2.4.1. Bir HPLC cihazı

2.4.2.Hareketli Faz

HPLC uygulamalarında hareketli faz (elüent) turu ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde birçok sürekli faz kullanılmasına rağmen, bunların bazı ortak özellikleri şunlardır; yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması, uygun fiyat.

Her bir HPLC türünde kullanılan sürekli fazlar birbirinden farklıdır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücüler sürekli faz olarak kullanılır [126].

2.4.3.Sabit Faz

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki partiküllerdir.

Temel adsorbent özellikleri şunlardır; 3-10 µm partikül boyutu, olabildiğince eş boyutlu, ortalamanın \pm % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımı, 70-300 Å gözenek boyutu, 50-250 m²/g yüzey alanı, yüzeye tutturulan ligand türüne bağlı olarak, adsorbent normal faz (-OH, -NH₂) veya ters faz (C₈, C₁₈, fenil) hatta anyon (NH₄) ya da katyon (COO-) değiştirici yapıda olabilir [127].

2.4.4. Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolon içerisine doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve sürekli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır.

Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da arttırılması gerekmektedir. Ancak küçük partiküller yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi bir takım avantajlara da sahiptir. Kararlı akış hızı pompalarda aranan bir özelliktir [126].

Modern pompalar aşağıdaki özelliklere sahiptir; 0,01-10 ml/dk arasında akış hızı, % 1'den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı. Bu akış hızı kararlılığı büyüklükçe ayırma kromatografisinde % 0,2'den az olmalıdır, 5000 psi'ya kadar çıkabilen maksimum basınç değeri olmalıdır.

2.4.5. Kolon

Tipik HPLC kolonları 10, 15, 25 cm uzunluğunda, küçük boyutlu partikül içeren (3,5 veya 10 μm) ve iç çapı 4, 4.6 ya da 7.8 mm olan yüksek basınca dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, sürekli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayan değerlerdir. Kolonun küçük çaptaki partiküllerle doldurulması ve verimli bir şekilde çalıştırılması deneyim, beceri ve özel cihazlar gerektiren bir çalışmadır. Bu yüzden çoğu HPLC kullanıcılarına hazır doldurulmuş kolonları kullanmaları önerilir [126].

2.4.6. Dedektör

Günümüzde kromatografik sistemlerde yaygın olarak kullanılan dedektör tipi optik dedektörlerdir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorpsiyonundan, floresans emisyonundan ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma sureleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorpsiyon dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190 nm'den 460-600 nm'ye kadar olan dalga boylarında örneğin analizinin yapılması mümkün olmaktadır.

Kullanılan diğer dedektör turleri içinde kırılma indisi (refractive index, RI), floresans (FL), elektrokimyasal (EC) ve kütle spektrometrik (mass-spectrometric, MS) dedektörler bulunmaktadır. RI dedektörleri yaygın olarak kullanılan ancak az hassasiyete sahip dedektörlerdir. FL ve EC, RI'ya göre daha hassas, ancak daha seçici dedektörlerdir. MS dedektörleri ise çok hassas, güçlü ancak pahalı ve karmaşık sistemlerdir [126].

İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır:

- ✓ Yüksek duyarlılık
- ✓ Hızlı tepki
- ✓ Düşük sinyal gürültüsü
- ✓ Minimum pik yayılması
- ✓ Ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı
- ✓ Çalışma kolaylığı ve genişliği

2.5. HPLC Türleri

Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın birçok yolu vardır. Eğer bu sınıflandırma sabit fazın yapısına ve ayırma prosesine göre yapılırsa, HPLC 4 farklı türde incelenebilir.

2.5.1. Normal Faz Kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC):

Bu türde sabit faz oldukça polar yapıda (örneğin silika jel), sürekli faz ise nheksan ya da tetrahidrofuran gibi apolar yapıdadır. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

2.5.2. Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC):

Normal faz kromatografisinin tam tersidir. Sabit faz apolar (hidrofobik), sürekli faz ise su ve asetonitril karışımı gibi polar yapıdadır. Burada apolar yapıdaki örnek bileşenleri kolonda daha uzun kalırlar.

2.5.3. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC):

Kolon, gözenek boyutu ve hacmi kontrol edilebilen partiküller ile doldurulur. Kolona enjekte edilen örnek içerisindeki bileşenler molekül büyüklüklerine göre kolondan filtre edilirler. Büyük moleküller hızlı bir şekilde kolondan ayrılırken, daha küçük moleküller partiküllerin gözeneklerine doğru difüzlenererek kolondan daha geç çıkarlar. Bu yöntemde jel geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) de denir.

2.5.4. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC):

Sabit faz, örnek bileşenleri üzerinde yer alan iyonik yapının tersi şeklinde yüklenmiştir. Bu sayede iyonik yapıda olan veya iyonlaşabilen örneklerin analizi ve ayrılması yapılmaktadır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşime giren bileşen kolondan daha geç çıkar. Etkileşim düştükçe alıkonma süresi azalır. Mobil faz sulu tampon çözeltileridir. pH ve iyonik şiddet alıkonma sürelerinin kontrolünde kullanılır.

HPLC’de kullanılan sürekli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır:

İzokratik Elüsyon: Kolona sabit bileşimdeki sürekli faz pompalanır. Sürekli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.

Gradient Elüsyonu: Sürekli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır [126].

2.6. HPLC Kullanım Alanları

Günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım amaçları kimyasal ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

Kimyasal Ayırma: HPLC’de kimyasal ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış suresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Yapılan kimyasal ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine bağlıdır.

Saflaştırma: Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir, bu ise ancak doğru bir mobil faz seçimiyle mümkündür. İstenilen maddenin kolondan çıkış suresi herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engelleyecek kadar kısa olması gereklidir.

Tanımlama: Bir maddenin HPLC ile tanımlanması HPLC analizlerinin önemli bir parçasını oluşturur. HPLC’de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma suresinin standarda ait alıkonma suresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullarda ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır.

Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış suresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış suresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir.

Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri mobil faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metot kullanılmalıdır.

Derişim Tayini: HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değışik konsantrasyonlarda HPLC’ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğeye geçirilir ve kalibrasyon grafiğı çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur [126].

2.7. Alıkonma Parametreleri

Kromatografik alıkonmayı öğrenmenin en kolay yolu, örneğin kolona enjekte edildiğı noktadan kolon boyunca ilerleyen bileşimin dedektörde verdiğı maksimum cevap arasındaki zamanı ölçmektir. Bu zamana alıkonma zamanı (retention time, t_R) denir. Alıkonma zamanı sürekli faz akış hızı ile ters orantılıdır.

Diğeri bir parametre alıkonma hacmidir (V_R). Alıkonma hacmi, bir bileşenin kolondan çıkması için gerekli olan elüent miktarıdır. Alıkonma suresi ve sürekli faz akış hızının çarpımına eşittir. Akışkanın hızına bağılı değildir, ancak partiküllerin geometrik şekli yani gözenek büyüklüğüne bağılıdır [126].

2.8. Bant Genişliğı

Bir kromatografik analiz sırasında örneğin sisteme enjekte edilmesinden sonra kolon içindeki akışkanın hareketi sırasında kromatografik piklerin aralığı genişler. Daha büyük kolon bant genişliğı, belli bir zaman aralığında daha az miktarda bileşenin ayrışması anlamına gelir. Başka bir deyişle piklerin keskinliğı kolon veriminin ne kadar iyi olduğunu gösterir. Kolonda bant genişlemesi üç ana sebepten kaynaklanır.

1. Kolon içinde ilerleyen bir bileşene ait molekül veya iyonların farklı yollarizlemesi: Bu parametre sürekli fazın akış hızından bağımsızdır. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması bu parametrenin etkisini azaltabilir.

2. Fazlar arasındaki kütle transferi etkisi: Bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma dengesine ulaşması için belirli bir süreye ihtiyaç vardır. Eğer akış hızı yüksekse ve örneğin kolona güçlü bir afinitesi varsa, hareketli fazdaki örnek sabit fazdaki örneğin önüne geçecektir.

Bu da dengenin tam olarak kurulamamasına yani bant genişlemesine neden olacaktır. Hareketli faz viskozitesi düşürmek ve kolon sıcaklığını arttırmak bu terimin etkisini azaltabilir.

3. Kolonda bileşenlerin yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru difüzyonla dağılması: Örnek konsantrasyonu kolon kenarlarında kolon merkezinde olduğundan daha düşüktür. Örnek kolon merkezinden dışarıya doğru difüzlenir. Bu etki düşük akış hızlarında daha da önem kazanır. Ayrıca bu parametre bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. Hareketli fazın akış hızını düşürmek örneğin kolonda daha az zaman harcamasına neden olur bu da difüzyonunun artması demektir. Ayrıca sıcaklığın düşürülmesi de bu etkiyi azaltıcı yönde etki yapar [126].

2.9.Kolon Verimliliği

Bir kromatografik analizde optimum bir ayırma gerçekleştirmek yani kolon veriminin en üst seviyede olduğunu göstermek için keskin ve simetrik piklerin eldesi şarttır. Kolon verimliliğini tayin edilirken pik genişliği, teorik tabaka sayısı, indirgenmiş plaka yüksekliği, seçicilik ve çözünürlük gibi parametreler göz önüne alınır.

Pikin genişliği, pikin keskinliğini ve kolon verimini gösterir. Bununla beraber pik genişliği kolonun uzunluğu, akış hızı ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametreden etkilenir. Aynı kolonda yapılan analizlerde akış hızı değiştirilebilecek tek parametre olduğundan, akış hızı kolon verimliliğinin en iyi olacağı değerde seçilmelidir.

Teorik tabaka sayısı; damıtma prosesindeki benzerlikten gelir. Kolonun hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Elde edilen kromatografik piklerin keskinliği bir kolonun verimini gösteriyorsa, bu verimin nicel ölçüsü de teorik tabaka sayısıdır.

Tabaka sayısı ya da diğer adıyla teorik tabaka sayısı N ile gösterilmektedir ve aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$N = 16 \times (t / W)^2$$

$$N = 5,54 \times (t / W_{1/2})^2$$

Burada t; bileşiğin alıkonma süresini,

W; bileşik pikinin taban genişliğini ve

$W_{1/2}$; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir. Bir kolonda teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksek demektir. Kolon boyu arttıkça teorik tabaka sayısında da artış gözlenir.

İndirgenmiş tabaka yüksekliği; h ile gösterilir. Kolonun ne kadar hızlı ve etkili çalıştığını gösterir. N ile ters orantılıdır. Bir kolonda N değeri ne kadar büyükse yani h değeri ne kadar küçükse kolonun verimi o kadar yüksektir.

Daha düşük indirgenmiş tabaka yüksekliği ve daha fazla teorik tabaka sayısı kısa sürede kromatografik sonuçların elde edilmesi demektir. h değerini büyüten her etken kolon verimini düşürür ve pik genişlemesine neden olur. h değeri aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$H = (L / N \times dp)$$

burada H; indirgenmiş tabaka yüksekliği, L; kolon boyu ve dp de partikül çapıdır.

Seçicilik, her bir pikin kapasite oranları veya bunların düzenlenmiş alıkonma zamanlarının oranıdır. Seçicilik karışımdaki bileşenlerin partikül yüzeyine adsorplanmasındaki ilgisi olarak ifade edilmektedir.

Bu parametre kolonun veriminden bağımsızdır. Sadece bileşenin doğal yapısına, elüent tipine, elüent bileşimine ve yüzey adsorbansına bağlıdır. Genellikle iki bileşiğin seçiciliği 1'e ne kadar yakınsa iki pikin birbirinden ayrılması o kadar güçleşir.

Aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$t_{r,B} - t_0$$

$$\alpha = \frac{t_{r,B} - t_0}{t_{r,A} - t_0}$$

$$t_{r,A} - t_0$$

Burada $t_{r,B}$ ve $t_{r,A}$ sırasıyla B ve A bileşenlerinin alıkonma sürelerini, t_0 ise kolondaki boşluk hacmi yani kolonla etkileşime girmeden hareketli bir fazın kolondan çıkması gerekli olan süreyi ifade etmektedir.

Çözünürlük (ayırıcılık, R), kromatografide iki pikin birbirinden ayrılma derecesine denir. İki pikin birbirinden ayrıldığı kabul etmek için $R = 1$ olması gerekir ve bu çözünürlük değeri iki bandın birbiri ile %2 oranında örtüştüğü anlamına gelir. Bu değer 1,5'den büyük ise pikler tamamen ayrılmış ve iyi bir çözünürlük elde edilmiş demektir.

Çözünürlük aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır:

$$R_{(i+1)/i} = 2 \times (t_{i+1} - t_i) / (W_i + W_{i+1})$$

Burada t_i ve t_{i+1} ; sırasıyla i ve $i+1$ no'lu bileşenlerin alıkonma süreleri, W_i ve W_{i+1} ise sırasıyla i ve $i+1$ no'lu bileşenler için elde edilen taban genişliklerini ifade etmektedir [128].

2.10. HPLC'de Kolon Dolgu Maddeleri

HPLC'de kolon dolgu fazları üçe ayrılabilir. Bunlar polimerik, inorganik ve hibrid materyallerdir. Günümüzde silika, hidroksiapatit, grafit ve metal oksit içeren inorganik materyaller, araştırma ve uygulamada geniş çapta kullanılmaktadır. Bu materyaller arasında, silika oldukça ideal bir destek maddesidir. Şöyle ki; silika mekanik dayanıklılık, yüksek kimyasal ve termal kararlılık, yüzeyindeki silanol gruplarının, por yapısının ve yüzey alanının kontrol edilebilmesi bakımından oldukça avantajlıdır. Bundan dolayı silika en yaygın olarak kullanılan HPLC dolgu materyali olarak gelişmektedir [129].

Ters faz sıvı kromatografisinde, ayırma işleminde dolgu maddesi önemli bir rol oynar. HPLC ilk geliştirildiğinde, dolgu maddesi viskoz bir sıvı ile kaplı inert desteklerden oluşmaktaydı [130]. Ancak böyle bir dolgu maddesi üzerinden geçen bir hareketli faz varlığında, dolgu maddesinin kaplı olduğu viskoz sıvıyı korumanın olanaksız olması dolgu maddelerinin yetersiz ve sınırlı olduğunun kanıtıydı.

Bir ligandın silil eter (-Si – O – Si -) bağları üzerinden katı bir desteğe kovalent olarak bağlanmasıyla elde edilen dolgu maddelerinin gelişimi bu problemi gidermiş ve modern sıvı kromatografisinin gelişimine katkıda bulunmuştur. Çeşitli fonksiyonel gruplara sahip dolgu maddeleri ticari olarak mevcuttur. Bununla beraber, katı desteğin ligand ile birçok firma kendi silikasını geliştirmektedir [130].

Sentez reaksiyonu üreticiler tarafından değişse de genel reaksiyon uygun bir ligandın silika destek maddesi üzerindeki silanol (Si – OH) ya da siloksanlara (Si-O-Si) kimyasal olarak bağlanmasını içerir. Genel olarak siloksanların düşük aktiviteye sahip oldukları kabul edilir, bundan dolayı, bağlanma işleminde sonuç göstermezler. Silanoller böylece bağlanma fazı için birinci bağlantı noktası olarak görev yapar [131].

İdeal olarak, dolgu fazı çeşitli karakteristik özelliklere sahip olmalıdır. Birincisi, destek materyali homojen bir yüzeye sahip olmasının yanı sıra kimyasal modifikasyonlara karşı cevap verebilmelidir. Ayrıca kimyasal ve termal olarak kararlı olmalı ve pH değişimine karşı uzun süre kararlılık göstermelidir. Bunlara ek olarak, HPLC’de yüksek basınç değerine direnmek için yüksek mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Ticari olarak uygulanabilir olması için, üretim prosedürü son derece yinelenebilir olmalıdır. En önemlisi de dolgu fazları ayırma için gerekli selektiviteyi, tutunmayı ve geniş analit sınıfına uygulanabilirliği sağlanmalıdır [132].

2.10.1. Silika Jel

Ticari olarak mevcut kolonların büyük bir kısmı silikajel tabanlıdır. Silikayı diğer dolgun fazlarından üstün kılan bazı avantajları vardır. Birincisi, silikanın kimyası iyi bilinmektedir.

Fabrikasyon koşulları kolaylıkla kontrol altına alınabildiğinden istenilen ürünü elde etmek mümkündür. Silika jeller dar gözenek çapı dağılımlı, çok gözenekli ve yüzey alanlı ve düşük miktarda metal içeriği barındırabilirler. Silika ayrıca HPLC koşulları altında görülen basınçtan kaynaklı mekanik etki için ihtiyaç duyulan dayanıklılığa sahiptir. İlâveten, bu gözenekli parçalar çok büyük yüzey alanlarına sahiptir ki bu sayede örnek analitlerin alıkonması çok iyidir [133]. Mevcut silika jel tabanlı dolgu fazları geleneksel olarak düz bir alkil zinciri içeren ligand ile modifiye olmuştur. Birçok sıvı kromatografisi analizleri oktadesilsiloksan (ODS) olarak bilinen C₁₈ dolgu fazlı kolon ile yapılır.

Bunun yanı sıra karbon sayısı birden otuza kadar değişen dolgu fazları da mevcuttur. Son zamanlarda, alkil zincirinin iç kısmında polar bir grup içeren dolgu fazları popüler olmuştur. Bu tür dolgu fazları polar gömülü (embedded) dolgu fazları olarak adlandırılırlar. Temel polar gömülü gruplar amitler, karbamatlar ya da eterlerdir. Bu polar gruplar silika yüzeyine yakın noktada bulunurlar. Devamında ise dolgu fazının hidrofobik doğası için gerekli karbon sayısı sekizden on sekize kadar değişen alkil grupları vardır.

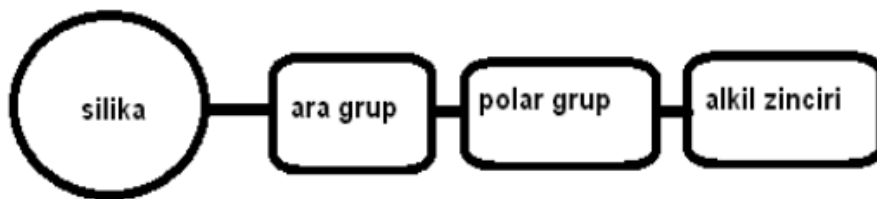
Ligandın birinci bağlanma reaksiyonuna ilâveten trimetilklorosiloksan gibi kısa zincirli alkil silanlar kullanılarak geriye kalan silanollerle bloke edilmesi işlemine endcapping denir. Bu şekilde hem dolgu fazının kararlılığı hem de pik keskinliği artar [134-136]. Benzer şekilde, dolgu fazın kararlılığını arttırmak için sterik engelli hacimli bağlanma fazları kullanılabilir. Bu dolgu fazları, dolgu fazını hidrolizden koruyan hacimli yan gruplara sahip monofonksiyonel alkilsilan içerir. Çift dişli dolgu fazları özellikle daha yüksek pH değerlerinde üstün kararlılığa sahiptir. Bunlar monomerik dolgu fazlarına benzer, fakat bu dolgu fazları ek bir ara linke sahiptir ve bu ara link genellikle propilen grubudur [135]. Polimer içeren dolgu fazları ideal olarak kimyasal kararlılığı artırır [137]. Bu kolonların yüksek oranda karbon içerdiğini ve bunun da pik keskinliğini ve bazik hareketli fazlarda kararlılığı arttırdığını bulmuştur.

Son zamanlarda özel amaçlı dolgu fazları popüler olmakta ve spesifik uygulamalar için kullanılmaktadır. Örneğin, kiral dolgu fazları enantiyomerik ayırmalarda önemlidir. Tipik kiral dolgu fazları poliakkarit, protein, taç eter ve siklodekstrin içerir [138]. Fenil halkası içeren dolgu fazları da polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAHs) karşı aromatik selektivite göstermeye meyillidir [139,140]. Geleneksel alkil zincirli ligandlarla kıyaslandığında, siyano grubu bağlı dolgu fazları daha az hidrofobik özelliktedir [141].

Flor bağı dolgu fazlarının özellikle halojenli analitlerin ayrılmasında popülerliği artmaktadır. Bu kolonlar, C₁₈ kolonlarla kıyaslandığında daha uzun alıkonma süresi ve daha yüksek bir selektivite gösterir. İlâveten, bu dolgu fazları süperkritik akışkan kromatografisi (SFC), micellar elektrokinetik sıvı kromatografisi (MEKC) ve iyon kromatografisi gibi diğer ayırma modlarında da uygunluk gösterir [142,143].

2.10.2. Polar Gömülü (Embedded) Fazlar

Geleneksel C₈-C₁₈ durgun fazlar, ters faz ayırmalarında geniş kullanım alanına sahiptir. Fakat bu fazlarda doldurulmuş kolonlar, yüksek sulu hareketli fazlar ve bazı maddeler için zayıf pik şekilleri ve bazı dezavantajlara sahiptir [144]. Son on yılda, araştırmacılar, bunun gibi zorlukların üstesinden gelebilmek için polar – embedded serili durgun fazlar üretmişlerdir [144,145]. Bu fazlar silika yüzeyinin yanında birincil hidrofobik ve hidrofilik grupları içermektedir. Sıklıkla, amit, amin, karbamat, ete ve sülfonamit fonksiyonel gruplar kullanılır. Genellikle polar – embedded grupların faydaları bazı maddeler için iyi pik şekil vermesi, yüksek sulu derecedeki hareketli fazlarla uyumluluk göstermesi ve bilinen C₁₈ kolonlarına kıyasla yüksek ve özel seçicilik karakterine sahip olmasıdır [146].



Polar grup = amid, karbamat, üre, sülfonamit, alkil yada fenil eter, Ara grup = tipik propil ligandı, Alkil zinciri=C₈ - C₁₈

Resim 2.10. 1. Tipik bir polar gömülü (embedded) faz gösterimi

Resim 2.10.1'de şematik diyagramı verilen polar – embedded gruplarının şekli verilmiştir, bir propil grubu olan ara grup, silika yüzeyi ve polar gruplar arasında yer alır. Son oluşan madde kimyasal fonksiyonları açısından bir miktar farklı olabilir.(amit, karbamat, alkil eter, fenil eter grupları...) C-alkil ligandı, liganda lifofilik karakter verir ve C₈'den C₁₈'e kadar zincir uzunluğu çeşitlendirilebilir [140].

Polar embedded gruplu fazlar, azalmış hidrofobisite ve metilen seçiciliği, azalmış hidrojen bağı kapasitesi, silanol aktivitesi ve iyon değişimi veya azot içeren dipol etkileşime bakarak çok özel ve spesifik seçiciliğe sahiptir. Azot içeren polar embedded fazlardaki pozitif karakterin bulunması nedeniyle asidik bileşikler nötral araştırmalara yakın olarak gelişmiş alıkonma karakteri gösterebilir ve bazik bileşikler, iyonik veya dipol etkileşimle fazlara azalmış alıkonma faktörleri özellikle düşük pH'da denenebilir [146].

Silika tabanlı ters faz dolgu fazları pH 2 ile 8 arasında güvenli bir şekilde kullanılabilseler de pH 8'den sonra silika hidroliz olduğundan kullanımlarında ciddi sınırlamalar vardır. Bazik bileşiklerin analizi düşük pik keskinliği ve etkinliklerinden dolayı kromatografiler için bir problem olmuştur. Son araştırmalar asıl sebeplerin daha karmaşık olduğunu gösterse de geleneksel bakış açısı bunu silanoller üzerindeki zayıf etkileşime bağlamaktadır. Nedenlere bakmaksızın yeni dolgu fazlarının gelişimi bazik analitler söz konusu olduğunda etkileşimi arttırmaya çalışmaktadır.

Bu dolgu fazları geleneksel bağlanma fazından fiziksel olarak farklıdır. Çünkü bunlar alkil zincirinin içinde bir polar grup içerirler. Bu kolonlar ayırmada önemli avantajlar sağlasa da bazı dezavantajlara da sahiptir. Daha kısa alkil zincirine ve polar gruplara sahip olan gömülü (embedded) kolonlar yüksek ve düşük pH değerinde saf alkil zinciri içeren kolonlara göre daha zayıf kararlılık gösterir. Bundan dolayı daha kısa alkil zinciri ya da daha polar fonksiyonel grup içeren dolgu fazları yüksek polarlıktaki bileşiklerin ayırımında yüksek performans gösterse de daha kısa kolon ömrüne sahiptir. Ayrıca polar gömülü kolonların daha yüksek oranda su içeren hareketli fazın kullanımına izin verdiği tespit edilmiştir.

Yüksek bağlanma yoğunluklu geleneksel kolonlarda ise su bakımından zengin hareketli faz kullanıldığında zincir kopmasının meydana geldiği saptanmıştır. Zincir kopması su bakımından zengin hareketli fazda hidrofobik alkil zincirinin toplanmasından kaynaklanır.

Bu alıkonmanın geri dönüşümsüz olmasından ve azalan kromatografik etkinlikten kaynaklanabilir [147]. Walter ve ark. (2005) tarafından yapılan son çalışmalarda yüksek oranda sulu hareketli faz kullanıldığında alıkonma süresindeki azalmanın zincir kopmasından değil dolgu fazı gözeneklerinden hareketli fazın ekstrüzyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir. Alıkonmadaki düşüşün gözenek boyutuna bağlılığı, boş hacim ve akış durdurulduktan sonraki gözenek boyutundaki değişiklikler arasındaki ilişki ve alıkonmadaki düşüşün basınca bağımlılığı bu fikri doğrular. Bazik analitler için pik keskinleşmesinin artmasına neden olan başka bir faktör polar gömülü kolonların artan ıslaklıklarından kaynaklanır.

Bir görüşe göre polar grup analiti silanollerden koruyan silika yüzeyindeki bir su tabakasıyla kaplanır [147]. Diğer görüşlere göre ise polar grup serbest silanollerle etkileşmeyi tercih edebilir. İlaveten, eğer hareketli fazın pH'sı gömülü grubun pKa'sının altına düşerse, gömülü grup protonlanır ve pozitif yüklenir. Bu, gömülü grubu yüzeydeki silanollerden koruyarak dolgu fazı ve analitin elektrostatik itmesine neden olabilir [143].

3.MATERYAL VE METOT

3.1. HPLC Analiz Metodu ve Validasyonu

2014 yılı Mayıs ayında Uşak Bölgesinden toplanan armut yaprakları karanlık odada, oda sıcaklığında 15 gün süreyle kurutuldu. Daha sonra kuru yapraklar 80-100 mesh boyutunda öğütüldü. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta ve analizlerde kullanılan kimyasallar HPLC saflığındaydı.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

Çalışılan bileşiğin sıvı kromatografik yöntemle analizinde, Agilent 1260 marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol ünitesi, otomatik örnekleyci, pompa, dedektör, kolon fırını ve gaz giderme ünitesi bulunmaktadır. HPLC Analizlerinde ACE 5 C-18, Batch:V12-711, Boyutlar: 250x4,6 mm kolon kullanılmıştır.

pH metre

Hazırlanan çözeltilerin pH sı Mettler Toledo Seven Easy pH metre kullanılarak kontrol edildi.

Ultrasonik Banyo

Kurutulmuş ve öğütülmüş yaprak numunelerinden arbutinin ekstraksiyonu için Wisebath marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyo cihazı kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri, Çizelge 3.1. de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Sodyum hidroksit	Ekstraksiyon solüsyonunun hazırlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Hidroklorik Asit	Ekstraksiyon solüsyonunun hazırlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Metanol	Ekstraksiyon solüsyonunun hazırlanmasında	Merck, HPLC saflığında
Etanol	Ekstraksiyon solüsyonunun hazırlanmasında	Merck, HPLC saflığında
Arbutin Standardı	HPLC Analizlerinde standart olarak.	Sigma, analitik saflıkta

3.1.3. HPLC Analiz Metodu

Arbutinin standart solüsyonlardan ve ekstraktlardan tanınması ve miktar analizleri için mobil faz konsantrasyonları ve mobil faz akış hızı değiştirilerek ayırımın ve pik saflığının en iyi gerçekleştiği aşağıdaki metot geliştirilmiştir. Bu metot valide edilmiştir.

Çizelge 3. 2. HPLC analiz metodu

Kolon	ACE 5 C-18, Batch:V12-711, Boyutlar: 250x4,6 mm,
Mobil Faz	Metanol: Deiyonize Su (7:93 V/V)
Enjeksiyon Hacmi	5 µL
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Dedeksiyon	280 nm
Akış Hızı	1,2 mL/dk
Analiz Süresi	9 dakika

3.1.4. Validasyon Çalışmaları

Analitik metodun validasyonu için arbutin standardından bir beher içerisinde bir miktar su içerisinde çözünmesi sağlandı. 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı. Hacim 100 mL ye suyla tamamlandı. Hazırlanan bu 1 mg/mL konsantrasyondaki stok standart solüsyondan seyreltme yolu ile 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında 5 standart solüsyon hazırlandı. Hazırlanan Standart solüsyonlar her biri beşer kez ardışık 3 gün boyunca HPLC cihazına enjeksiyonu yapıldı. Elde edilen validasyon verileri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarından yararlanılarak;

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik,

Kalibrasyon doğrusallığı,

Konsantrasyon aralığı,

Korelasyon katsayısı,

Kayma,

Eğim,

Teşhis limiti değeri (LOD),

Tayin limiti değeri (LOQ),

Alıkonma zamanı tespit edildi.

3.2. Ekstraksiyon

Ultrasonik destekli ekstraksiyon Wisebath marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirildi. 100 mL hacimli erlenlerin içerisine öğütülmüş numuneden 200 mg tartılarak aktarıldı. Üzerine deney programında belirtilen miktarda ve yine belirtilen pH'da solvent ilave edildi. Erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp lastikle sabitlendi.

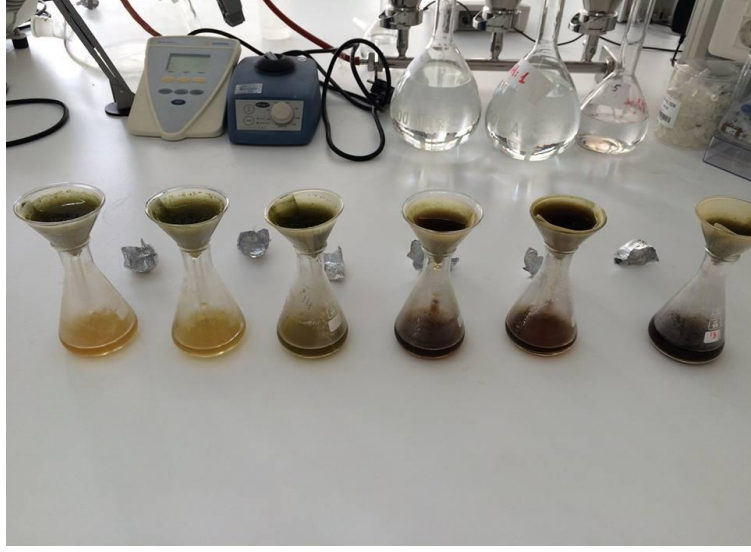


Resim 3.2. 1. Numune ve solventin erlenlere alınması

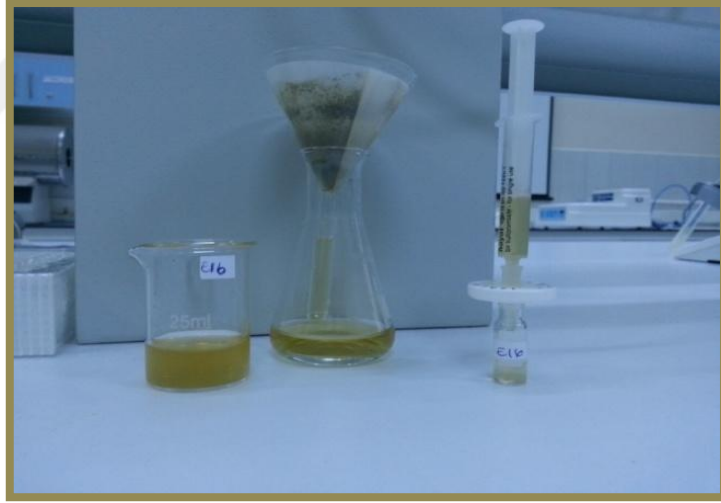
Ultrasonik banyonun sıcaklığı ve süresi ayarlandı. Standart ultrasonik koşullar için erlenler ultrasonik banyo içerisine yerleştirildi. Banyodaki su ile erlen içerisindeki çözelti seviyesi aynı tutuldu. Ve ultrasonik banyo çalıştırıldı. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra kapilerin tıkanmasını önlemek amacıyla çözelti önce Whatman marka filtre kâğıdı ile sonrasında 0,45 mikronluk membran filtre ile süzüldü.



Resim 3.2. 2. Ultrasonik banyo ve ekstraksiyon



Resim 3.2. 3. Ekstraktın whatman beyaz bant filtre kâğıdı ile süzülmesi



Resim 3.2. 4. Ekstraktın enjektör ucu filtre ile süzülmesi

3.2.1. Uygun Solventin Belirlenmesi Çalışmaları

200 mg kurutulmuş ve öğütülmüş armut yaprağı numunesinden tartılarak 100 mL hacimli erlenmayere alındı. Üzerine 50 mL aşağıda isimleri yazılı solventlerden ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30 °C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialle alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

3.2.2. En Uygun Ekstraksiyon pH sının Belirlenmesi Çalışmaları

Deiyonize su ve HCl ile 0,1 Molar HCl çözeltisi hazırlandı. (pH:1)

(pH:1) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:2) solüsyonu hazırlandı.

(pH:2) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:3) solüsyonu hazırlandı.

(pH:3) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:4) solüsyonu hazırlandı.

(pH:4) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:5) solüsyonu hazırlandı.

(pH:5) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:6) solüsyonu hazırlandı.

Doğrudan deiyonize su kullanıldı. (pH: 7)

Deiyonize su ve NaOH ile 0,1 Molar NaOH çözeltisi hazırlandı. (pH:13)

(pH:13) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:12) solüsyonu hazırlandı.

(pH:12) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:11) solusyonu hazırlandı.

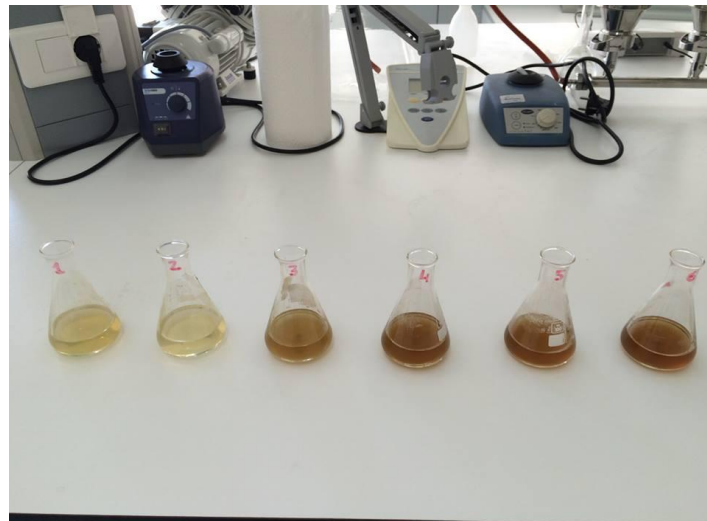
(pH:11) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:10) solusyonu hazırlandı.

(pH:10) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:9) solusyonu hazırlandı.

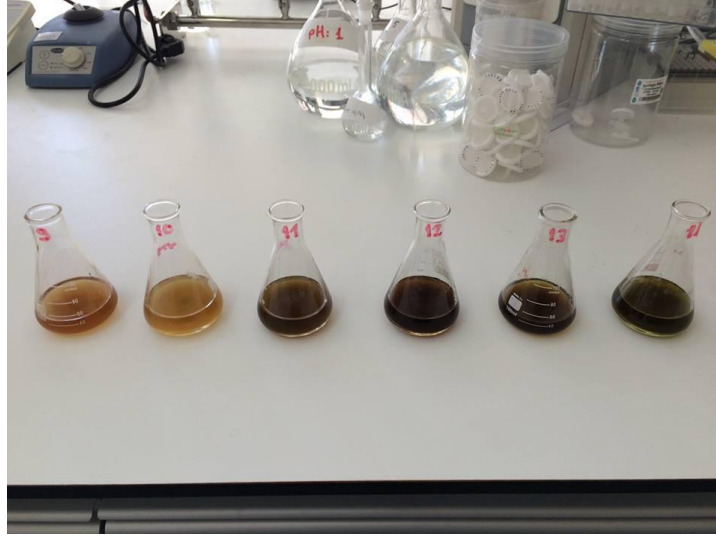
(pH:9) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:8) solusyonu hazırlandı.

Hazırlanan çözeltilerin pH sı Mettler Toledo Seven Easy pH metre kullanılarak kontrol edildi.

200 mg kurutulmuş ve öğütülmüş numuneden 14 adet tartılarak 100 mL hacimli 14 farklı erlenmayere alındı. Herbirinin üzerine 50 mL yukarıda hazırlanan farklı pH lardaki solüsyonlardan ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30⁰C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialle alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.



Resim 3.2. 5. Farklı pH larda ekstraktlar



Resim 3.2. 6. Farklı pH larda ekstraktlar

3.2.3. En Uygun Solvent/Katı Oranının Belirlenmesi Çalışmaları

Kurutulmuş ve öğütülmüş armut yaprağı numunesinden 6 adet 200 mg tartılarak 6 farklı 100 mL hacimli erlene tartıldı. Üzerine aşağıda belirtilen miktarlarda pH:1 solüsyonundan ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30⁰C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialde alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

3.2.4. En Uygun Ekstraksiyon Verimi İçin Tane Boyutunun Belirlenmesi Çalışmaları

Kurutulmuş ve öğütülmüş numune Retsch marka AS 200 model Titreşimli elek sallayıcı ile tane boyutlarına ayrıldı. Herbir tane boyutundan 200 mg numuneden tartılarak 100 mL hacimli erlenmayere alındı. Üzerine aşağıda belirtilen miktarlarda pH:1 solüsyonundan ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30⁰C sıcaklıkta ekstrakte edildi.

Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialle alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

3.2.5. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu Çalışmaları

Armut yapraklarından Arbutinin Ultrasonik destekli ekstraksiyonun optimizasyonu için üç değişken kullanıldı. Bu değişkenler ekstraksiyon zamanı, ekstraksiyon sıcaklığı ve metanol konsantrasyonu idi.

Çizelge 3.2 1. Box-Behnken Tasarımı Kullanılan Bağımsız Değişkenler, Kodları ve Gerçek Değerleri

Bağımsız Değişkenler	Birimler	Parametrelerin Sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	1
Ekstraksiyon Sıcaklığı	⁰ C	(X1)	30	45	60
Ekstraksiyon Zamanı	Min	(X2)	15	30	45
Metanol Konsantrasyonu	%	(X3)	25	50	75

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. HPLC Analiz Metodu Validasyonu Çalışmaları

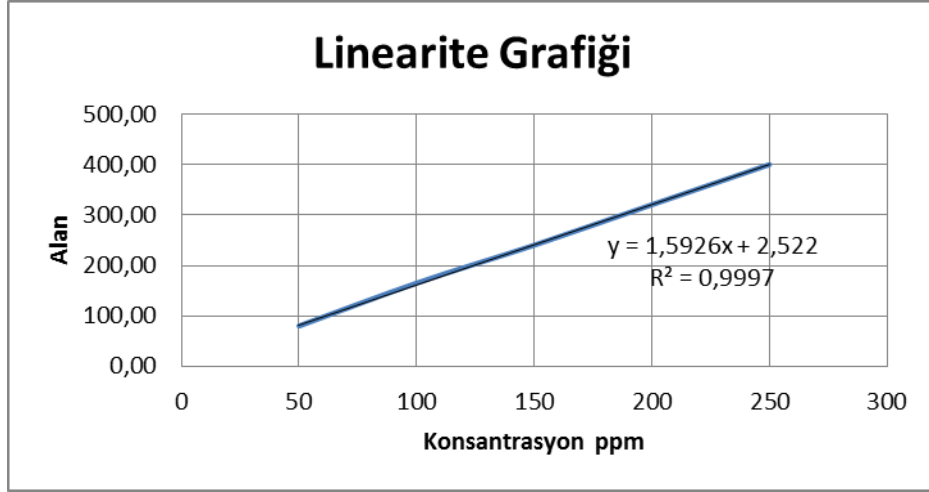
Analitik metodun validasyonu için Arbutin standardından bir beher içerisinde bir miktar su içerisinde çözünmesi sağlandı. 100 mL lik balonjojeye aktarıldı. Hacim 100 mL ye suyla tamamlandı. Hazırlanan bu 1 mg/mL konsantrasyondaki stok standart solüsyondan seyreltme yolu ile 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında 5 standart solüsyon hazırlandı. Hazırlanan standart solüsyonlar herbiri beşer kez olmak üzere üç gün boyunca HPLC cihazına enjekte edildi. Elde edilen validasyon verileri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Validasyon için kullanılan arbutin standartlarının konsantrasyonları

Validasyon İçin Kullanılan Arbutin Standartlarının Konsantrasyonları (ppm)				
50	50	50	50	50

Çizelge 4. 2. Arbutin standartlarının konsantrasyonları ve elde edilen pik alanları

ENJEKSİYON	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	250 ppm
1	80,80	165,80	240,30	320,70	399,80
2	79,70	165,00	240,40	321,90	400,60
3	80,00	165,70	240,50	319,70	400,10
4	80,10	165,10	240,90	320,90	400,80
5	79,60	164,90	240,40	320,60	401,00
ORTALAMA	80,04	165,30	240,50	320,76	400,46
SD	0,4722	0,4183	0,2345	0,7861	0,4980
%RSD	0,5900	0,2531	0,0975	0,2451	0,1244



Şekil 4. 1. Arbutin standart solüsyonlarının doğrusallık grafiği

Çizelge 4. 3. Arbutinin HPLC Analiz Metodu kalibrasyon verileri istatistiksel değeriendirilmesi

Parametreler		Arbutin
Doğrusallık	Konsantrasyon Aralığı (ppm)	50-250
	Korelasyon Katsayısı	0,9997
	Kayma	2,522
	Eğim	1,5926
LOD Teşhis Limiti (ppm)		4,573
LOQ Tayin Limiti (ppm)		7,739
Alıkonma zamanı (dk)		4,580

Çizelge 4. 4. Tekrarlanabilirlik sonuçları

	50 ppm RSD	100 ppm RSD	150 ppm RSD	200 ppm RSD	250 ppm RSD
1. GÜN	0,5900	0,2531	0,0975	0,2451	0,1244
2. GÜN	0,3086	0,4441	0,3108	0,2852	0,2044
3. GÜN	0,3085	0,4110	0,1351	0,2437	0,1264

Uluslararası standartlara göre tekrarlanabilirlik testlerinin uygun olabilmesi için % RSD değerlerinin 2'den küçük olması istenir. Yukarıdaki tabloda görülen rakamların tümü 1'in altındadır.

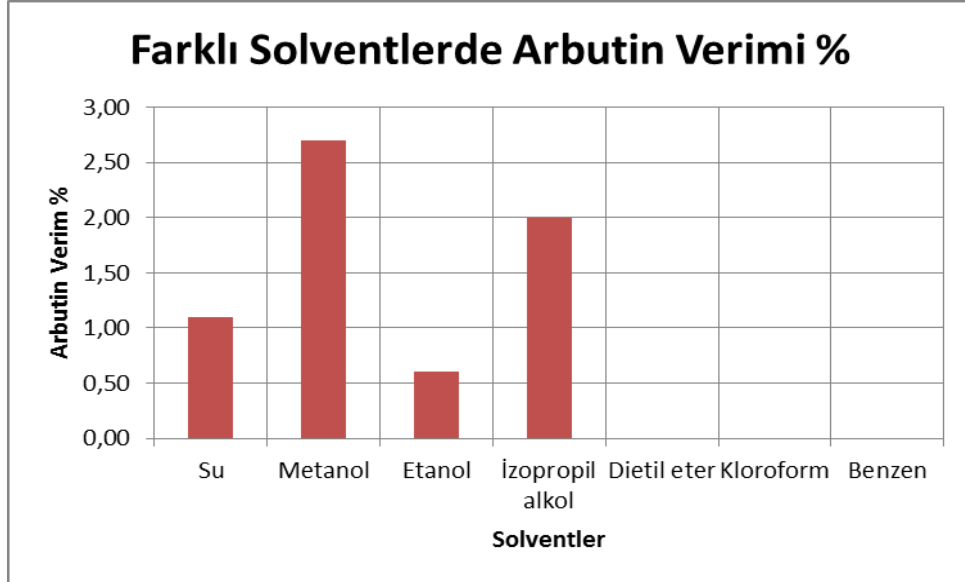
4.2. Uygun Solventin Belirlenmesi Çalışmaları

200 mg kurutulmuş ve öğütülmüş armut yaprağı numunesinden tartılarak 100 mL hacimli erlenmayere alındı. Üzerine 50 mL aşağıda isimleri yazılı solventlerden ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30⁰C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialle alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

Çizelge 4. 5. Farklı solventlerle ekstraksiyon verimleri

Solvent	Ekstrakt Arbutin İçeriği ppm	Numune Arbutin İçeriği %
Su	44	1,10
Metanol	108	2,70
Etanol	24	0,60
İzopropil alkol	80	2,00
Dietil eter	0	0,00
Kloroform	0	0,00
Benzen	0	0,00

Çizelge 4.5.'den de görüleceği üzere Dietileter, Kloroform ve Benzen arbut yapraklarındaki arbutini çözmemektedir. Arbutin için en iyi solvent en yüksek verimle metanol olarak belirlenmiştir.

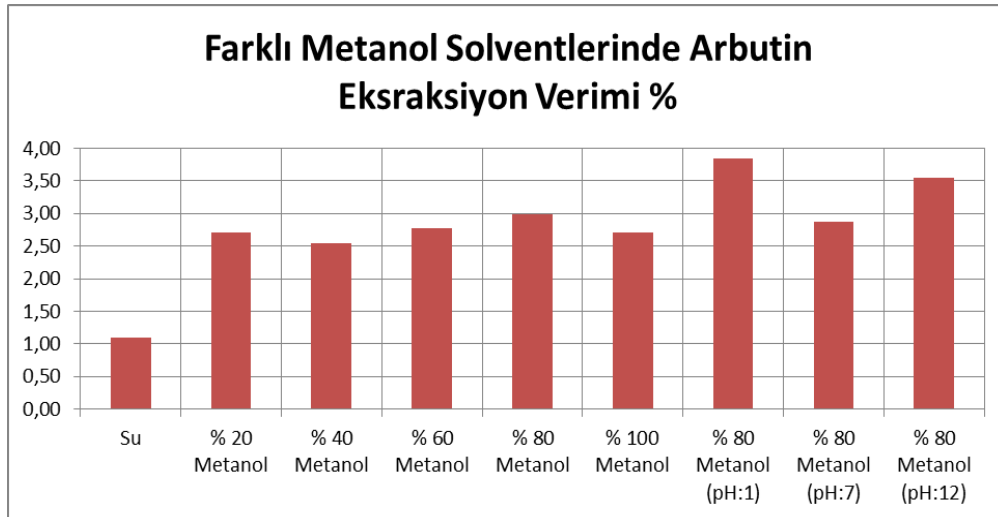


Şekil 4. 2. Farklı solventlerde Arbutin verimi

Çizelge 4. 6. Farklı metanol solventlerinde ekstraksiyon verimleri

Solvent	Ekstrakt Arbutin İçeriği ppm	Numune Arbutin İçeriği %
Su	44	1,10
% 20 Metanol	99	2,48
% 40 Metanol	102	2,55
% 60 Metanol	111	2,78
% 80 Metanol	119	2,98
% 100 Metanol	108	2,70
% 80 Metanol (pH:1)	154	3,85
% 80 Metanol (pH:7)	115	2,88
% 80 Metanol (pH:12)	142	3,55

Çizelge 4.6.'dan da görüleceği üzere %100 suda arbutin verimi en düşüktür. Arbutin için en iyi solvent en yüksek verimle %80 metanol + %20 pH:1 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 3. Farklı metanol solventlerinde arbutin verimi

4.3. En Uygun Ekstraksiyon pH sının Belirlenmesi Çalışmaları

Deiyonize su ve HCl ile 0,1 Molar HCl çözeltisi hazırlandı. (pH:1)

(pH:1) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:2) solüsyonu hazırlandı.

(pH:2) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:3) solüsyonu hazırlandı.

(pH:3) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:4) solüsyonu hazırlandı.

(pH:4) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:5) solüsyonu hazırlandı.

(pH:5) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:6) solüsyonu hazırlandı.

Doğrudan deiyonize su kullanıldı. (pH: 7)

Deiyonize su ve NaOH ile 0,1 Molar NaOH çözeltisi hazırlandı. (pH:13)

(pH:13) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:12) solüsyonu hazırlandı.

(pH:12) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:11) solüsyonu hazırlandı.

(pH:11) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:10) solüsyonu hazırlandı.

(pH:10) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:9) solüsyonu hazırlandı.

(pH:9) solüsyonundan 100 mL alınıp 1000 mL ye Deiyonize su ile seyreltildi. (pH:8) solüsyonu hazırlandı.

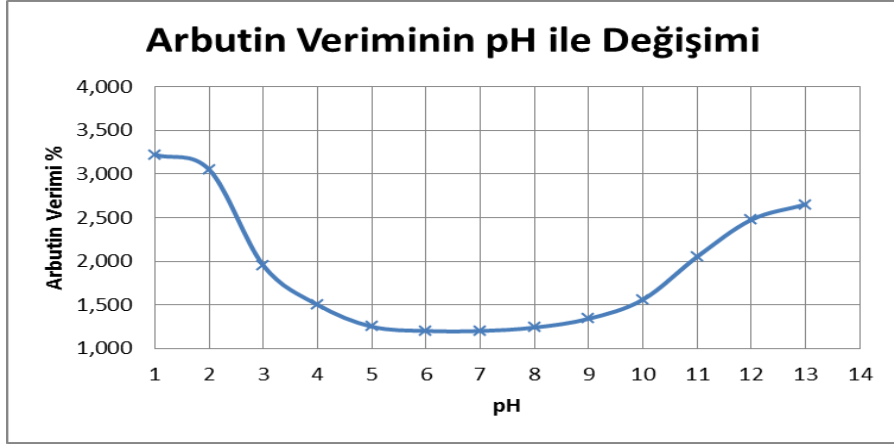
Hazırlanan çözeltilerin pH sı Mettler Toledo Seven Easy pH metre kullanılarak kontrol edildi.

200 mg kurutulmuş ve öğütülmüş numuneden 14 adet tartılarak 100 mL hacimli 14 farklı erlenmayere alındı. Herbirinin üzerine 50 mL yukarıda hazırlanan farklı pH lardaki solüsyonlardan ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30⁰C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialde alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

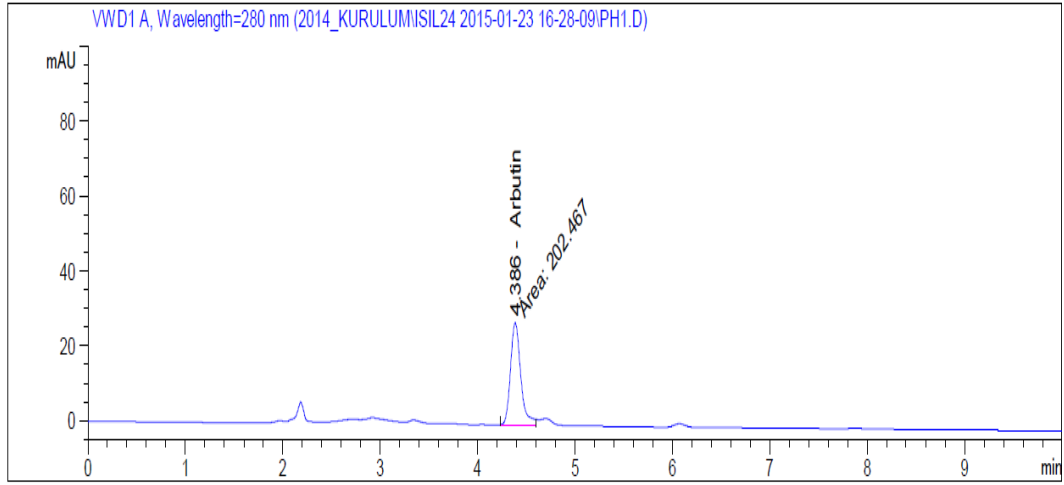
Çizelge 4. 7. Farklı pH larda ekstraksiyon verimleri

pH	1	2	3	4	5	6	7
Arbutin Verimi %	3,220	3,050	1,950	1,500	1,250	1,200	1,200
pH	8	9	10	11	12	13	14
Arbutin Verimi %	1,240	1,340	1,560	2,050	2,475	2,650	0,000

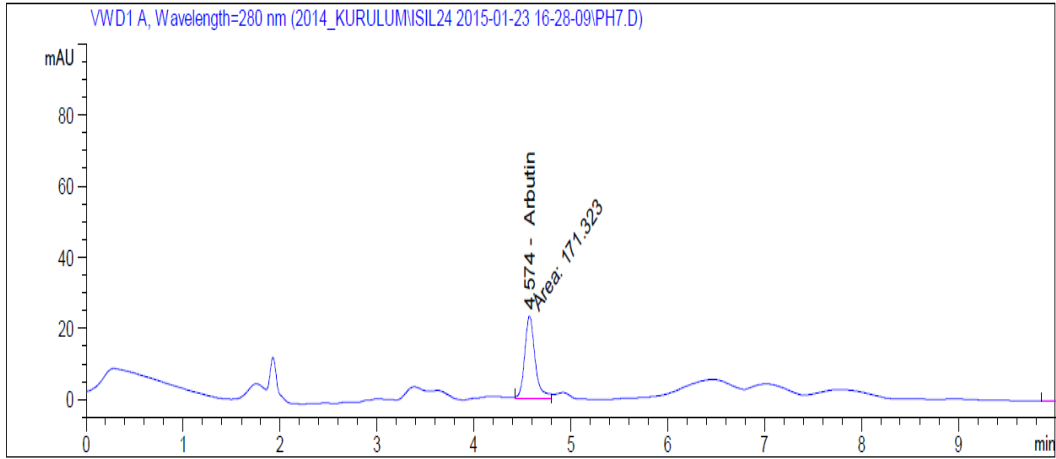
Şekil 4.4.'den de görüleceği üzere pH: 1 de ekstraksiyon verimi maksimum iken pH: 7 de verim minimum olmuş ve pH: 13 e kadar verim tekrar yükselmiştir. Ancak yinede verim pH: 1 de maksimumdur. pH: 14 ekstraktlarda arbutin piki gözlenmemiştir. Güçlü alkali ortamda arbutin bozunmaktadır.



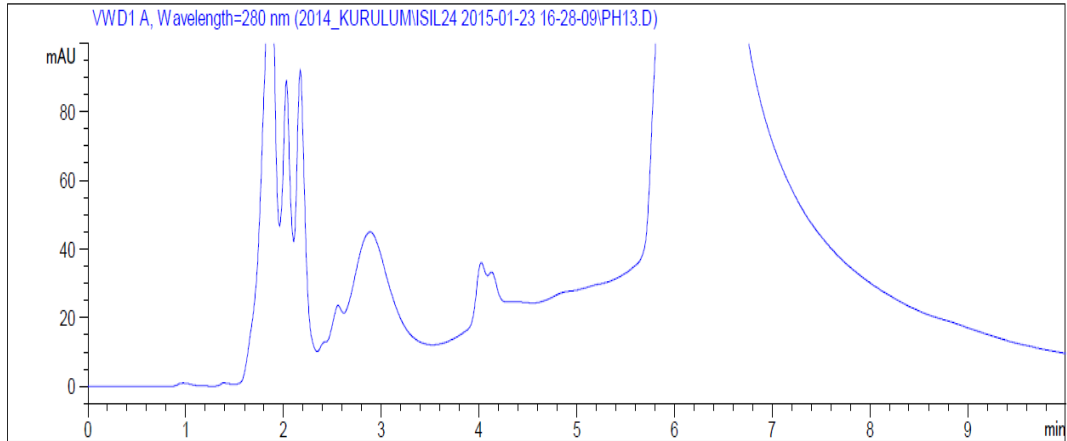
Şekil 4. 4. Farklı pH larda ekstraksiyon verimleri



Şekil 4. 5. pH 1 ekstraktının kromatogramı



Şekil 4. 6. pH 7 ekstraktının kromatogramı



Şekil 4. 7. pH 14 ekstraktının kromatogramı

4.4. En Uygun Solvent/Katı Oranının Belirlenmesi Çalışmaları

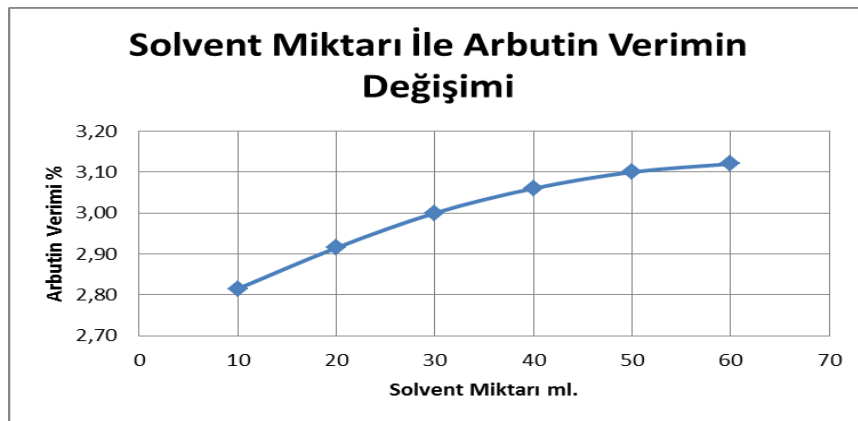
Kurutulmuş ve öğütülmüş armut yaprağı numunesinden 6 adet 200 mg tartılarak 6 farklı 100 mL hacimli erlene tartıldı. Üzerine aşağıda belirtilen miktarlarda pH:1 solüsyonundan ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30⁰C sıcaklıkta ekstrakte edildi.

Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialle alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

Çizelge 4. 8. Farklı solvent miktarlarında ekstraksiyon verimleri

pH 1 Solvent Miktarı	Arbutin % Verim
10 mL	2,815
20 mL	2,915
30 mL	3,000
40 mL	3,060
50 mL	3,100
60 mL	3,120

Şekil 4.8.'den de görüleceği üzere solvent miktarı arttıkça Fick Yasası na uygun olarak kütle transferi iyileştiğinden verim sürekli olarak artmış 50 mL den sonra çok fazla değişmemeye başlamıştır. Bu sonuç bitkiden arbutini maksimum olarak almak için 50 mL solvent ilavesinin yeterli olacağını göstermektedir. 50 mL den sonra ilave edilecek her solvent miktarı arbutin izolasyonunda hem zorluk yaşatacak ham de ekonomik maliyeti artıracaktır.



Şekil 4. 8. Solvent miktarı ile arbutin veriminin değişimi

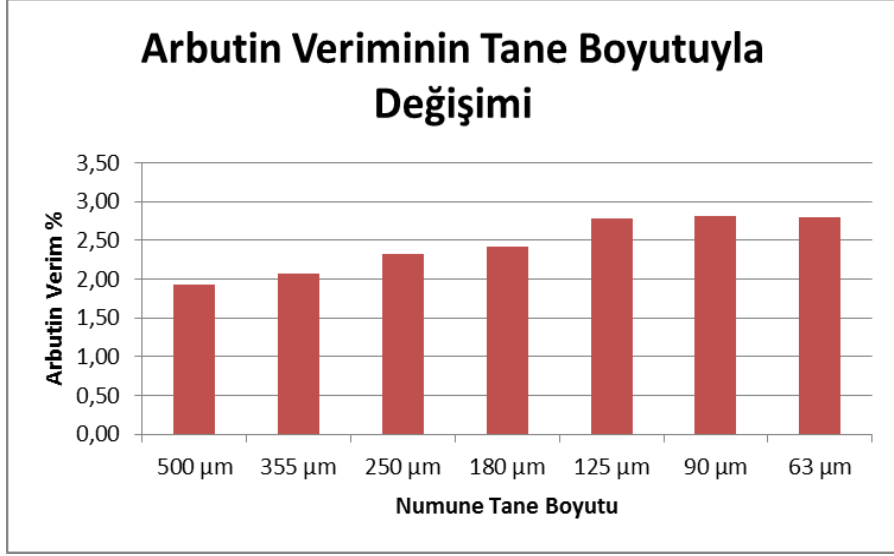
4.5. En Uygun Ekstraksiyon Verimi İçin Tane Boyutunun Belirlenmesi Çalışmaları

Kurutulmuş ve öğütölmüş numune Retsch marka AS 200 model Titreşimli elek sallayıcı ile tane boyutlarına ayrıldı. Herbir tane boyutundan 200 mg numuneden tartılarak 100 mL hacimli erlenmayere alındı. Üzerine aşağıda belirtilen miktarlarda pH:1 solüsyonundan ilave edildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30°C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzölerek 2 mL viale alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

Çizelge 4. 9. Farklı tane boyutlarında ekstraksiyon verimleri

Tane Boyutu	Arbutin Verimi %
500 µm	1,936
355 µm	2,070
250 µm	2,320
180 µm	2,424
125 µm	2,787
90 µm	2,820
63 µm	2,800

Ekstraksiyonda tane boyutuna bağılı olarak ekstraksiyon veriminin değişimi incelendiğinde tane boyutu küçöldükçe arbutinin ekstraksiyonu kolaylaşmaktadır. Ancak 125 mikron tane boyutundan sonra verim çok fazla değişmemektedir. Bu sonuç ekstrakte edilecek bitki yapraklarının 125 mikrona kadar öğütölmesinin yeterli olacağını göstermektedir.



Şekil 4. 9. Solvent miktarı ile arbutin veriminin değişimi

Şekil 4.9.'dan da görüleceği üzere 125 mikron tane boyutuna kadar tane boyutu azaldıkça ekstraksiyon veriminin arttığı görülmektedir. 125 mikron tane boyutundan itibaren ekstraksiyon verimi değişmemektedir. Bu sonuç ekstrakte edilecek numunelerin 125 mikron tane boyutuna öğütülmesinin yeterli olacağını göstermektedir.

4.6. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu Çalışmaları

Armut yapraklarından Arbutinin Ultrasonik destekli ekstraksiyonun optimizasyonu için üç değişken kullanıldı. Bu değişkenler ekstraksiyon zamanı, ekstraksiyon sıcaklığı ve metanol konsantrasyonu idi.

Çizelge 4. 10. Box-Behnken Tasarımı kullanılan bağımsız değişkenler, kodları ve gerçek değerleri

	Birimler	Parametrelerin Sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	1
Ekstraksiyon Sıcaklığı	⁰ C	(X1)	30	45	60
Ekstraksiyon Zamanı	Min	(X2)	15	30	45
Metanol Konsantrasyonu	%	(X3)	25	50	75

4.6.1.İstatistiksel Analizler

Üç tekrarlı deneylerin ortalamaları üzerine istatistiksel analizler Instat[®] software version 3.0 ün Anova Varyans Prosedürü kullanılarak yapıldı. Anova testi Design Expert programı kullanarak değişkenler ve yanıt arasındaki etkileşimi tanımlamak için uygulandı. Her numune için üç tekrarlı analizler yapıldı. HPLC Analizlerinin sonuçları ekstraksiyon verimliliğinin ortalaması olarak ifade edildi.

4.6.2.Optimizasyon Sonuçları

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Proses Değişkenlerinin Etkisi

Design Expert 8.0.7.1 ile tasarlanmış Box-Behnken Tasarımı çalışmalarının deneysel çalışmaları Çizelge 4.10.'da gösterilmektedir. Ayrıca Çizelge 4.11 ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon zamanı ve metanol konsantrasyonunun UAE ile elde edilen ekstraksiyon verimliliği üzerine etkilerini göstermektedir.

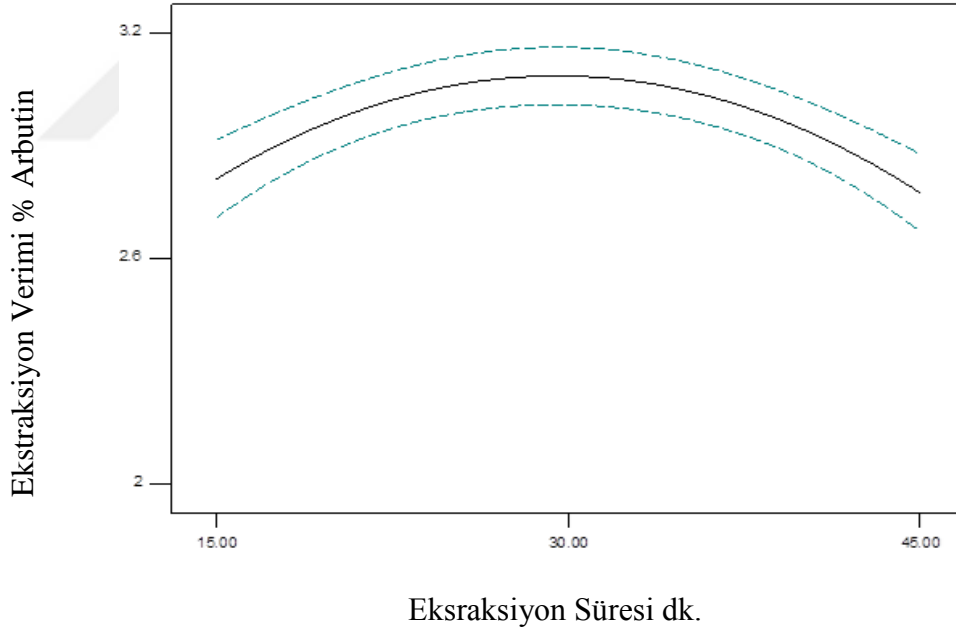
Çizelge 4. 11. Bağımsız değişkenlerin(X1, X2, X3) Box-Behnken Tasarımları ve ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar

Çalışma	Ekstraksiyon Sıcaklığı	Ekstraksiyon Zamanı	Metanol Konsantrasyonu	Arbutin Verim
	⁰ C	Min	%	%
1	45,00	45,00	50,00	3,03
2	30,00	30,00	50,00	2,31
3	45,00	45,00	75,00	2,70
4	45,00	45,00	25,00	2,54
5	30,00	30,00	50,00	2,34
6	60,00	60,00	50,00	2,24
7	60,00	60,00	25,00	2,26
8	45,00	45,00	50,00	3,13
9	45,00	45,00	50,00	3,09
10	60,00	60,00	50,00	2,23
11	45,00	45,00	25,00	2,41
12	60,00	60,00	75,00	2,23
13	45,00	45,00	50,00	3,11
14	45,00	45,00	75,00	2,76
15	30,00	30,00	75,00	2,66
16	30,00	30,00	25,00	2,37
17	45,00	45,00	50,00	3,07

*Veriler üç çalışmanın ortalamasıdır.

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Zamanının Etkisi

Arbutin ekstraksiyonu verimliliğine ekstraksiyon süresinin etkisi 15-45 dk. aralığında incelendi ve sonuçlar Çizelge 4.11.'de verilmiştir. Deney sonuçları Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi arbutinin optimum ekstraksiyon zamanı 30 dakika olduğunu göstermektedir. Ekstraksiyon süresi artırıldığı zaman, armut yapraklarının hücre duvarları tamamen ayrılıp ekstraksiyon verimi nispeten hızlansın diye arbutin sıvı materyale geçip difüze olmaktadır. Uzun ekstraksiyon zamanı süresince armut yapraklarının aşırı ısınması arbutin moleküllerinin doymamış bağlar gibi kararsız kimyasal bağları nedeniyle arbutinin termal bozunmasına sebep oldu ve sonra arbutin içeriği azaldı. Sonuç olarak arbutin ekstraksiyonu için tercih edilir ekstraksiyon süresi 30 dakikadır.

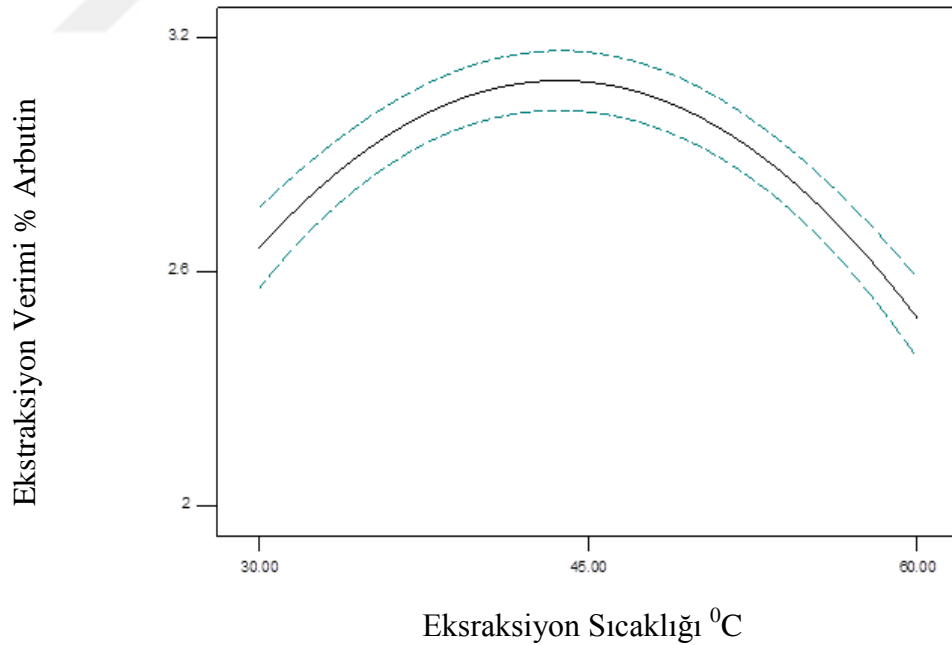


Şekil 4. 10. Ekstraksiyon zamanının ekstraksiyon performansı üzerine etkisi

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi

Ekstraksiyon işlemi 30°C'tan 60°C'a ekstraksiyon sıcaklığı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11.'de görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığı arbutin verimi üzerine açık etkilere sahiptir. Ekstraksiyon sıcaklığı artırıldığı zaman ekstraksiyon verimi hızla arttı ve 45°C ta maksimuma ulaştı.

Genelde yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyonlar bitki matriksinin aktif bölgelerinden çözünen maddenin iyi desorpsiyonu nedeniyle ekstraksiyon performansı ve kütle transferini artırır. Başlangıçta sıcaklığın yükselmesiyle ekstraksiyon veriminin artması yüksek sıcaklığın arbutinin bitki hücresinden kopmasını ve moleküler hareketi hızlandırmasından olabilir. 45°C ın üzerine çıktığı zaman ekstraksiyon verimi azalmaya başladı. 45°C tan daha büyük sıcaklıklar, arbutin yapısının bozulmasına neden oldu, bozunma reaksiyonunu hızlandırdı, arbutin aktivitesini kaybetti ve arbutin içeriği hızla azaldı. Sonuç olarak arbutin ekstraksiyonu için tercih edilir sıcaklık 45°C tır.

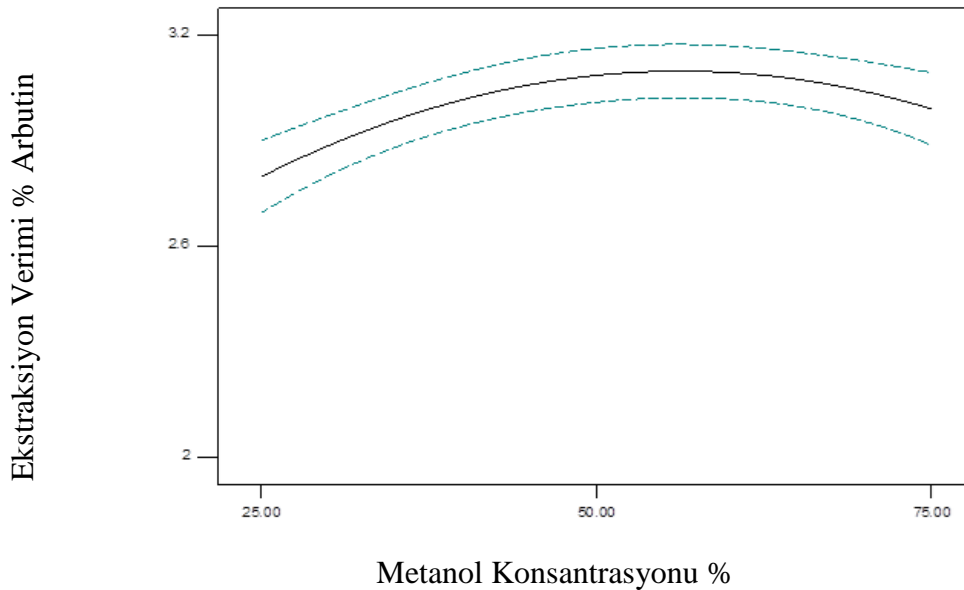


Şekil 4. 11. Ekstraksiyon sıcaklığının ekstraksiyon performansı üzerine etkisi

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Metanol Konsantrasyonunun Etkisi

%25 ten %75 e metanol konsantrasyonu kullanarak ekstraksiyon işlemleri yapıldı. Arbutinin ekstraksiyon verimi üzerine metanol konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.12. 'de gösterilmektedir. Başlangıç aşamasında metanol konsantrasyonunun %25 ten %60 a yükselmesiyle arbutinin ekstraksiyon verimi hızla arttı. %60'dan daha büyük metanol konsantrasyonunda arbutin ekstraksiyon verimini yavaşça azalma eğiliminde oldu. %60 metanol konsantrasyonunda maksimum verim elde edildi.

Bunun sebebi metanol konsantrasyonunun artması yüksek kütle transfer dinamiklerine, solventlerine ve armut yapraklarına tamamen erişime sebep olmasıdır. Metanol konsantrasyonu belli bir düzeye ulaştığı zaman arbutinin bir kısmının yüksek konsantrasyondaki metanolde çözünmesi zorlaştı. Ayrıca bu olay alkolde çözünür safsızlık içeriğinin artmasına ve arbutin içeriğinin kaybolmasıyla sonuçlanmasına sebep oldu. Ayrıca daha büyük metanol konsantrasyonu arbutinin saflaştırılmasını daha zorlaştırdı ve yüksek üretim maliyetiyle fazla atığa sebep oldu. Sonuç olarak arbutin ekstraksiyonu için %60 metanol konsantrasyonu oldukça iyi sonuç vermiştir.



Şekil 4. 12. Ekstraksiyon performansı üzerine metanol konsantrasyonunun etkisi

RSM İle Yapılan Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu

Aynı zamanda tek faktör yaklaşımı olarak bilinen proses değişkenlerinin bireysel etkileri önceki bölümlerde uygulandı. Bu klasik yaklaşım proses değişkenlerinin birbiri ile muhtemel etkileşimlerini ihmal eder. Yüzey yanıt metodolojisi (RSM) işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur.

Çizelge 4.11 minimum, orta ve maksimum noktaları içeren (metanol konsantrasyonu, zaman ve sıcaklık) üç parametreyi göstermektedir. On yedi deney çalışıldı ve koşullar Design-Expert software tarafından rastgele seçildi ve yanıtlar kaydedildi (Çizelge 4.11.).

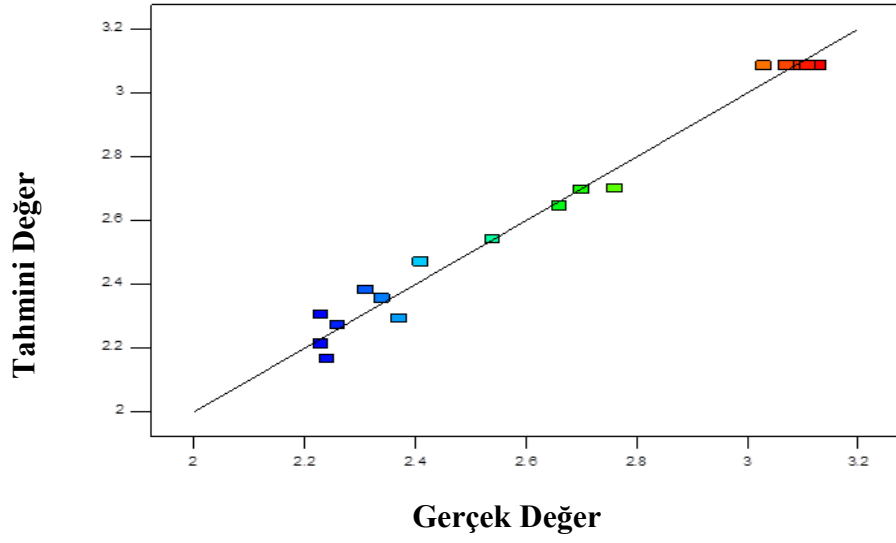
Design-Expert programında deneysel koşullar ve elde edilen yanıt girilerek optimizasyon için ikinci dereceden Quadratik bir model elde edildi. Yazılımdan RSM kullanarak aşağıda verilen ikinci dereceden bir model türetildi:

$$A = - 3,80125 + 0,21103 X_1 + 0,21103 X_2 + 0,042730 X_3 - 2,22222 \cdot 10^{-5} X_1 X_2 - 2,13333 \cdot 10^{-4} X_1 X_3 + 4,66667 \cdot 10^{-5} X_2 X_3 - 2,28556 \cdot 10^{-3} X_1^2 - 1,29667 \cdot 10^{-3} X_2^2 - 3,06800 \cdot 10^{-4} X_3^2 \quad (2)$$

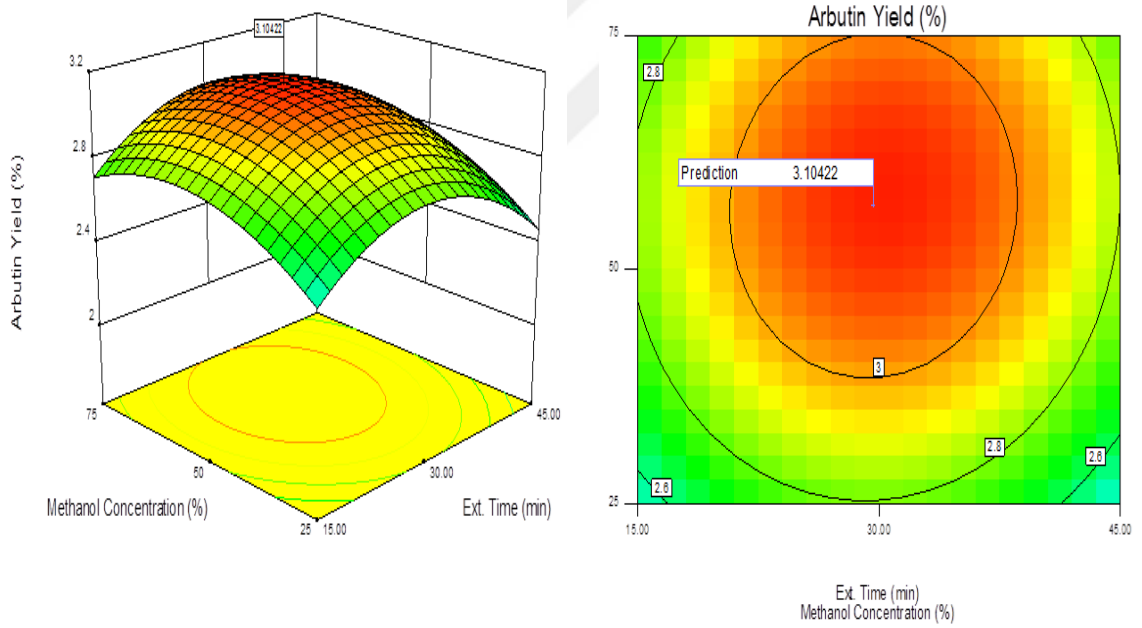
Çizelge 4.12.'de X_2 , $X_1 X_2$, $X_1 X_3$, $X_2 X_3$, $X_3 X_4$ model için uygun olmayan terimlerdir. Onların regresyon katsayıları hariç tutularak yeni koşulun daha iyi açıklanması için yeni bir model verilebilir.

$$A = - 3,80125 + 0,21103 X_1 + 0,042730 X_3 - 2,28556 \cdot 10^{-3} X_1^2 - 1,29667 \cdot 10^{-3} X_2^2 - 3,06800 \cdot 10^{-4} X_3^2 \quad (3)$$

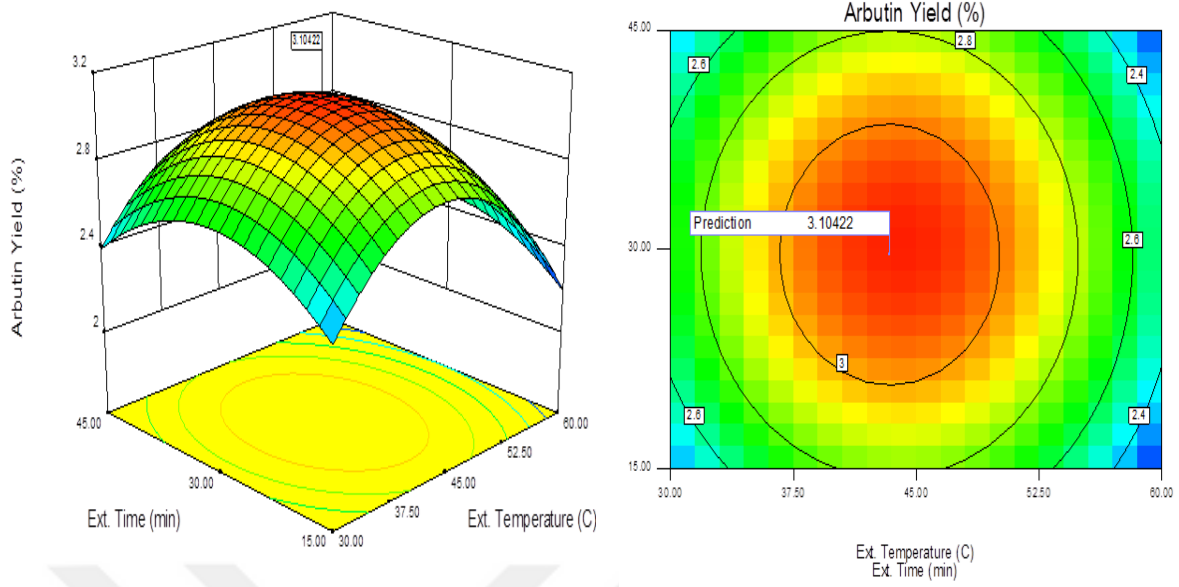
Bu denklemden arbutin için hesaplanmış teorik geri kazanım değerleri pratikte elde edilenlere karşı grafiği çizildi. Bu ilişkiler Şekil 4.13.'de gösterilmiştir.



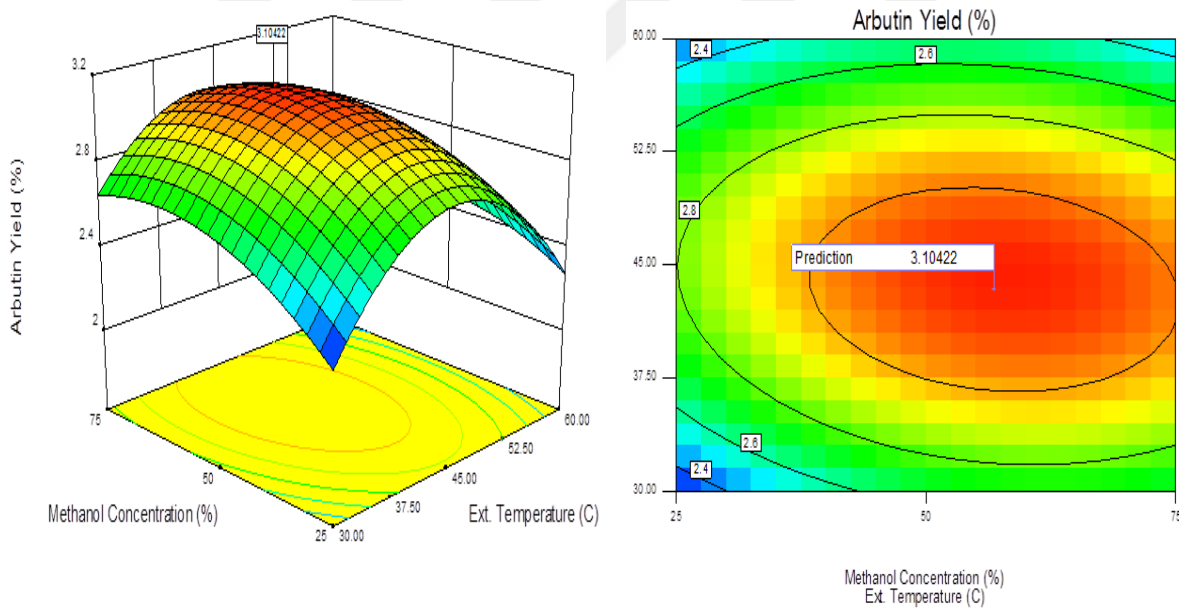
Şekil 4. 13. Model denklem kullanılarak hesaplanmış değerlere karşı deneysel olarak elde edilmiş ekstraksiyon verimi değerleri arasındaki ilişki



Şekil 4. 14. Metanol konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 4. 15. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 4. 16. Metanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığı etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri

Optimum ekstraksiyon koşulları yanıtı maksimize etmek için Design-Expert yazılımında optimizasyon sekmesinin kullanılarak bulundu. Bu değerler %56,81 metanol konsantrasyonu, 29,66 dakika ekstraksiyon zamanı ve 43,37⁰C ekstraksiyon sıcaklığı olarak belirlendi. Bu işletme koşulları altında maksimum yanıt (% 3,10) olarak bulundu. Optimum ekstraksiyon koşullarını bulduktan sonra gerçek numunede ekstraksiyon deneyleri 6 kez tekrarlandı ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplandı.

Ortalama: % 3,11

Standard Sapma: 0,02

Relatif Standart Sapma: 0,45

Arbutin Verim: % 3,11

Model Uydurma

Design Expert 8.0.7.1 ten elde edilen Anova Varyans analizi sonuçları Çizelge 4.12.'de verilmiştir. En uygun değişkenleri elde etmek için adım regresyonu kullanıldı. Bu prosese göre verilen değişkenler verilen alfa düzeyleri (0,1) içinde hem geri hem ileri teknikler kullanılarak test edilir ve değerlendirilir.

Parametrelerin tespiti için geri teknikler tüm değişkenleri içerir. Sonra alfa düzeylerinde uygun olmayan parametrelere sahip değişkenler denklemden atılır. Bu işlem uygun olmayan değişken kalmayıncaya kadar devam eder. Geri tekniklere benzer bir şekilde ileri tekniklerde verilen alfa düzeyleri içinde verilen değişkenleri değerlendirir.

Geri tekniklerden farklı olarak ileri teknikler denklemden bulunmayan hiç bir değişkenle başlamaz. Denkleme ($p < 0,05$) olan değişkenler katılır. ($p > 0,05$) olan değişkenler sistemden atılır. Bu proses uygun olmayan hiçbir değişken kalmayıncaya kadar devam eder.

Design Expert 8.0.7.1 programının ikinci derece denklemleri için ANOVA testi sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Regresyon analizleri % 95 güven aralığında yapıldı. Elde edilen modelin f değeri 41,46 dır ve $p < 0,0001$ olması türetilmiş modelin uygun olduğunu göstermektedir.. (X1), (X3), (X1²), (X2²), (X3²) terimleri güven aralığı içinde uygun model terimleridir. (Çizelge 19).

Yakın ve daha yüksek çoklu katsayılar (R-Squared, Adj R-Squared ve Pred R-Squared) modelin yüksek doğruluğuna işaret etmektedir. Adj R-Squared ayrıca gerçek ve tahmin edilen değerler arasındaki yüksek derecedeki ilişkiyi göstermektedir. Çizelge 4.12.’de görüldüğü gibi metanol konsantrasyonu (X3) yanıt üzerine en uygun değişkendir. Uyum eksikliğinin f değeri (6,90) nın uygun olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, Ekstraksiyon verimi için R-Squared (0,9816); Adj R-Squared (0,9579) ve Pred R-Squared (0,7485) değerleri türetilmiş modelin doğruluğunu göstermektedir. Sonuç olarak armut yapraklarından UAE ile ekstraksiyon verimini tespit etmek için yüzey yanıt modellemesi yeterince başarılı olabilir.

Ayrıca varyasyon katsayısı değeri 2,76 olarak bulunmuştur. Varyasyon katsayısı ne kadar düşük olursa deneysel sonuçların güvenilirliği ve hassasiyeti o kadar yüksek olur.

Regresyon denklemi katsayıları hesaplandı ve veriler ikinci dereceden polinom denklemine uyduruldu. Armut yapraklarından arbutin ekstraksiyonu yanıtı aşağıdaki denklemle ifade edilebilir.

$$A = - 3,80125 + 0,21103 X_1 + 0,042730 X_3 - 2,28556 \cdot 10^{-3} X_1^2 - 1,29667 \cdot 10^{-3} X_2^2 - 3,06800 \cdot 10^{-4} X_3^2 \quad (3)$$

Çizelge 4. 12. Yüzey yanıt ikinci dereceden model için (ANOVA) varyans analizleri

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Kareler Ortalaması	F Değeri	p-Değeri Prob > F	
Model	1,95	9	0,220	41,46	< 0,0001	Uygun
X1-Ekstraksiyon Sıcaklığı	0,065	1	0,065	12,41	0,010	Uygun
X2-Ekstraksiyon Süresi	$2,812 \cdot 10^{-3}$	1	$2,81 \cdot 10^{-3}$	0,54	0,487	
X3-Metanol Konsantrasyonu	0,074	1	0,074	14,20	0,007	Uygun
X1X2	$1,00 \cdot 10^{-4}$	1	$1,00 \cdot 10^{-4}$	0,019	0,894	
X1X3	0,026	1	0,026	4,90	0,062	
X2X3	$1,23 \cdot 10^{-3}$	1	$1,23 \cdot 10^{-3}$	0,230	0,643	
X1 ²	1,11	1	1,11	213,28	< 0,0001	Uygun
X2 ²	0,360	1	0,360	68,65	< 0,0001	Uygun
X3 ²	0,150	1	0,150	29,65	0,001	Uygun
Artık Değer	0,037	7	$5,22 \cdot 10^{-3}$			
Uyum Eksikliği	0,031	3	0,010	6,90	0,047	Uygun
Hata	$5,92 \cdot 10^{-3}$	4	$1,48 \cdot 10^{-3}$			

Çizelge 4. 13. Optimizasyon sonucu

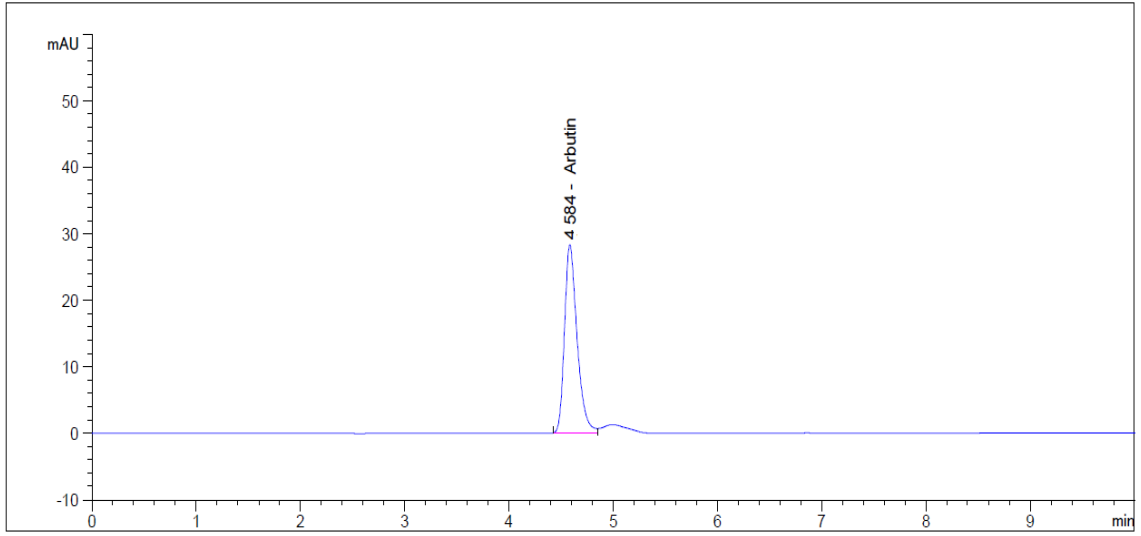
Optimizasyon Sonucu			
Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon Süresi (dk.)	Metanol Konsantrasyonu (%)	Arbutin Verim (%)
43,368	29,663	56,810	3,104

ANOVA dan elde edilen regresyon denklemi gösterdiği R^2 (çoklu korelasyon katsayısı) 0,9816 idi (0,75 in üzerinde bir değer modelin uygunluğunu göstermektedir. Bu modelin hesapladığı datalarda genel varyasyonun belirlenmesiydi. Böylece bu model yanıtta varyasyonun %98,16'sını açıklamaya muktedirdi. Adjusted $R^2 = 0,9579$ ve Predicted $R^2 = 0,7485$ olarak belirlendi, bu modelin iyi olduğunu gösterdi. (İyi bir istatistiksel model için, R^2 değeri 0–1,0 aralığında olmalı, ve bu değer 1,0 e yakındı. Mevcut modelin adequate precision değeri 16,597 idi ve bu ayrıca gösteriyor ki tasarım için bu model kullanılabilir. Adequate precision değeri signal/gürültü oranının bir göstergesidir ve 4 ten büyük değerler bir modelin iyi olması için temel ön koşullardır. Aynı zamanda, varyasyon katsayısının (CV = 2,76 %) nispeten daha düşük değerleri yapılan değerlerin güvenilirliğini ve daha iyi bir kesinliğini gösterdi.

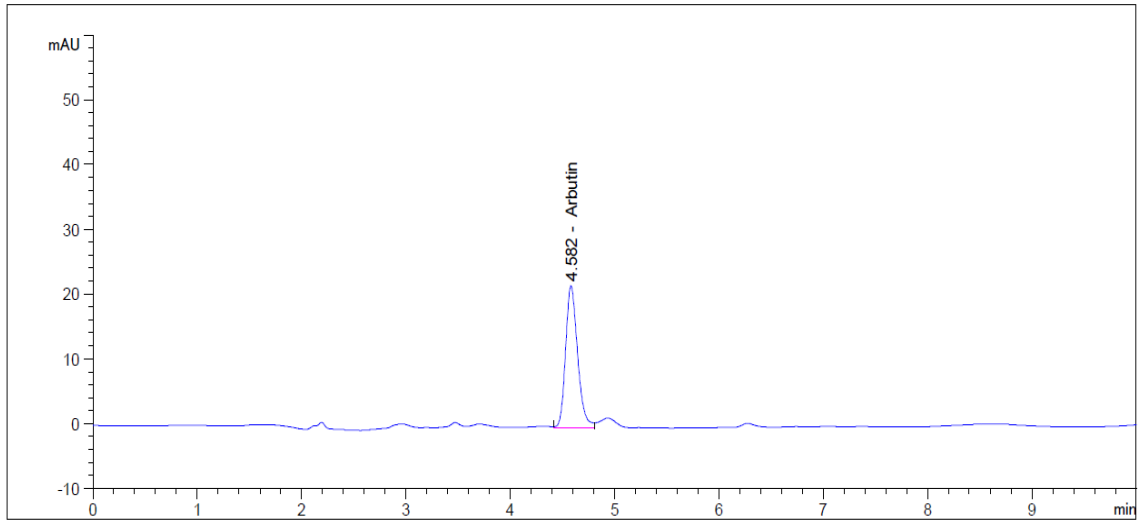
Sonuç olarak, kurutulmuş armut kabuklarından ekstraksiyon verimini tahmin etmek için yüzey yanıt metodu başarılı bir şekilde uygulanabilir. Varyasyon katsayısının düşük değerleri deney sonuçlarının güvenilirliğini ve kesinliğini göstermektedir. Çalışmamızda katsayı değeri (C.V.) 2,76 idi.

Çizelge 4.13. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile elde edilen armut yaprakları ekstraktının ekstraksiyon verimi ile ilgili denklem 2 den hesaplanan datalarla deneysel datalar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Modelden hesaplanan datalar işletme koşulları aralığında deneysel datalar ile uyum içindedir.

Şekil 4.17 arbutin standardı solüsyonunun kromatogramını göstermektedir. Şekil 4.18. armut yaprağı ekstraktının kromatogramını göstermektedir.



Şekil 4. 17. Standart solusyonun kromatogramı (konsantrasyon: 150 ppm)



Şekil 4. 18. Armut yaprağı ekstraktının kromatogramı

4.6.3.Ultrason Gücü ve Solvent/Katı Oranının Optimizasyonu Çalışmaları

Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon zamanı ve metanol konsantrasyonu gibi optimizasyon parametreleri optimize edildikten sonra Solvent/Katı Oranı, Ultrason Gücü ve Metanol Konsantrasyonu gibi parametreler de optimize edildi.

Çizelge 4. 14. Box-Behnken Tasarımı kullanılan bağımsız değişkenler, kodları ve gerçek değerleri

Bağımsız Değişkenler	Birimler	Parametrelerin Sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	1
Solvent/Katı Oranı	ml/200 mg Numune	(X1)	30	45	50
Ultrason Gücü	W	(X2)	360	420	480
Metanol Konsantrasyonu	%	(X3)	25	50	75

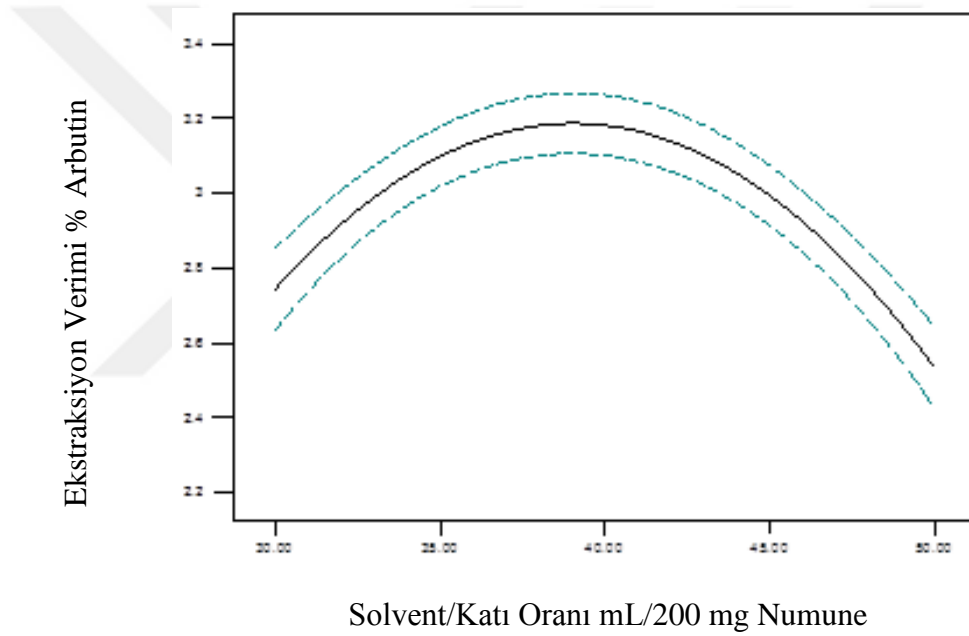
Çizelge 4. 15. Bağımsız değişkenlerin (X1, X2, X3) Box-Behnken Tasarımları ve ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar

Çalışma	Solvent/Katı Oranı	Ultrason Gücü	Metanol Konsantrasyonu	Arbutin Verim
	ml/200 mg Numune	W	%	%
1	40	420	50	3,10
2	30	360	50	2,33
3	40	480	75	2,83
4	40	360	25	2,65
5	30	480	50	2,45
6	50	480	50	2,35
7	50	420	25	2,35
8	40	420	50	3,20
9	40	420	50	3,18
10	50	360	50	2,20
11	40	480	25	2,53
12	50	420	75	2,20
13	40	420	50	3,20
14	40	360	75	2,65
15	30	420	75	2,68
16	30	420	25	2,48
17	40	420	50	3,23

*Veriler üç çalışmanın ortalamasıdır.

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Solvent/Katı Oranının Etkisi

Arbutin ekstraksiyonu verimliliğine Solvent/Katı oranının etkisi 30-50 mL/200 mg Numune aralığında incelendi ve sonuçlar Çizelge 4.15.'de verilmiştir. Deney sonuçları Şekil 4.19.'da görüldüğü gibi arbutinin optimum Solvent/Katı oranının etkisi 40 mL/200 mg olduğunu göstermektedir. Solvent/Katı oranının artırıldığı zaman, Fick Yasası uyarınca arbutin yapraklarının hücre duvarları tamamen ayrılıp ekstraksiyon verimi nispeten hızlansın diye arbutin sıvı materyale geçip difüze olmaktadır.

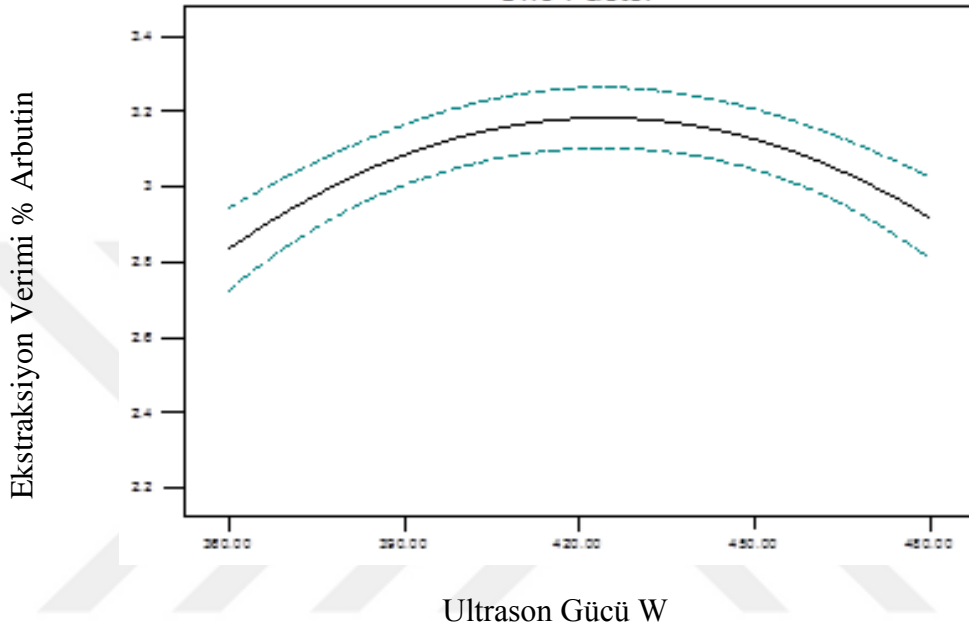


Şekil 4. 19. Solvent/Katı oranının ekstraksiyon performansı üzerine etkisi

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ultrason Gücünün Etkisi

Ekstraksiyon işlemi 360 W'tan 420 W'a ultrason gücü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığı arbutin verimi üzerine açık etkilere sahiptir. Ultrason gücü artırıldığı zaman ekstraksiyon verimi hızla arttı ve 420 W' ta maksimuma ulaştı.

420 W ın üzerine çıktığı zaman ekstraksiyon verimi azalmaya başladı. 420 W'tan daha büyük ultrason gücü, arbutin yapısının bozulmasına neden oldu, bozunma reaksiyonunu hızlandırdı, arbutin aktivitesini kaybetti ve arbutin içeriği hızla azaldı. Sonuç olarak arbutin ekstraksiyonu için tercih edilir ultrason gücü 420 W tır.



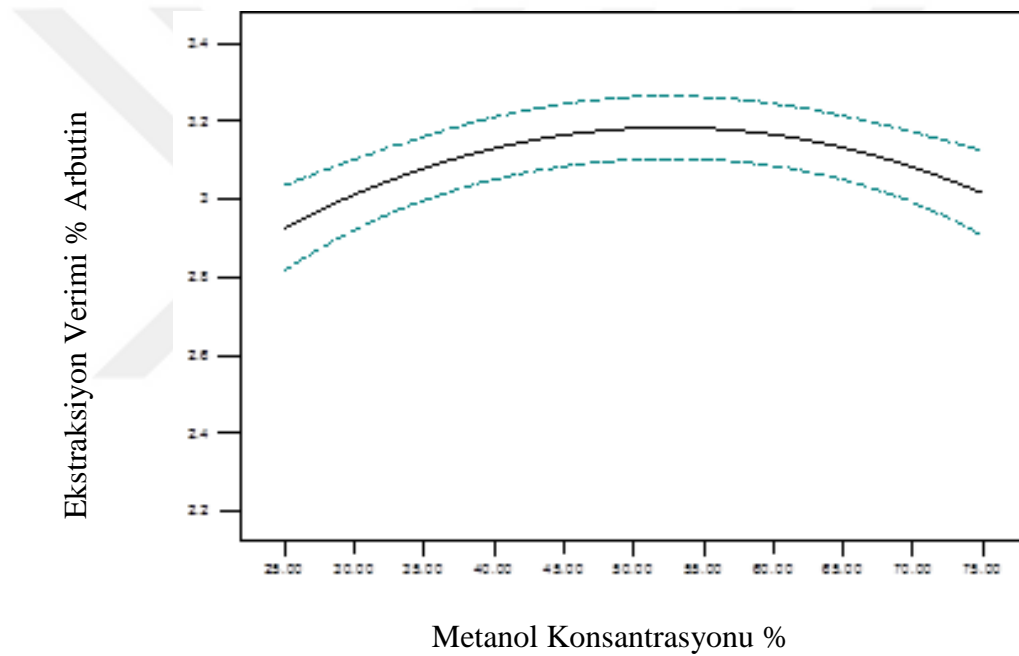
Şekil 4. 20. Ultrason gücünün ekstraksiyon performansı üzerine etkisi

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Metanol Konsantrasyonunun Etkisi

%25 ten %75 e metanol konsantrasyonu kullanarak ekstraksiyon işlemleri yapıldı. Arbutinin ekstraksiyon verimi üzerine metanol konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.21.'de gösterilmektedir. Başlangıç aşamasında metanol konsantrasyonunun %25'ten %55'e yükselmesiyle arbutinin ekstraksiyon verimi hızla arttı. %55'den daha büyük metanol konsantrasyonunda arbutin ekstraksiyon verimini yavaşça azalma eğiliminde oldu. %55 metanol konsantrasyonunda maksimum verim elde edildi.

Bunun sebebi metanol konsantrasyonunun artması yüksek kütle transfer dinamiklerine, solventlerine ve armut yapraklarına tamamen erişime sebep olmasıdır.

Metanol konsantrasyonu belli bir düzeye ulaştığı zaman arbutinin bir kısmının yüksek konsantrasyondaki metanolde çözünmesi zorlaştı. Ayrıca bu olay alkolde çözünür safsızlık içeriğinin artmasına ve arbutin içeriğinin kaybolmasıyla sonuçlanmasına sebep oldu. Ayrıca daha büyük metanol konsantrasyonu arbutinin saflaştırılmasını daha zorlaştırdı ve yüksek üretim maliyetiyle fazla atığa sebep oldu. Sonuç olarak arbutin ekstraksiyonu için %55 metanol konsantrasyonu oldukça iyi sonuç vermiştir.

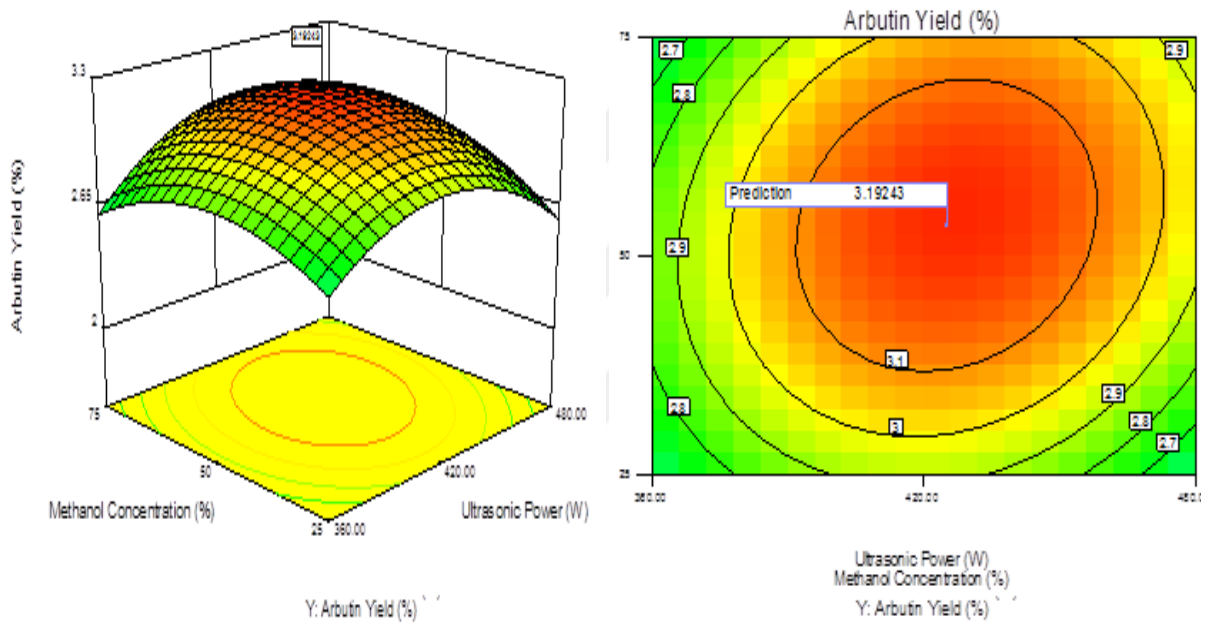


Şekil 4. 21. Ekstraksiyon performansı üzerine metanol konsantrasyonunun etkisi

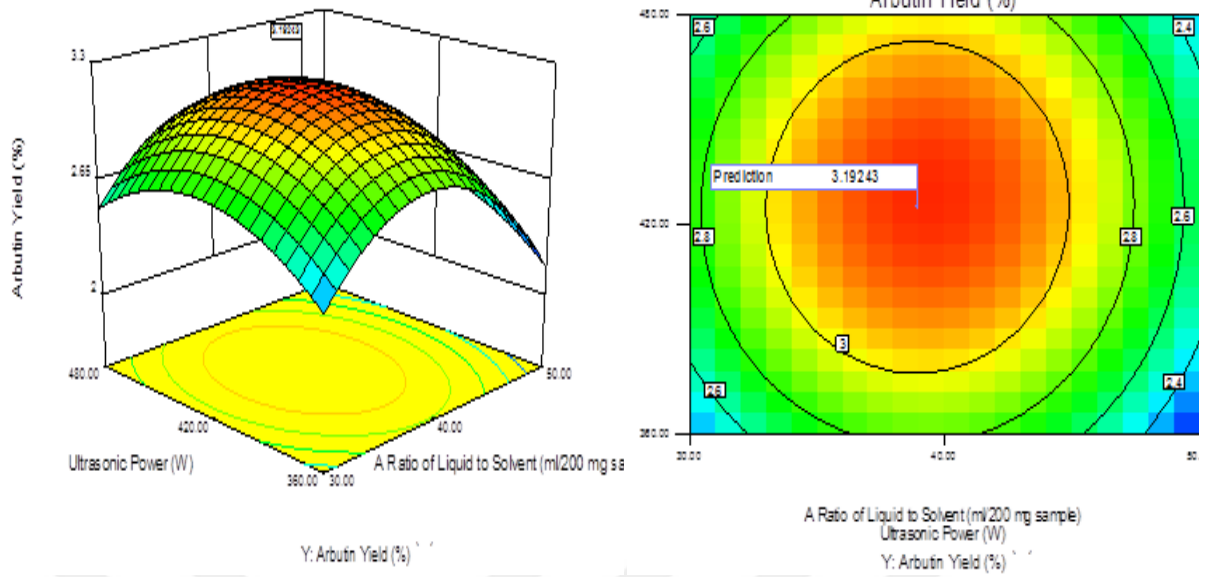
RSM İle Yapılan Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu

Aynı zamanda tek faktör yaklaşımı olarak bilinen proses değişkenlerinin bireysel etkileri önceki bölümlerde uygulandı. Bu klasik yaklaşım proses değişkenlerinin birbiri ile muhtemel etkileşimlerini ihmal eder.

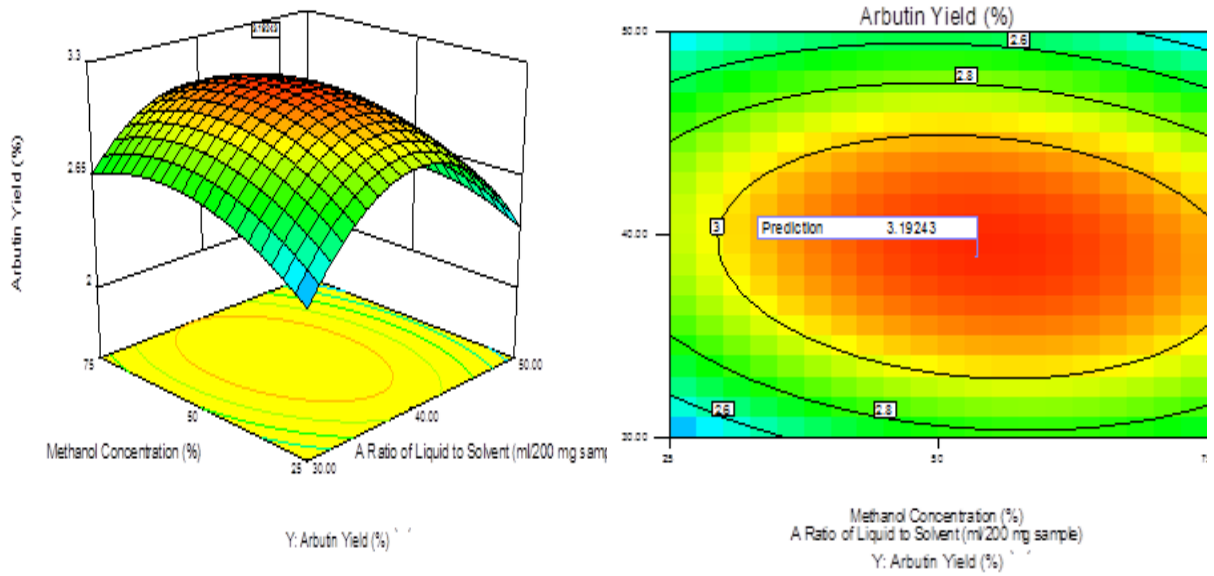
Yüzey yanıt metodolojisi (RSM) işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur. Çizelge 4.15. minimum, orta ve maksimum noktaları içeren (Solvent/Katı Oranı, Ultrason Gücü ve Metanol Konsantrasyonu) üç parametreyi göstermektedir. On yedi deney çalışıldı ve koşullar Design-Expert software tarafından rastgele seçildi ve yanıtlar kaydedildi. Design-Expert programında deneysel koşullar ve elde edilen yanıt girilerek optimizasyon için ikinci dereceden Quadratik bir model elde edildi.



Şekil 4. 22. Metanol konsantrasyon ve ultrason gücünün etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 4. 23. Ultrason Gücü ve Solvent/Katı Oranının etkileşimli etkilerini gösteren arbutin ekstraksiyonu için üç boyutlu bir yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 4. 24. Metanol Konsantrasyonu ve Solvent/Katı Oranının Etkileşimli Etkilerini Gösteren Arbutin Ekstraksiyonu için üç Boyutlu bir Yüzey Yanıt ve Kontur Grafikleri

Belirlenen aşağıdaki optimum koşullar aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Çizelge 4. 16. Optimum koşullar

Solvent /Katı Oranı ml/200 mg Numune	Ultrason Gücü W	Metanol Konsantrasyonu %	Arbutin Verim %
38,93	424,99	53,51	3,19

4.7. Tıbbi Bitkilerde Arbutin İçeriğinin Belirlenmesi Çalışmaları

Belirlenen aşağıdaki optimum koşullar kullanılarak bazı tıbbi bitkilerde arbutin içeriği belirlenmiştir.

Çizelge 4. 17. Toplam optimum koşullar

Solvent /Katı Oranı ml/200 mg Numune	Ultrason Gücü (W)	Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon Süresi (dk.)	Metanol Konsantrasyonu (%)
38,93	424,99	43,368	29,663	56,810

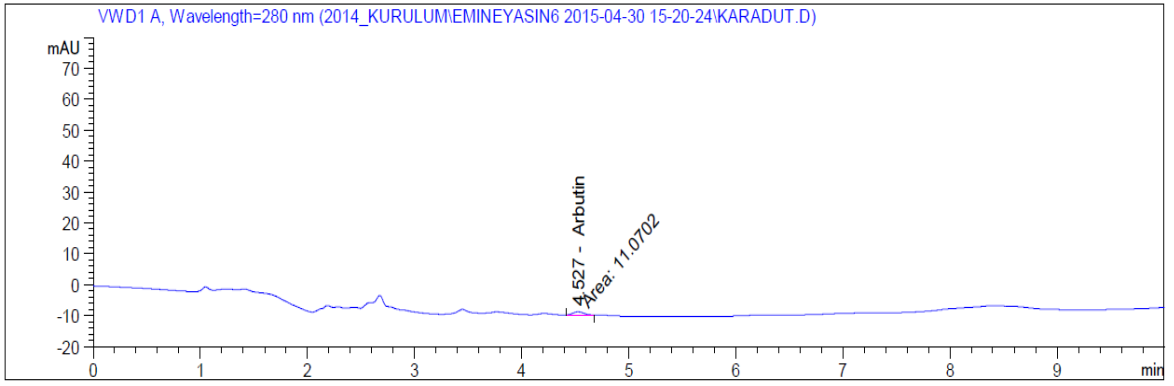
Optimize edilen ekstraksiyon prosesi ve valide edilen HPLC Analiz metodu kullanılarak bazı tıbbi bitkilerdeki arbutin içeriği belirlenmiştir. Bunun için: Armut, Kızılcık, Mersin, Yaban mersini, Beyazdut, Karadut, Kekik ve Ayı üzümü yaprakları kullanılmıştır.

Ayı üzümü, Mersin ve Yaban mersini yaprakları Karadeniz Bölgesi Rize'den 2014 yılı Mayıs ayında, Beyazdut, Karadut, Kızılcık ve Armut yaprakları 2014 yılı Mayıs ayında Uşak'tan toplanmıştır. Karanlık odada 15 gün süreyle kurutulmuş ve ekstraksiyon öncesi öğütülmüştür. 200 mg kurutulmuş ve öğütülmüş numunelerden tartılarak 100 mL hacimli erlene alındı.

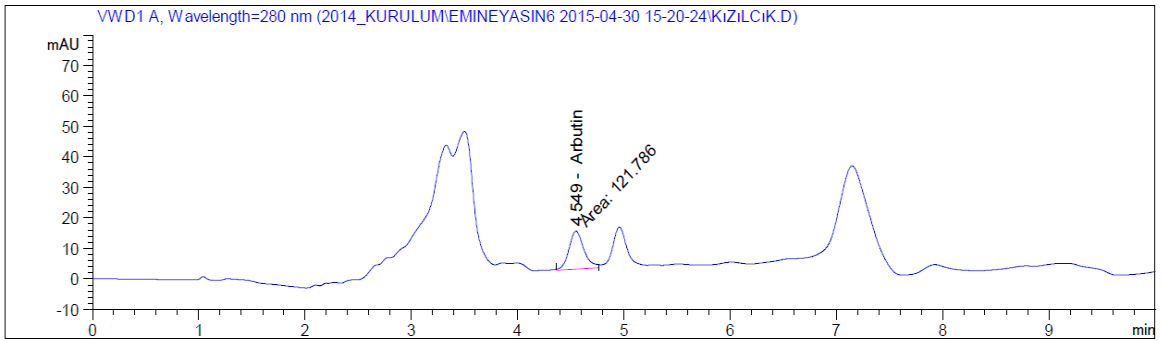
Üzerine aşağıda belirtilen miktarlarda % 56,81 metanol içeren pH:1 solusyonundan 50 mL ilave edildi. Erlenlerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 29,66 dakika süreyle ultrasonik banyoda 43,37 °C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım önce beyaz bant süzgeç kâğıdından sonra 0,45 mikron enjektör ucu filtre ile süzülerek 2 mL vialle alındı. HPLC cihazı ile arbutin içeriği belirlendi.

Çizelge 4. 18. Farklı bitki yapraklarında arbutin içerikleri

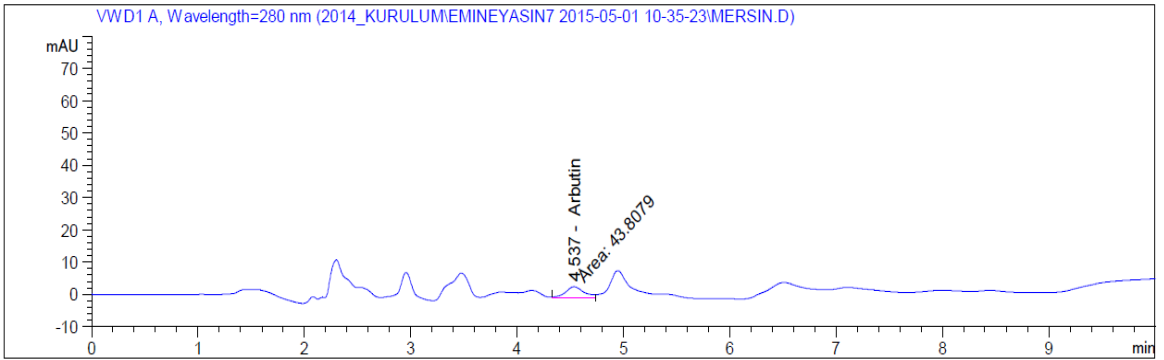
Bitki Yaprakları	Arbutin Verimi %
Kızılcık	0,370
Armut	3,104
Ayı Üzümü	12,716
Kekik	0,043
Beyaz Dut	Belirlenemedi
Kara Dut	0,035
Civan Perçemi	Belirlenemedi
Mersin	0,135
Yaban Mersin	0,100



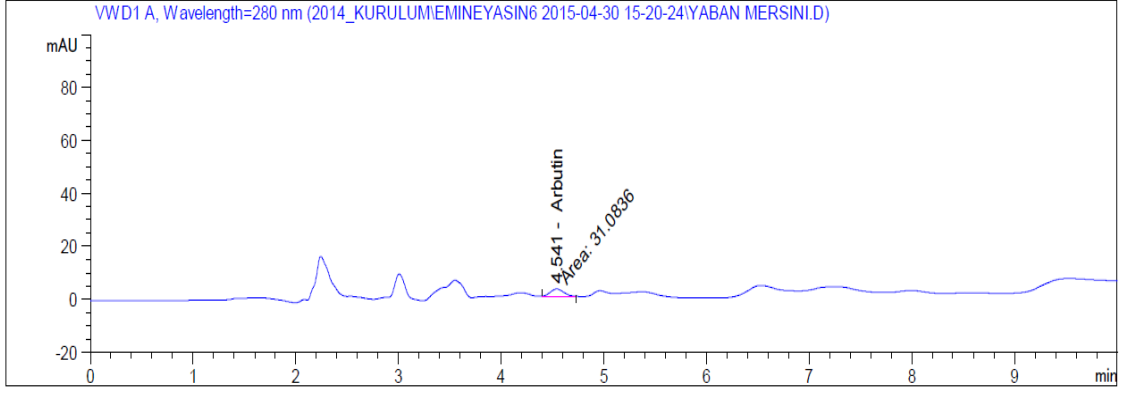
Şekil 4. 25. Karadut yaprağı ekstraktının kromatogramı



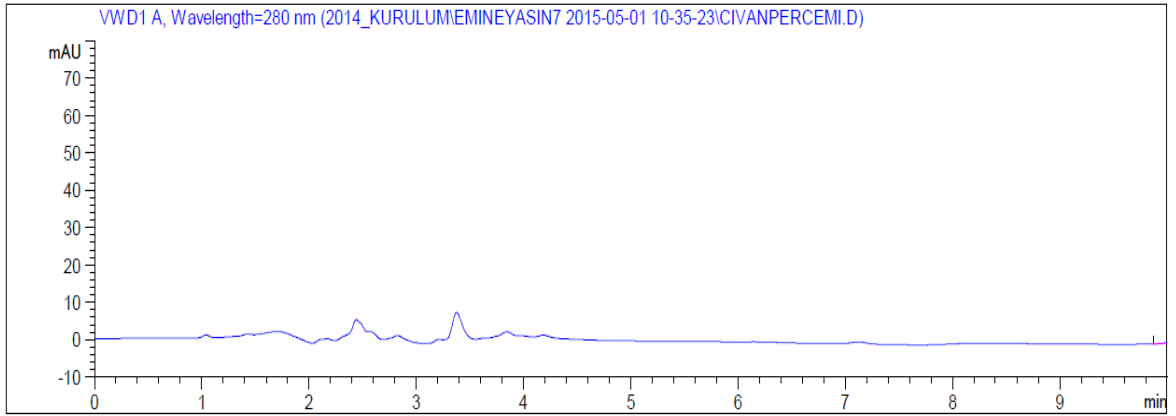
Şekil 4. 26. Kızılık yaprağı ekstraktının kromatogramı



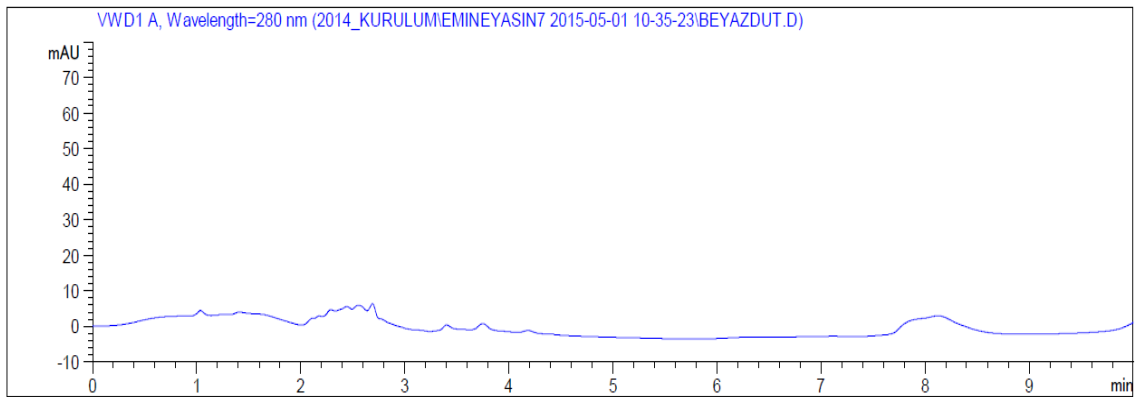
Şekil 4. 27. Mersin yaprağı ekstraktının kromatogramı



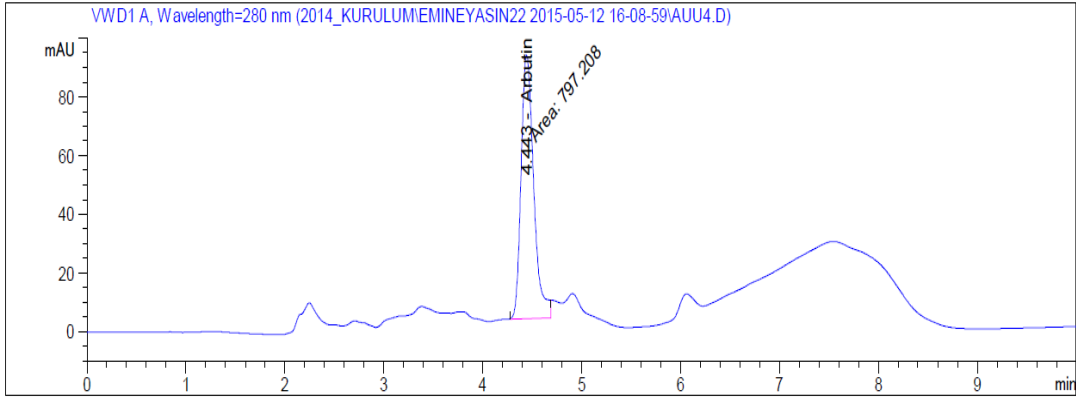
Şekil 4. 28. Yaban Mersini yaprağı ekstraktının kromatogramı



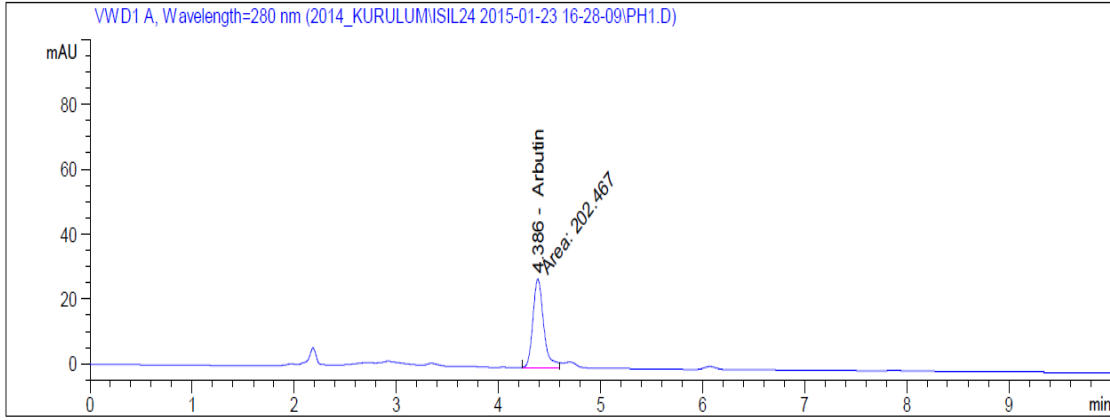
Şekil 4. 29. Civanperçemi ekstraktının kromatogramı



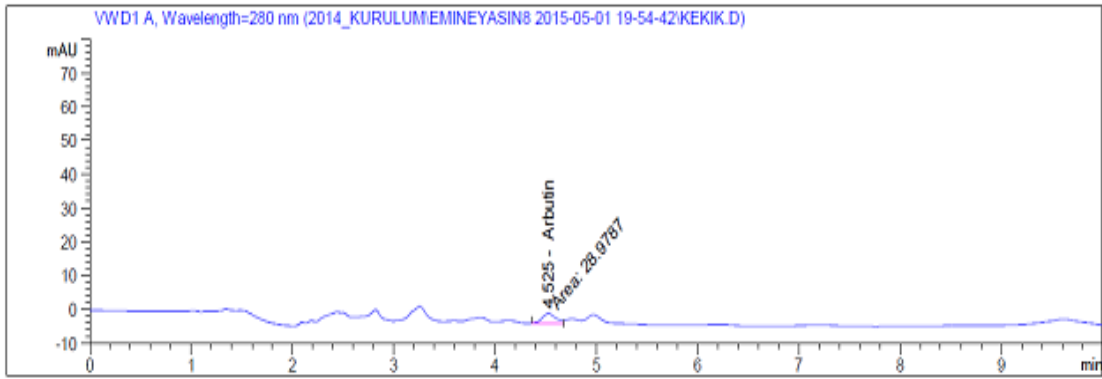
Şekil 4. 30. Beyazdut yaprağı ekstraktının kromatogramı



Şekil 4. 31. Ayı Üzümlü Yaprığı Ekstraktının Kromatogramı



Şekil 4. 32. Armut yaprağı ekstraktının kromatogramı



Şekil 4. 33. Kekik yaprağı ekstraktının kromatogramı

Çizelge 4. 19. *Pyrus elaeagnifolia*, *Pyrus anatolica* ve *Pyrus amygdaliformis*'nin yaprak, dal, ve meyvesinde bulunan arbutin miktarı

<i>Pyrus comminus</i>		<i>Pyrus elaeagnifolia</i>		<i>Pyrus anatolica</i>		<i>Pyrus amygdaliformis</i>	
Kaynak	Arbutin %	Kaynak	Arbutin %	Kaynak	Arbutin %	Kaynak	Arbutin %
Yaprak	3,10	Yaprak	5,37	Yaprak	4,74	Yaprak	8,13
Dal	4,20	Dal	4,29	Dal	4,46	Dal	4,10
Meyve	0,08	Meyve	0,06	Meyve	0,11	Meyve	0,07

5. TARTIŞMA

Ülkemizde yetişen farklı armut türlerinin yaprak, dal ve meyvelerinde arbutin içeriğinin belirlenmesi için HPLC analiz metodu geliştirilip valide edildi ve arbutinin ultrasonik destekli ekstraksiyonu için metot geliştirilip optimize edildi. Optimizasyonda ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon zamanı ve çözücü bileşimi ekstraksiyon parametresi olarak kullanıldı. Ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü bileşimi arbutin ekstraksiyonu için önemli bir etki gösterdi. Ekstraksiyon parametreleri Design Expert programında Box Behnken tasarımı kullanılarak ekstraksiyon parametreleri optimize edilmiştir. Ekstraksiyon süresi (29,66 dakika), sıcaklık (43,37°C), çözücü bileşim 56,81% metanol, katı/solvent oranı (38,93 mL/200 mg), ultrason gücü 424,99 W olduğu bulunmuştur. İkinci derece polinom modelinin deney verilerini tarif etmek için yeterli olduğu bulunmuştur. Armut yapraklarından alınan maksimum arbutin verimi deneysel % 3,10 tespit edilmiştir. Geliştirilen polinom denklemden hesaplanan verim ise Arbutin (%): 3,11 olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı, metanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresinin UAE ile elde edilen EY üzerinde en önemli etkiye sahip en uygun şartları bulduktan sonra, gerçek numune ekstraksiyonu deneyleri 6 kez tekrarlandı ve daha sonra, bağıl standart sapma ile ortalama hesaplandı. Arbutin (%): $3,11 \pm 0,02$.

KAYNAKÇA

- [1] Baytop, T. 1984. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3255. Eczacılık Fakültesi. İstanbul.
- [2] Başer, H. C. 1998. Tıbbi ve aromatik bitkilerin endüstriyel kullanımı. TAB Bülteni. 13-14:19-43. Anadolu Üniversitesi. Eskişehir
- [3] Kaya, G. “ Tıbbi Bitki rezervi olarak orman kaynaklarının gelecek değerinin belirlenmesinde kullanılan P&P modelinin irdelenmesi” ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 8 (9):23-32, (2006)
- [4] Grabley S, Thiericke R (Eds). Drug Discovery from Nature, Springer, Berlin, 347 s. (2000)
- [5] wikipedia:<https://en.wikipedia.org/Arbutin> adrsinden alınmıştır.
- [6] Özbek. S., 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Adana, 128 S.
- [7] Layne, R.E.C., Quamme, H.A., 1975. Pears. P. 38-70. In: Janick, J., Moore, J.N., (eds.). Advances in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press. West Lafayette, Ind.
- [8] Ünal, A., Saygılı, H., Hepaksoy, S., Can, H.Z., Türküsay, H., 1997. Ege Bölgesinde Armut Yetiştiriciliği Ve Seçilen Bazı Armut Çeşitlerinin Pomolojik Özellikleri. Yumuşak Çekirdekli Meyveler Sempozyumu (Yalova): 29-35.
- [9] Challice. J, Westwood M.N., 1973. Numerical Taxonomic Studies Of The Genus *Pyrus* Cilt 1: 396-400. 04-07 Eylül 2007, Bot J Linn Soc 67:121-148.
- [10] Westwood, M.N., 1982. Pear Germplasm Of The New National Clonal Repository: Its Evaluation And Uses. Acta Hort. 124: 57-65.
- [11] Bell, R.L., Hough, L.F., 1986. Interspecific And Intergenic Hybridization Of *Pyrus*.
- [12] Bell, R.L., Quamme, H.A., Layne, R.E.C., Skirvin, R.M., 1996. Pears. In: Janick J, Moore JN (eds), Fruit breeding, volume I: tree and tropical fruits. John Wiley and Sons Inc, K, 441-514.
- [13] Hancock, J.F, Lobos , G.A., 2008. Pears In: J.F., Hancock (eds) Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics. East Lansing, pp:299-336.
- [14] Wolko, L., Antkowiak, W., Lenartowicz, E., Bocianowski, J., 2010. Genetic Diversity Of European Pear Cultivars (*Pyrus Communis* L.) And Wild Pear (*Pyrus Pyrastr(L.)*Burgsd. Inferred From Microsatellite Markers Analysis, Genet Resour Crop Evol (2010) 57: 801-806 S
- [15] Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyaroğlu, 2004. Armut. Ilıman İklim Meyve Türleri, Yumuşak Çekirdekli Meyveler (Cilt-II). Ege Üniv. Zir. Fak.
- [16] Anonim, 2013. <http://faostat.fao.org/> Web Sayfası. FAO Statistical Databases, Agriculture, Crop (Erişim Tarihi: 03/05/2015).

- [17](February 15, 2010). "*Pyrus amygdaliformis* Vill.". *Taxonomy for Plants*. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland: USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Retrieved September 21, 2013
- [18] Dostálek, Jiří (1980). "*Pyrus spinosa* und ihre Hybriden in Südwestbulgarien". *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* (in German) (Springer) **15**(1): 59-73. doi:10.2307/4180153. JSTOR 4180153
- [19] Chukarena et al., 2007; Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Codina C (2001). A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by HPLC. *Phytochem Anal* 12(5):336-339.
- [20] Pyka A, Bober K, Stolarczyk A (2007). Densitometric determination of arbutinin cowberry leaves (*Vaccinium Vitis-idaeae*). *Acta Pol Pharm* 63(5):395-400.
- [21] Frohne D. (1989) Bärentraube. In Wichtl M, ed. *Teedrogen*, 2nd ed. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 72–74.
- [22] HORI, Y., RULIFSON, I.C., TSAI, B.C., HEIT, J.J., CAHOY, J.D. and KIM, S.K. (2002). Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16105-16110.
- [23] O'Donoghue JL. "Hydroquinone and its Analogues in Dermatology - A Risk-Benefit Viewpoint", *J Cos Derm.* 2006; 5(3):196-203.
- [24] Chemical Information Review Document for Arbutin and Extracts from *Arctostaphylos uva-ursi*", National Toxicology Program. January 2006.
- [25] Halder RM, Richards GM. "Topical Agents Used in the Management of Hyperpigmentation", *Skin Therapy Lett.* Jun-Jul, 2004; 9(6):1-3. Review.
- [26] Tokiwa Y, Kitagawa M, Raku T, et al. "Enzymatic Synthesis of Arbutin Undecylenic Acid Ester and its Inhibitory Effect on Melanin Synthesis", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Vol 17(11), Jun, 2007, pp. 3105-3108.
- [27] Draelos ZD. "Skin Lightening Preparations and the Hydroquinone Controversy", *Dermatol Ther.* Sep-Oct, 2007; 20(5):308-13. Review.
- [28] Ertam I, Mutlu B, Unal I, et al. "Efficiency of Ellagic Acid and Arbutin in Melasma: A Randomized, Prospective, Open-Label Study", *J Dermatol.* Sep, 2008; 35(9):570-4.
- [29] Wan, H.B., Wong, M.K.: Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), 43 (1996)
- [30] Eskilsson, C.S., Bjorklund, E.: Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227 (2000)
- [31] Pawliszyn, J.: Sample preparation: Quo Vadis? *Analytical Chemistry*, 75(11), 2543 (2003)
- [32] R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, *Sample Preparation, in Analytical Chemistry: Modern Approach to Analytical Science*. 2004, Wiley: Weinheim. p. 506-508.

- [33] Luque-Garcia, J.L., de Castro, M.D.L.: Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta*, 64(3), 571 (2004)
- [34] de Castro, M.D.L., Priego-Capote, F.: Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383 (2010)
- [35] de Castro, M.D.L., Garcia-Ayuso, L.E.: Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1 (1998)
- [36] Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., Garbacik-Wesolowska, A., Szefer, P.: Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/Oder river estuary, Baltic Sea. *Food Chemistry*, 87(1), 17 (2004)
- [37] Diagne, R.G., Foster, G.D., Khan, S.U.: Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3204 (2002)
- [38] Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C.: Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033 (1996)
- [39] Mockel, H.J., Welter, G., Melzer, H.: Correlation between Reversed-Phase Retention and Solute Molecular-Surface Type and Area .1. Theoretical Outlines and Retention of Various Hydrocarbon Classes. *Journal of Chromatography*, 388(2), 255 (1987)
- [40] Moreno, E., Reza, J., Trejo, A.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(4), 239 (2007)
- [41] Lundstedt, S., van Bavel, B., Haglund, P., Tysklind, M., Oberg, L.: Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 151 (2000)
- [42] Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Martinez, J.A.: Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2 (2009)
- [43] R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, *Sample Preparation, in Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, xyz, Editor. 2004, Wiley: Weinheim.
- [44] Bjorklund, E., Bowadt, S., Nilsson, T., Mathiasson, L.: Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 285 (1999)
- [45] Camel, V.: Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182 (2001)

- [46] Wenzel, K.D., Hubert, A., Manz, M., Weissflog, L., Engewald, W., Schuurmann, G.: Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses. *Analytical Chemistry*, 70(22), 4827 (1998)
- [47] Arnold, C.G., Berg, M., Muller, S.R., Dommann, U., Schwarzenbach, R.P.: Determination of organotin compounds in water, sediments, and sewage sludge using perdeuterated internal standards, accelerated solvent extraction, and large-volume-injection GC/MS. *Analytical Chemistry*, 70(14), 3094 (1998)
- [48] Schantz, M.M., Nichols, J.J., Wise, S.A.: Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials. *Analytical Chemistry*, 69(20), 4210 (1997)
- [49] Heemken, O.P., Theobald, N., Wenclawiak, B.W.: Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Analytical Chemistry*, 69(11), 2171 (1997)
- [50] Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z.: An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction. *Analytical Chemistry*, 70(2), 420 (1998)
- [51] Vandenburg, H.J., Clifford, A.A., Bartle, K.D., Zhu, S.A., Carroll, J., Newton, I.D., Garden, L.M.: Factors affecting high-pressure solvent extraction (accelerated solvent extraction) of additives from polymers. *Analytical Chemistry*, 70(9), 1943 (1998)
- [52] Bjorklund, E., Nilsson, T., Bowadt, S.: Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), 434 (2000)
- [53] Mustafa, A., Turner, C.: Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8 (2011)
- [54] Smith, R.M.: Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 31 (2002)
- [55] Ong, E.S., Cheong, J.S.H., Goh, D.: Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 92 (2006)
- [56] Cam, M., Hisil, Y.: Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878 (2010)
- [57] Ferrera, Z.S., Sanz, C.P., Santana, C.M., Rodriguez, J.J.S.: The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(7), 469 (2004)
- [58] Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H.W., Huie, C.W.: Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. *Journal of Chromatography A*, 983(1-2), 153 (2003)

- [59] Luthria, D.L., Biswas, R., Natarajan, S.: Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*, 105(1), 325 (2007)
- [60] Zhu, Y., Yanagihara, K., Guo, F.M., Li, Q.X.: Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of chloroacetanilide and nitrogen heterocyclic herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4097 (2000)
- [61] Richter, B.E., Covino, L.: New environmental applications of accelerated solvent extraction. *Lc Gc North America*, 18(10), 1068 (2000)
- [62] Bernal, J.L., Delnoz, M.J., Jimenez, J.J.: Use of a High-Pressure Soxhlet Extractor for the Determination of Organochlorine Residues by Gas-Chromatography. *Chromatographia*, 34(9-10), 468 (1992)
- [63] Lopez-Avila, V.: Sample preparation for environmental analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 195 (1999)
- [64]. Blanco, E.V., Mahia, P.L., Lorenzo, S.M., Rodriguez, D.P., Fernandez, E.F.: Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366(3), 283 (2000)
- [65] Camel, V.: Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TracTrends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229 (2000)
- [66] Renoe, B.W.: Microwave-Assisted Extraction. *American Laboratory*, 26(12), 34 (1994)
- [67] Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 791(1-2), 361 (1997)
- [68] Letellier, M., Budzinski, H.: Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259 (1999)
- [69] Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M., Garrigues, P.: Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(1), 196 (2002)
- [70] LopezAvila, V., Benedicto, J.: Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 15(8), 334 (1996)
- [71] Bouaid, A., Martin-Esteban, A., Fernandez, P., Camara, C.: Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 367(3), 291 (2000)

- [72] Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E.: Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2), 6 (2006)
- [73] Franke, M., Winek, C.L., Kingston, H.M.: Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Science International*, 81(1), 51 (1996)
- [74] Desrosiers, N.A., Betit, C.C., Watterson, J.H.: Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues. *Forensic Science International*, 188(1-3), 23 (2009)
- [75] Kiss, G.A.C., Forgacs, E., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H., Ramos, A.: Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 41 (2000)
- [76] Prados-Rosales, R.C., Garcia, J.L.L., de Castro, M.D.L.: Rapid analytical method for the determination of pesticide residues in sunflower seeds based on focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 993(1-2), 121 (2003)
- [77] Priego-Capote, F., Luque-Garcia, U., de Castro, M.D.L.: Automated fast extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil by focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 994(1-2), 159 (2003)
- [78] Capelo, J.L., Mota, A.M.: Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 1(2), 193 (2005)
- [79] Tadeo, J.L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Garcia-Valcarcel, A.I.: Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2415 (2010)
- [80] Santos, H.M., Capelo, J.L.: Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73(5), 795 (2007)
- [81] Huertas-Perez, J.F., Iruela, M.D., Garcia-Campana, A.M., Gonzalez-Casado, A., Sanchez-Navarro, A.: Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 280 (2006)
- [82] Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M.: Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta*, 75(1), 284 (2008)
- [83] Domeno, C., Blasco, M., Sanchez, C., Nerin, C.: A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 103 (2006)

- [84] Hyotylainen, T., Riekkola, M.L.: Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26(8), 788 (2007)
- [85] Erbay, Z., Icier, F.: The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International*, 26(4), 319 (2010)
- [86] Sanchez-Brunete, C., Rodriguez, A., Tadeo, J.L.: Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1007(1-2), 85 (2003)
- [87] Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Tadeo, J.L.: Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1445 (2004)
- [88] Kayali-Sayadi, M.N., Rubio-Barroso, S., Diaz-Diaz, C.A., Polo-Diez, L.M.: Rapid determination of PAHs in soil samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368(7), 697 (2000)
GELİŞMİŞ EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ I 239
- [89] Sanchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J.L.: Rapid method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils by sonication-assisted extraction in small columns. *Journal of Separation Science*, 29(14), 2166 (2006)
- [90] Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., Barcelo, D.: Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of Chromatography A*, 1047(2), 181 (2004)
- [91] Oleszczuk, P., Baran, S.: Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(9-10), 1083 (2005)
- [92] Rodriguez-Sanmartin, P., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P.: Ultrasound-assisted solvent extraction of total polycyclic aromatic hydrocarbons from mussels followed by spectrofluorimetric determination. *Talanta*, 66(3), 683 (2005)
- [93] Zhou, J.H., Xue, X.F., Li, Y., Zhang, J.Z., Chen, F., Wu, L.M., Chen, L.Z., Zhao, J.: Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chemistry*, 115(3), 1074 (2009)
- [94] Nania, V., Pellegrini, G.E., Fabrizi, L., Sesta, G., De Sanctis, P., Lucchetti, D., Di Pasquale, M., Coni, E.: Monitoring of perfluorinated compounds in edible fish from the Mediterranean Sea. *Food Chemistry*, 115(3), 951 (2009)
- [95] Blackwell, P.A., Lutzhoft, H.C.H., Ma, H.P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P.: Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta*, 64(4), 1058 (2004)

- [96] de Alda, M.J.L., Gil, A., Paz, E., Barcelo, D.: Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst*, 127(10), 1299 (2002)
- [97] Turiel, E., Martin-Esteban, A., Tadeo, J.L.: Molecular imprinting-based separation methods for selective analysis of fluoroquinolones in soils. *Journal of Chromatography A*, 1172(2), 97 (2007)
- [98] Xu, J., Wu, L.S., Chen, W.P., Chang, A.C.: Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202(2), 189 (2008)
- [99] Zougagh, M., Valcarcel, M., Rios, A.: Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(5), 399 (2004)
- [100] Mira, B., Blasco, M., Berna, A., Subirats, S.: Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. *Journal of Supercritical Fluids*, 14(2), 95 (1999)
- [101] Stashenko, E.E., Puertas, M.A., Combariza, M.Y.: Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 752(1-2), 223 (1996)
- [102] Reindl, S., Hofler, F.: Optimization of the Parameters in Supercritical-Fluid Extraction of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons from Soil Samples. *Analytical Chemistry*, 66(11), 1808 (1994)
- [103] Lee, H.B., Peart, T.E., Hongyou, R.L., Gere, D.R.: Supercritical Carbon-Dioxide Extraction of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons from Sediments. *Journal of Chromatography A*, 653(1), 83 (1993)
- [104] Schantz, M.M., Bowadt, S., Benner, B.A., Wise, S.A., Hawthorne, S.B.: Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental matrix standard reference materials. *Journal of Chromatography A*, 816(2), 213 (1998)
- [105] Eisenmenger, M., Dunford, N.T.: Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(1), 55 (2008)
- [106] de Azevedo, A.B.A., Kieckbush, T.G., Tashima, A.K., Mohamed, R.S., Mazzafera, P., de Melo, S.A.B.V.: Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 44(2), 186 (2008)
- [107] Davarnejad, R., Kassim, K.M., Zainal, A., Sata, S.A.: Supercritical fluid extraction of beta-carotene from crude palm oil using CO₂. *Journal of Food Engineering*, 89(4), 472 (2008)
- [108] Kim, W.J., Kim, J.D., Kim, J., Oh, S.G., Lee, Y.W.: Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Food Engineering*, 89(3), 303 (2008)

- [109] Mitra, P., Ramaswamy, H.S., Chang, K.S.: Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 208 (2009)
- [110] Shi, J., Yi, C., Ye, X.Q., Xue, S., Jiang, Y.M., Ma, Y., Liu, D.H.: Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. *Lwt-Food Science and Technology*, 43(1), 39 (2010)
- [111] Yu, J., Liu, Y.F., Qiu, A.Y., Wang, X.G.: Preparation of isoflavones enriched soy protein isolate from defatted soy hypocotyls by supercritical CO₂. *Lwt-Food Science and Technology*, 40(5), 800 (2007)
- [112] Bernal, J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Diego, C., Mayo, R., Maestre, R.: Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. *Journal of Chromatography A*, 1192(2), 266 (2008)
- [113] Vagi, E., Simandi, B., Vasarhelyine, K.P., Daood, H., Kery, A., Doleschall, F., Nagy, B.: Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *Journal of Supercritical Fluids*, 40(2), 218 (2007)
- [114] Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., Mousavi, S.M.E.: Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 435 (2008)
- [115] Braga, M.E.M., Santos, R.M.S., Seabra, I.J., Facanali, R., Marques, M.O.M., de Sousa, H.C.: Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(1), 37 (2008)
- [116] Icen, H., Guru, M.: Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 50(3), 225 (2009)
- [117] Hamdan, S., Daood, H.G., Toth-Markus, M., Illes, V.: Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. *Journal of Supercritical Fluids*, 44(1), 25 (2008)
- [118] Yang, Z.N., Luo, S.Q., Peng, Q.C., Zhao, C., Yu, Z.W.: GC-MS Analysis of the Essential Oil of Coral Ginger (*Zingiber corallinum* Hance) Rhizome Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Steam Distillation Extraction. *Chromatographia*, 69(7-8), 785 (2009)
- [119] Salimi, A., Fatemi, S., Nei, H.Z.N., Safaralie, A.: Mathematical Modeling of Supercritical Extraction of Valeric Acid from *Valeriana officinalis* L. *Chemical Engineering & Technology*, 31(10), 1470 (2008)
- [120] Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., Goto, M.: Supercritical CO₂ extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids*, 41(3), 421 (2007)

- [121] Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., Goto, M.: Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 44(3), 308 (2008)
- [122] Miyawaki, T., Kawashima, A., Honda, K.: Development of supercritical carbon dioxide extraction with a solid phase trap for dioxins in soils and sediments. *Chemosphere*, 70(4), 648 (2008)
- [123] Boulaid, M., Aguilera, A., Busonera, V., Camacho, F., Monterreal, A.V., Valverde, A.: Assessing supercritical fluid extraction for the analysis of fipronil, kresoxim-methyl, acrinathrin, and pyridaben residues in melon. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 42(7), 809 (2007)
- [124] Yang, Y., Cajthaml, T., Hofmann, T.: PAH desorption from river floodplain soils using supercritical fluid extraction. *Environmental Pollution*, 156(3), 745 (2008)
- [125] Kawashima, A., Watanabe, S., Iwakiri, R., Honda, K.: Removal of dioxins and dioxinlike PCBs from fish oil by countercurrent supercritical CO₂ extraction and activated carbon treatment. *Chemosphere*, 75(6), 788 (2009)
- [126] Haşimi, D. Yeni Amid-Silika Dolgu Maddesi Kullanılarak Sitokinlerin HPLC ile Ayrılması ve Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kimya Anabilim Dalı
- [127] Chromotography, 1995. Catalog 350, Alltech Associates, IL, ABD.
- [128] Tomruk, E. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için hidrofilik destek materyali sentezi ve kromatografik karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı. 10-21
- [129] Qui, H., Liang, X., Sun, M., Jiang, S., 2011. Development of silica- based stationary phases for high performance liquid chromatography. *Anal.Bioanal. Chem*, 399:3307- 3322
- [130] Dorsey, J.G., Cooper, W.T. 1994. Retention mechanisms of bonded Phase liquid chromatography. *Anal.Chem.*, 66:857A-866A
- [131] Sander, L.C., Wise, S.A.1987. Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed phase liquid chromatography. *Anal.Chem.* 59:2309-2313
- [132] Nawrocki, J.,Dunlap, C., McCormick, A., Carr, P.W. 2004. Part I Chromatography using ultra-stable metal oxide – based stationary phases for HPLC.*J.Chromatogr.A.*,1028:1-30
- [133] Kirkland, J.J., Truzkowshi, F.A., Ricker, R.D. 2002. Atypical silica – based column packings for high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A.*, 965:25-34
- [134] Kirkland, J.J., Henderson, J.W., DeStefano, J.J. , vanStraten, M.A. , Claessens, H.A. 1997. Stability of silica based , end-capped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed – phase high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A.*, 762:97- 112

- [135] Kirkland, J.J., Glajch, J.L., Farlee, R.D. 1989. Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high performance liquid column packings. *Anal.Chem.*, 61:2-
- [136] Pesek, J.J., Matyska, M.T., Yu, R.J. 2002. Synthesis and characterization of endcapped C₁₈ stationary phases using a silica hydride intermediate. *J.Chromatogr.A.*, 947:195-203
- [137] Kobayashi, S., Tanaka, I., Shiota, O., Kanda, T., Ohtsu, Y. 1998. Synthesis and characterization of a polymer – coated C₁₈ stationary phase with high carbon content for liquid chromatography. *J.Chromatogr. A.*, 828:75-81
- [138] Zhou, L., Welch, C., Lee, C., Gong, X., Antonucci, V., Ge, Z., 2009. Development of LC chiral methods for neutral pharmaceutical related compounds using reversed phase and normal phase liquid chromatography with different types of polysaccharide stationary phases. *J.Pharm.Biomed. Anal.*, 49:964-969
- [139] Kayillo, S., Dennis, D.S., Shalliker, R.A., 2006. An assesment of the retention behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases: Selectivity and retention on C₁₈ and phenyl – type surfaces. *J.Chromatogr.A.*, 1126:283-297
- [140] Euerby, M.R. , Petersson, P., Campbell, W., Roe, W. 2007. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed- phase liquid chromatographic columns containing pheny moieties using principal component analysis *J.Chromatogr.A.*, 1154:138-151
- [141] Merchand, D.H., Croes, K., Dolan, J.W., Synder, L.R. 2005. Column selectivity in reversed – phase liquid chromatography:VII Cyanopropyl columns *J.Chromatogr.A.*, 1062: 57-64
- [142] Zhang, W., 2008. Flourinated stationary phases for HPLC applications. *J.FlourineChem.*, 129:910-919
- [143] Aral, H. 2013. Farklı Polaritelere Sahip Amid – Silika Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi ve HPLC İle Çeşitli Polar Bileşiklerin Ayrılmasında Kullanımı.Doktora Tezi , Dicle Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü ,Kimya Ana Bilim Dalı
- [144] Przybyciel, M., Majors, R.E. 2002. Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography LC-GC., 20:516-523
- [145] Ascah, T. , Feibush, B. 1990. Novel, highly deactivated reversed – phase for basic compounds *J.Chromatogr.A.*, 506:357
- [146] Layne, J. 2002. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional , polar embedded and polar – endcapped reversed phase liquid chromatography stationary phases. *J.Chromatogr.A.*, 957:149-164
- [147] Neue, U.D., Cheng, Y.F. , Lu, Z., Alden, B.A., Iraneta, P.C. , Phoebe , C.H., Van Tran, K., 2001. Properties of reversed phase packings with an embedded polar grup. *Chromatographia*, 54:169

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SAĞLAM, Işıl
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.07.1991, İzmir
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (506) 920 41 04
e-mail : isil_acikgoz@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Uşak Üniversitesi/Kimya Bölümü	2016
Lisans	Uşak Üniversitesi/Kimya Mühendisliği	2013
Lise	Hatice Güzelcan Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-2014	Merih Yem	Laboratuar Sorumlusu
2014	Muratbey Peynirleri	Kimya Mühendisi

Yabancı Dil

İngilizce (orta)

Hobiler

Sinema, Kitap, Spor, Puzzle, Tiyatro.