

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

KİMYA ANABİLİM DALI

**ULTRASONİK YÖNTEMLE ARCTOSTAPHYLOS UVA-URSI (AYI
ÜZÜMÜ) YAPRAKLARINDAN ARBUTİN EKSTRAKSİYONUNUN
OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA ÖZTÜRK

UŞAK 2014

Esra ÖZTÜRK tarafından hazırlanan Sonikasyon Tekniği ile Ayı Üzümü Yapraklarından (Arctostaphylos Uva-Ursi) Arbutin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu adlı bu tezin Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

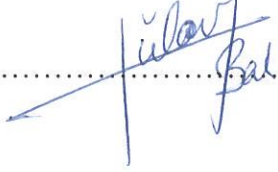
Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK

Tez Danışmanı, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



Doç. Dr. Tülay BAL DEMİRCİ

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı



Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Pınar DEMİR

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi




Yrd. Doç Dr. Senem ŞANLI

Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi



Yrd. Doç Dr. Nevin ÇANKAYA

Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi



Tarih: 21/11/2014

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans / Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Lütfullah TÜRKMEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(İmza)

Esra ÖZTÜRK

ÖZET

Arbutin birçok tıbbi bitkide bulunan ve doğal olarak oluşan glikozittir. Arbutin içeren ilaçlar başta cilt kanseri tedavisi olmak üzere idrar yolları enfeksiyonlarının tedavisi, böbrek taşı tedavisi, yetişkinlerin cildinde görülen çil ve leke gibi rahatsızlıkların tedavisinde cilt beyazlatma ajanı olarak kullanılır. Doğal arbutinin bitki yapraklarından ekstraksiyonu için çevre ve insan sağlığını olumsuz etkileyecek toksik kimyasalların kullanıldığı, üretim süreleri uzun ve maliyeti yüksek geleneksel ekstraksiyon yöntemleri yerine kısa ekstraksiyon zamanı, minimum organik çözücü tüketimi olan yüksek verime sahip ekonomik, çevre dostu kolay uygulanabilir Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) yöntemi geliştirilmiştir.

Bu çalışmada ekstraksiyon verimi üzerine pH, zaman, sıcaklık ve çözücü/katı oranının etkisi belirlenmiştir. Optimizasyon için Response Surface Metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Bunun için, ekstraksiyon verimi üzerine etkin deneysel koşullar: katı/çözücü oranı (20-40 ml / 200 mg numune), pH (1-13), ekstraksiyon süresi (30-90 dakika), sıcaklık (40-80 °C) olarak seçilmiştir. Bu parametrelerin en iyi muhtemel kombinasyonları RSM ile elde edilmiştir. Deneysel koşulların tasarımı için Box-Behnken tasarımı seçilmiştir. İkinci dereceden polinom modelleri (kuadratik model) deneysel verilerin en iyi tanımlanmasını vermiştir. Optimum işletme koşullarında (pH:7.00, 80.00 °C sıcaklık, 48,41 dakika ekstraksiyon süresi ve 40 ml çözücü/ 200 mg katı oranı) 200 mg numunedan 12,93 mg Arbutin ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ayı üzümü yapraklarından Arbutin etken bileşeninin ekstraksiyonu için Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) etkili bir metot olabileceğini göstermiştir.

Bilim Kodu :

Anahtar Kelimeler : Arbutin, Ayı Üzümü, Ekstraksiyon, Optimizasyon

Sayfa Adedi : 84

Tez Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK

: Doç. Dr. Tülay BAL DEMİRCİ

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konumu seçmemde bana yardımcı olan, tezimin her aşamasında bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK' a teşekkür ederim.

Çalışmam esnasında bilgi, deneyim ve görüşleriyle tezime olan önemli katkılarından dolayı Doç. Dr. Tülay BAL DEMİRCİ' ye, HPLC analizlerinde yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI' ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 114 Z 132 numaralı proje kapsamında yapılmıştır. Katkılarından dolayı TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Destekleri ve duaları için nişanlım M. Mustafa UYAR ve değerli ailesine teşekkür ederim.

Bana gösterdikleri sabır, hoşgörü ve destekleri için annem Ayten ÖZTÜRK' e, babam Cevat ÖZTÜRK' e ve kardeşim Hatice ÖZTÜRK' e çok teşekkür ederim.

Esra ÖZTÜRK
Kimyager

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
1. AYI ÜZÜMÜ.....	1
1.1. Ayı Üzümünün Genel Özellikleri.....	1
1.1.2. Bitkisel Özellikleri, Yetiştirme Şartları ve Kültürel İşlemler	2
1.1.3. Yayılışı	2
1.1.4. Ekolojisi.....	2
1.1.5. Botanik ve Anatomik Özellikleri	3
1.2. Arbutin	3
1.2.1. Tarihi ve Önemi	4
1.2.2. Kullanımı	4
1.2.3. Kimyasal Yapısı.....	5
1.2.4. Genel Üretim Süreci.....	5
1.2.5. Biyolojik Aktivitesi.....	6
1.3. Ekstraksiyon Teknikleri.....	6
1.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	6
1.3.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonunun Uygulamaları	9
1.3.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (PLE)	9
1.3.2.1. PLE Uygulamaları	13
1.3.3. Mikrodalga Destekli Çözücü Ekstraksiyonu (MAE).....	14
1.3.3.1. MAE Uygulamaları	17
1.3.4. Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu (SAE).....	18
1.3.4.1. SAE Uygulamaları.....	20
1.3.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)	21
1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC).....	24

1.4.1. HPLC Cihazı.....	26
1.4.2. HPLC de Kolon Seçimi.....	27
1.4.3. İzokratik ve Gradient Ayırma.....	31
1.4.4. Kromatografide Temel Parametreler.....	32
1.4.4.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü.....	33
1.4.4.2. Seçicilik.....	33
1.4.4.3. Teorik Tabaka Sayısı.....	34
1.4.4.4. Ayırma Gücü.....	34
1.4.4.5. Kuyruklanma Faktörü.....	36
1.4.5. Mobil Faz Optimizasyonu.....	36
1.4.6. Mobil Faz pH Standardizasyonu.....	37
1.4.7. Alıkonmaya Etki Eden Faktörler.....	38
1.5. Validasyon Parametreleri.....	40
1.5.1. Doğruluk.....	40
1.5.2. Kesinlik.....	42
1.5.2.1. Tekrarlanabilirlik.....	42
1.5.2.2. Orta-Kesinlik.....	43
1.5.2.3. Tekrar Elde Edilebilirlik.....	43
1.5.3. Seçicilik.....	44
1.5.4. Teşhis Sınırı (LOD).....	44
1.5.5. Tayin Alt Sınırı.....	45
1.5.6. Doğrusallık.....	45
1.5.6.1. Kalibrasyon Grafiği.....	46
1.5.6.2. Duyarlılık.....	46
1.5.6.3. Çalışma Aralığı.....	46
1.5.6.4. Sağlamlık.....	47
1.5.6.5. Tutarlılık.....	47
2. MATERYAL VE METOT	48
2.1. Kullanılan Materyal.....	48
2.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon.....	48
2.3. Kromatografik Koşullar (HPLC metodu).....	51
2.3.1. HPLC Analiz Metodunun Validasyon Çalışmaları.....	52

2.3.1.2. Analitik Metodun Doğrusallığı	53
2.3.1.4. Tekrarlanabilirlik Testleri	57
3. SONUÇLAR.....	60
3.1. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Proses Değişkenlerinin Etkisi.....	60
3.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Çözücü/katı oranının etkisi	61
3.3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Çözücü pH ının etkisi	62
3.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Zamanının Etkisi	62
3.5. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi	63
3.6. Yüzey Yanıt Metoduyla Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu	68
3.7. Model Uygunluğu.....	69
4. TARTIŞMA.....	73
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Standartların doğrusallığı	53
Şekil 2.2. 1. Gün Kalibrasyon doğrusallığı	54
Şekil 2.3. 2. Gün Kalibrasyon doğrusallığı	55
Şekil 2.4. 3. Gün kalibrasyon grafiği	56
Şekil 3.1. Arbutin veriminin çözücü/katı oranıyla değişimi	61
Şekil 3. 2. Arbutin veriminin pH ile değişimi	62
Şekil 3.3. Arbutin veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi	63
Şekil 3.4. Arbutin veriminin sıcaklıkla değişimi	64
Şekil 3.5. Çözücü pH na çözücü/katı oranının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği	64
Şekil 3.6. Ekstraksiyon zamanına çözücü/katı oranının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği	65
Şekil 3.7. Ekstraksiyon sıcaklığına çözücü/katı oranının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği	65
Şekil 3.8. Ekstraksiyon zamanına çözücü pH sınırın bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği	66
Şekil 3.9. Ekstraksiyon sıcaklığına çözücü pH sınırın bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği	66
Şekil 3.10. Ekstraksiyon sıcaklığına ekstraksiyon zamanının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği	67
Şekil 3.11. Arbutin veriminin tüm değişkenler ile değişimi grafiği (A: Çözücü/katı oranı B: pH C: zaman D: sıcaklık)	67
Şekil 3.12. Denklemden elde edilen değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılması	69
Şekil 3.13. Arbutin standardının kromatogramı	72
Şekil 3.14. Ayı üzümü yapraklarının ekstraktının kromatogramı	72

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Kullanılan Arbutin standardının özellikleri	48
Çizelge 2.2. Bağımsız değişkenlerin değerleri ve sembolleri	50
Çizelge 2.3. Deney Koşulları	51
Çizelge 2.4. HPLC Metodu	52
Çizelge 2.5. Analitik metodun validasyonu süresince farklı parametrelerin testinden elde edilen sonuçlar	52
Çizelge 2.6. 1.gün kalibrasyon tablosu	54
Çizelge 2.7. 2.gün kalibrasyon tablosu	55
Çizelge 2.8. 3. gün kalibrasyon tablosu	56
Çizelge 2.9. Gün içi günler arası pik alanı değerleri	57
Çizelge 2.10. Pik Alanına Dayalı Tekrarlanabilirlik	58
Çizelge 3.1. Ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar ve bağımsız değişkenlerin (X1, X2, X3, X4) Box-Behnken tasarımı	60
Çizelge 3.2. ANOVA tablosu	71

1. AYI ÜZÜMÜ

1.1. Ayı Üzümünün Genel Özellikleri

Kırmızı çiçekli, 2 metreye kadar boylanabilen, meyveleri kıvımsız renkte bir bitkidir. İçerisinde çeşitli organik asitler, tanen ve arbutin bulunur. Ilıman iklim kuşağına adapte olmuş bir meyve türü olup botanik olarak üzümler gurubunda bulunmaktadır. Asidik şartları seven birçok bitki gibi fundagiller familyasında yer alırlar. Asitli ve organik maddece zengin, defne, çam, kızılğacın yetiştiği alanlarda kolayca yetişebilmektedir. Dünya üzerinde sadece 240000 ton üretilen ve yaklaşık olarak 40 milyon insanın tüketim imkânı bulabildiği ayı üzümü çok hızlı bir şekilde üretilerek satışa sunulabilmekte, çok farklı alanlarda kullanılabilmekte ve birim alandaki getirisi son derece yüksek olup içeriği ile sağlık açısından oldukça yararlı bir meyvedir [1].



Resim 1.1. Ayı üzümü bitkisi ve yaprakları

1.1.2. Bitkisel Özellikleri, Yetiştirme Şartları ve Kültürel İşlemler

Çok yıllık bir bitki olup bazı türleri her dem yeşil, genelde yaprağını döken odunsu çalılara sahiptirler. Asit karakterli (türlerine göre pH 4,2-5,0 veya 4,5-5,2) topraklarda iyi gelişme gösterir. Kökleri 5,5 pH seviyesine kadar toleranslıdır. Ancak pH değerinin 6,5 ve üzerine çıktığı topraklarda yetiştirilemez. Sığ kök yapısına sahiptir. Bahçe için meyilli alanlar tercih edilmelidir. Drenajı iyi, havalı ve organik maddece zengin (%3' den fazla) toprakları tercih eder. Taban suyu 0,6 m' den aşağıda olmalıdır. Tam güneş alan nemli ve asitli topraklarda iyi gelişir. Bahçe yeri en azından yarım gün güneş almalıdır. Gün içerisinde 3-4 saat gölge alabilir [2].

1.1.3. Yayılışı

Üzümsü meyve olarak kullanılan taksonların birçoğu Türkiye'de doğal olarak yetişmektedir. Bu meyveler, vitamin ve mineral maddesi bakımından zengin, insan sağlığı için de önemli olup gıda sektöründe kullanımı (meyve suyu, meyveli yoğurt, dondurma, konserve, reçel, v.s.) giderek artmaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de genetiği değiştirilmiş bitkilerin miktarının kontrolsüz biçimde artması sonucu, genetik kirlilik oluşturma riski her geçen yıl hızla artmaktadır [3]. Genel olarak tüm Karadeniz bölgesinde yer yer yayılmakla birlikte, Trakya bölgesinde ve Marmara'nın güneyinde yerel yayılış gösterdiği görülmektedir.

1.1.4. Ekolojisi

Don olayı olmayan en az 160 günlük yetiştirme periyodu ister. Gövdesi -29,1 ile -37,7 °C ye kadar dona dayanır. Uzun günler bitkideki vegetatif gelişmeyi teşvik ederken yaz sonları ile sonbahar aylarındaki kısa günler meye tomurcuğu gelişimini artırır. Kılcal köklerden yoksun olduğu için topraktaki nem değişikliklerine son

derece hassastırlar. Sulamada kullanılan su kaliteli olmalı, çok az veya hiç tuz içermemeli ve kalsiyum içeriği çok az veya hiç olmamalıdır. İdeal toprak, drenajı iyi, asitli kumlu ve pH' sı 4,5-5,2 arasında olan topraklardır. Organik madde kapsamı yüksek olan ağır topraklarda yetiştirilmesi uygundur [4].

1.1.5. Botanik ve Anatomik Özellikleri

Ayı üzümü; Ericales takımı, Ericaceae familyası, Vacciniaceae alt familyası, Vaccinium cinsine ait bir türdür. Kılcal kökleri olmayan lifli kök yapısına sahiptir. Su ve besin maddelerinin kökler tarafından absorbe edilebilmesi için çoğunlukla endotrofik mikorizalar (VAM) ile birlikte yaşarlar. Kökler bitkinin tabanından itibaren 180 cm' ye kadar yayılabilir. Ancak nadiren 90 cm derine inebilirler. Meyve gözleri yaz sonları ile sonbahar aylarında oluşmaktadır. Tomurcuk gelişimi sürgün ucundan aşağıya doğru meydana gelir. Çiçek tomurcuklarının sayısı iklime bağlı olduğu kadar sürgün gelişme kuvvetine de bağlıdır. Tomurcukların içinde yer alan çiçek demetinin farklılaşması ise aşağıdan yukarı doğru gerçekleşmektedir [5].

1.2. Arbutin

Ayı üzümü olarak da bilinen *Arctostaphylos Uva-ursi* ana bileşen olarak arbutin olmak üzere, farmosötik olarak uygun bileşenler olan fenoller, tanenler ve flavonoidler içermektedir. Bir bahçe bitkisi olarak değerli olmasının yanında üriner antiseptik ve damar büzücü olarak kullanılmaktadır [6]. Farmakolojik olarak aktif bileşik olan hidrokinonlar canlı organizmada arbutinin glikozide parçalanmasıyla meydana gelmektedir [7].

Ayı üzümü bitki özü arbutin, bir hidrokinon türevidir. Piyasada bulunan ürünlerde 1960' dan bu yana cilt aydınlatma ajanı olarak hidrokinon kullanılmaktadır [8]. Arbutin doğal olarak buğday, armut kabuğu ve yaban mersini yapraklarında

bulunur. Vücuda alınan bu ürünlerin çoğu hidrokinon üretmek üzere metabolize edilir ve idrarla atılır.

Arbutinin kantitatif analizi için; spektrofotometre [9], kapiler bölge elektroforezi [10] ve Nguyen-HIEP kromatospektrofotometresi [11] gibi yöntemler vardır. Ters fazlı HPLC yöntemi daha uygun görünmektedir [11-13]. Eski yöntemlerin saflaştırma aşamasına gerek duyması arbutin kayıplarına neden olabilmektedir, fakat HPLC de ekstrakt doğrudan analiz edilebilmektedir. Bu nedenle ters fazlı HPLC yöntemi analiz için daha uygun görünmektedir [11-14]. Bundan başka, varolan HPLC yöntemleri hücre süspansiyon kültürlerinde ve idrar örneklerinde arbutin ölçmek için geliştirilmiştir [8,12,13].

1.2.1. Tarihi ve Önemi

Arbutin, ayı üzümü bitkisinin yapraklarından ekstrakte edilen etken maddedir. Geçmişte ekstraktlar idrar yolu enfeksiyonları ve böbrek taşı tedavisinde idrar söktürücü olarak kullanılırdı. Arbutin vücut içerisinde damar büzücü, antimikrobiyal ve dezenfektan özelliklere sahip hidrokinona dönüştürülür [15]. Hidrokinon hiperpigmentasyon tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Arbutin fenolik olmadığı düşünülen glikolleşmiş benzokinondur. Ayrıca hidrokinona dönüştüğü için aşırı renklenmede etkilidir [15,16]. Hidrokinonun, 1990 yılında toksik olması sebebiyle reçetesiz satışı yasaklanmıştır.

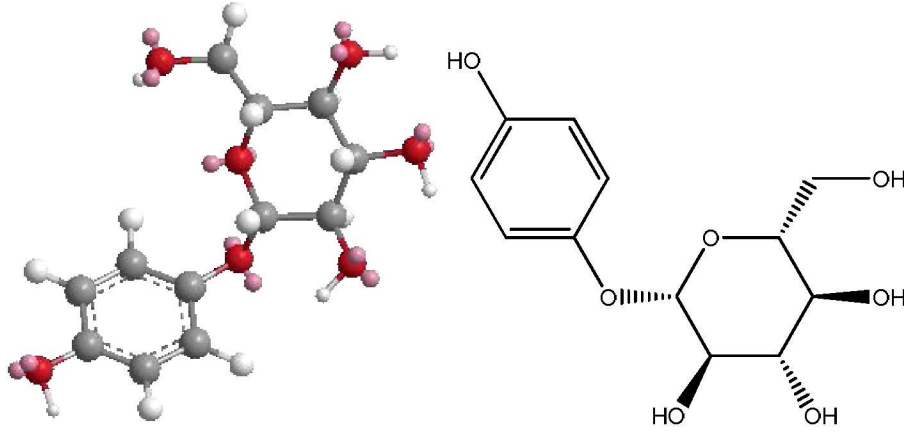
1.2.2. Kullanımı

Arbutin, renkli fotoğraflarda dengeleyici, idrar söktürücü, üriner sistem için enfeksiyon oluşumunu engelleyici ve deri rengini açıcı ajan olarak kullanılır. Arbutin melanin oluşumunu engelleme konusunda hidrokinon ile benzer etkilere sahiptir [16].

1.2.3. Kimyasal Yapısı

Kimyasal ismi: Arbutin. Hidrokinon beta-D-glikopinosit

Kimyasal formülü: $C_{12}H_{16}O_7$



Şekil 1.1. Arbutinin kimyasal yapısı

Arbutin suda çözünebilir beyaz kristalli bir toz halindedir. Arbutin, kapsüller ve çaylar gibi bitkisel ilaçlar içinde uva-ursi bitkisinden elde edilmiş tozlar ve ezilmiş yapraklar halinde bulunur. Arbutin, aynı zamanda, ticari olarak asetobrominoglukoz ve hidrokinon, ya da fosfor oksiklorürün mevcudiyetinde beta-D-glikoz pentaasetat ve hidrokinon monobenzil eter ile reaksiyonundan sentezlenebilir [16].

1.2.4. Genel Üretim Süreci

Arctostaphylos UVA ursi ikinci ayı üzümü özü tirozin melanin oluşumuna neden olan oksitlenme reaksiyonları önlemek için bir indirgeme maddesi ile bir araya getirilmektedir. Örneğin portakal ekstresi, limon özü ve salatalık özü gibi diğer tirozinaz inhibitörleri; glikolik asit, laktik asit ve sodyum hiyalüronat biçiminde tamamlayıcı katkı maddeleri ile birlikte, aydınlatma etkisini arttırmak için, formülasyona ilave edilebilir.

1.2.5. Biyolojik Aktivitesi

Sistemik olarak arbutin mide bağırsak sisteminde emilir ve biyolojik olarak hidrokinona dönüştürülür. % 65-75 aralığında sindirilen arbutin böbreklerden atılır. Melanin, trozinaz ile salgılanır. Hidrokinon trozinazı inhibe ederek melanin sentezini durdurur [18]. Arbutin topikal uygulamada, daha yüksek konsantrasyonlarda, daha az toksisite ve tahriş ile lokalize bir etki sağlar [18-19].

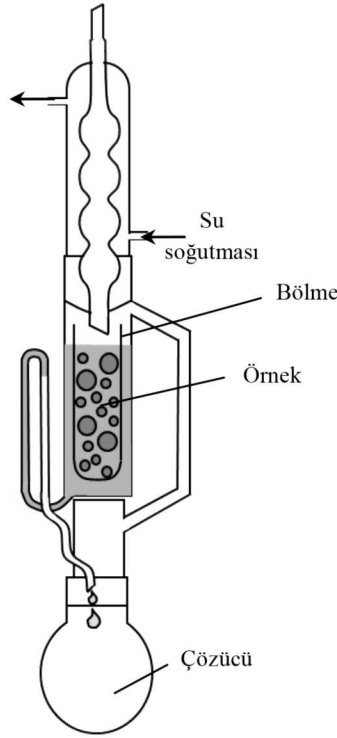
1.3. Ekstraksiyon Teknikleri

1.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu özel bir cihazda gerçekleştirilir (Şekil 1.2). Katı veya yarı-katı numuneler için uygundur. Soxhlet ekstraktörü, en eski ekstraksiyon sistemlerinden biridir ve hala geniş ölçüde kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü, bir çözücü şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden meydana gelmiştir.

Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesinin içine yerleştirilir. Çözücü bunun altındaki çözücü şişesinin içine konur. Çözücü kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır ve kaynayan çözücünden gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu kondansatöre hareket eder; yoğunlaşır, örneğe doğru damlar. Çözücü örneği ıslatır ve daha sonra çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, çözücü tüm örnek bölmesini boşaltarak, çözücü şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak çözücü birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur. Ekstrakte olan analitler çözücü şişesinin içinde kalırken, yalnızca temiz çözücü buharlaştığından, her dolaşımında taze çözücü kullanılır. Cevrim sayısını ve ekstraksiyon zamanını rapor etmek daha iyi bir karşılaştırma için önemlidir. Tipik ekstraksiyon zamanları 6 saatten 24 saate kadardır ve oldukça büyük çözücü hacimleri (100-500 mL) gereklidir. Ekstraksiyon çözücülerini genellikle saf organik çözücüler veya bunların karışımlarıdır. Soxhlet

ekstraksiyonu, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonunda kullanılır. Bileşikler, çözücünün kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır. Eşzamanlı ekstraksiyona izin veren Soxhlet cihazı çok düşük maliyetle temin edilebilir. Yöntemin kullanılması esnasında karşılaşılan problemler örnek bölmesinin temizliğinden kaynaklı olabilir. Kullanmadan önce, temiz bir çözücü ile ekstrakte ederek temizlemek en iyisidir [20].



Şekil 1.2. Soxhlet ekstraktör cihazı

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonu bazı cazip avantajlara sahiptir. Örnek, sürekli olarak taze çözücü 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 arttırılabilir. Düşük maliyetli basit donanım kullanılması buna olanak sağlar. Soxhlet ekstraksiyonu az uğraş gerektiren çok basit bir

metodolojidir. En son kullanılan alternatiflerinin çoğundan (mikrodalga destekli ekstraksiyon, superkritik sıvı ekstraksiyonu gibi) daha fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilebilir [21-22].

Soxhlet ekstraksiyonunun diğer katı örnek hazırlama teknikleriyle karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları, uzun zaman gerektirmesi ve büyük miktarda organik çözücü kullanmasıdır. Çok miktarda çözücünün zararsız hale getirilmesi yalnızca pahalı değil, aynı zamanda çevresel problemlerin kaynağıdır. Örnekler genellikle çözücünün 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 çözücü kullanıldığından, ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağı zorunludur. Soxhlet tekniği çözücü seciciliği ile sınırlıdır ve otomasyonu zordur [22,23].

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, çözücünün katı örneğe nüfuz etmesi kolaylaşmıştır. Bunun sonucu ekstraksiyon zamanı kısalmış ve çözücü 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 [22].

1.3.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonun 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 [24]. Diagne ve arkadaşları, Soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle fasulyeden organofosforlu bir insektisit olan fenitrotiyon kalıntılarını ekstrakte etmişlerdir [25]. 10 gram örnek 24 saat boyunca 200 mL diklormetan ile çözücünün kaynama sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra uçurularak zenginleştirilen örnek yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve GC-ECD ile tayin edilmiştir.

1.3.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (PLE)

Ekstraksiyon için oldukça yeni bir tekniktir. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu olarak da adlandırılır. Örneği sızdırmaz bir yüksek basınç ortamında tutarak, geleneksel çözücüler için daha yüksek sıcaklıklar kullanılmasına izin veren bir donanım kullanır. Yükseltilmiş basınç, çözücünün daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde bulunmasını sağlar. PLE’ de verim ve seciciliği 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 [26]. Termal enerji kullanımı benzer moleküller arasındaki kohezyon ve farklı moleküller

arasındaki adezyon kuvvetlerinin üstesinden gelinmesine yardımcı olur. Bu durumda geri bırakma (desorpsiyon) süreci için gerekli aktivasyon enerjisi azalır. Yükseltilmiş sıcaklık çözücünün, çözünenin ve matriksin yüzey gerilimini düşürür. Bu yüzden örneğin ıslanması artar. Çözücü yüzey geriliminde azalma, çözücü kavitesinin daha kolay oluşmasını sağlar. Böylece analitlerin çözücüde daha hızlı çözünmesine izin verilir [27]. Artan sıcaklık sıvı çözücünün 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 çözücü miktarını önemli ölçüde azaltırken, ekstraksiyon sürecinin hızını artıran yüksek difüzyon sınırları kullanmasıdır [28]. Yükseltilmiş sıcaklık nedeniyle ekstraksiyon kinetiği de daha hızlıdır. PLE' nin amacı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanarak sıvı ekstraksiyonunu geliştirmektir. Yüksek sıcaklık ve basınç, çözücünün örnek matriksinin içine nüfuz etme kabiliyetini artırır. Genellikle ekstraksiyon, çözücünün atmosferik kaynama noktasının üstündeki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Analitlerin yayılma gücü ve çözünürlüğü, artan sıcaklıkla artmaktadır. Bu ekstraksiyonu daha hızlı ve daha etkin yapmaktadır [26,29]. Ekstraksiyon sırasında uygulanan basıncın temel avantajı, sıcaklık kaynama noktasının üzerine çıksa bile çözücünün sıvı durumunda kalmasıdır. Ekstraksiyon esnasında yüksek basınç, çözücünün analite ulaşmasını engelleyen, matrikste bulunan hava kabarcıkları ile ilgili problemleri kontrol eder. Bu koşullar analitin çözünürlüğünü ve matriksten desorpsiyon kinetiğini artırır [30].

Bu yüzden tüm süreç Soxhlet ekstraksiyonundan daha hızlıdır. Isıtma sonrasında ekstraksiyon hücresi, çözücünün normal kaynama sıcaklığının altına kadar soğutulur. Daha sonra hücreye yüksek basınç uygulanır. Bu basınç, çözücü ve ekstrakte edilen materyali bir filtreden geçerek dışarıya çıkmaya zorlar. Ekstraksiyon kinetiğini artıran 200 °C' ye kadar yükseltilmiş sıcaklıkların kullanılmasından dolayı, çözücünün kaynamasını önlemek için 20 MPa kadar basınç gereklidir. Gerekli çözücü miktarı, geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan miktardan daha azdır. PLE' nin sınırlaması, ısısal kararlı olmayan örnekler için uygun olmamasıdır [31].

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, çözücü secimi, çözücü hacmi ve yüklenen örnek miktarıdır. Orijinal örneğin bileşimine (organik bileşim, su içeriği, partikül boyutu ve heterojenite) ek olarak, örnek on hazırlama teknikleri de (kurutma, öğütme gibi) sonucu etkileyebilir [32].

PLE statik modda, dinamik modda veya bunların kombinasyonu ile gerçekleştirilebilir. Dinamik modda, çözücü 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 [33].

Statik ekstraksiyon modu şu basamakları içerir:

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

PLE sisteminde toplanan hacim miktarı hücre büyüklüğüne bağlıdır. 10-100 mL arasında olabilir. Bu yüzden son ekstraktı deriştirmek için buharlaştırma basamağı gereklidir [33].

Örnek ekstraksiyon hücresine yüklenmeden önce, genellikle önişlem uygulanır. Toprak ve benzeri matrikslere hava ile kurutma (24-48 saat) ya da dondurarak

kurutma uygulanır [34,35]. Örneğin kurutulması önemlidir. Çünkü matriksteki su ekstraksiyon verimini düşürür. Soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, yüksek miktarda suyla başa çıkmak için örneğe sodyum sülfat eklenmesi önerilmiştir [36,37]. Kurutma basamağını çoğunlukla eleme (2 mm elek) [38] veya örneğin 100-1000 µm aralığında bir boyuta öğütülmesi izler [39]. Örneğin daha küçük boyutlara öğütülmesi (<15µm), kısaltılmış difüzyon yol uzunluğundan dolayı analitin partikül yüzeyine taşınmasını kolaylaştırmada avantaj sağlayabilir [32].

Ekstraksiyon verimi, örnek matriksinin doğasına, ekstrakte edilen analite ve analitin matriks içindeki yerine bağlıdır. Heterojen örneklerin ekstraksiyon süreci Pawliszyn tarafından 2003 yılında bir model çizilerek açıklanmıştır [40]. Bu model örnek partikülünün gözenekli ve bir organik katman tarafından sarıldığını varsaymıştır. Ekstraksiyon ve analitin örnek matriksinden geri kazanımı birkaç basamakta belirtilebilir. İlk olarak analitin ekstraksiyon kabından uzaklaştırılabilmesi için, bileşik örnek matriksindeki etkin bölgelerden geri bırakılır. Daha sonra matriks sıvı ara yüzüne ulaşabilmek için, matriksin 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 [33,40].

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

1. Matriks yüzeyine adsorbe olması
2. Bir çözücü gözenğinde çözünmesi ve/veya yüzeye adsorbe olması
3. Matriksin mikro/nano gözenğinde çözünmesi/adsorplanması
4. Matrikse kimyasal olarak bağlanması
5. Ekstraksiyon çözücüsünde çözünmesi [40].

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 [41,42].

1.3.2.1. PLE Uygulamaları

PLE, katı ve yarı-katı örneklerin ekstraksiyonu için geliştirilmiş bir tekniktir. Örnekler genellikle toprak, tortu veya gıda örnekleridir. Çoğu durumda, PLE için organik çözücüler kullanılır. Kritik altı (subcritical) su ekstraksiyonu veya basınçlı sıcak su ekstraksiyonu olarak adlandırılan teknikte, suyun ekstraksiyon çözücü olarak kullanılması da mümkündür. Bir çözücü 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 çözücüler yardımıyla (özellikle metanol) ekstrakte edilir. Cam ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada polifenollerin ekstraksiyonu için basınçlı su ekstraksiyonu araştırılmıştır [43]. 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 [44]. Son zamanlarda, non-iyonik yüzey aktif çözeltiler alternatif bir çözücü sistemi olarak kullanılmıştır [45].

Luthria ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada soya fasulyesinde isoflavonların ekstraksiyonu için sistematik bir çalışma gerçekleştirilmiştir [46]. Yedi farklı çözücü karışımı değerlendirilmiştir: asetonitril-su; etanol-su; metanol-su; dimetilsulfoksit-etanol-su; dimetilsulfoksit-asetonitril; Genapol-su. Bu değerlendirme altı farklı ekstraksiyon tekniği kullanılarak yapılmıştır: Çalkalama, vorteksleme, sonikasyon, karıştırma, Soxhlet ve PLE. Soya fasulyesi örneklerinden optimum geri kazanım dimetilsulfoksit-etanol-su (5:70:25, h/h/h) çözücü karışımının kullanıldığı

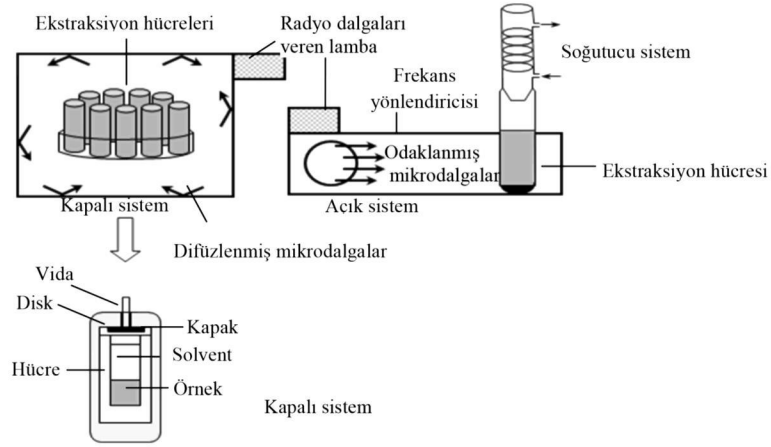
PLE yöntemi ile elde edilmiştir. Zhu ve arkadaşları herbisitlerin topraktan ekstraksiyonunda, kuru topraklar için ekstraksiyon verimine basıncın az etkisi olduğunu gözlemişlerdir ve 100-150 °C sıcaklıkta verimin arttığını bulmuşlardır [47]. Bununla birlikte toprağın nemli olması durumunda 500 psi' dan 1500 psi' ya artan basınç, pestisitlerin daha iyi çözünmesinden dolayı faydalıdır [48]. 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 [49]. Bu uygulamada ekstraktant olarak CO₂ kullanılmıştır. CO₂' nin yoğunlaşması için ekstraksiyon sistemi, soğutucu su (0 °C) pompalayan sıcaklık ayarlı banyo içine daldırılmıştır.

1.3.3. Mikrodalga Destekli Çözücü Ekstraksiyonu (MAE)

Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar (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 $4,9 \times 10^9$ defa rastgele dağılır. Bu zorlanmış moleküler hareket, ısınmayla sonuçlanır [20,33]. MAE' de mikrodalga ışıması, ekstraksiyon çözücüsünü ve böylece de örneği ısıtmak için kullanılır. Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun çözücü secimi çok önemlidir. Seçilen çözücülerde mikrodalga ışımasını absorplaması, çözücünün matrisle etkileşimi ve analitin çözücüdeki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. Daha büyük dipol momente sahip olan çözücü, mikrodalga ışıması altında daha hızlı ısınacaktır. Örneğin hekzan gibi nonpolar bir çözücü (dipol moment $<0,1$) ısınmayacak, oysa 2,69 dipol momente sahip aseton birkaç saniye içinde ısınacaktır [50]. Eğer ekstraksiyonda hekzan ve toluen gibi nonpolar çözücüler

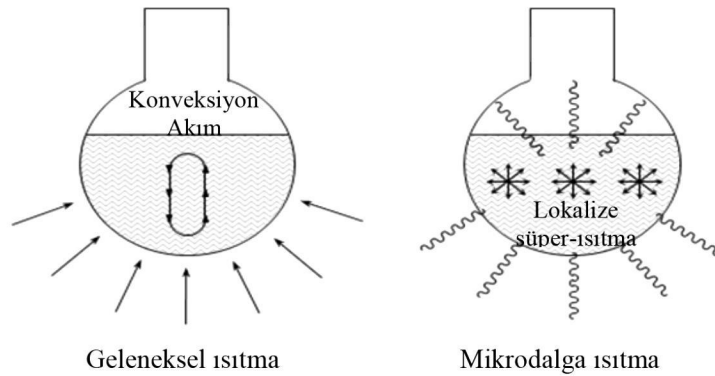
gerekliyse, çözücüleri su metanol ve aseton gibi yüksek bir dipol momente sahip polar çözücülerle karıştırmak önerilir. Seçilen çözücü çok kuvvetli ısınmaya neden olursa, bileşiklerin degradasyonundan kaçınılamaz. Bu yüzden yaygın uygulama, yalnızca biri mikrodalga ışımayı absorplayan ikili karışımların (örneğin hekzan-aseton, 1:1) kullanımınıdır [51]. Diğer önemli faktörlerden biri de, ekstraksiyon çözücüsü ile ekstraktın analizinde kullanılan analitik metodun uyumluluğudur. Gaz kromatografik analizler için daha az polar çözücüler, sıvı kromatografik analiz ve immunoassay teknikler için daha polar çözücüler tercih edilir. MAE' nin seciciliği üzerine çok az literatür rapor edilmiştir. Örneğin içindeki tüm maddeler ekstrakte edildiğinden secici bir ekstraksiyon tekniği olduğu söylenemez ve hemen hemen her durumda ekstraksiyon sonrası temizleme basamağı gereklidir [50].

Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kaptaki gerçekleştirilir. Bu durumda basınç artar ve çözücü kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ısıtılabilir. Çoğu çözücü için (aseton, aseton-hekzan, diklormetan aseton gibi) kabın içindeki sıcaklık, çözücünün 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 1.3.' de gösterilmiştir [52]. Kapalı kap sisteminde hücreler eşzamanlı olarak ısıtılırken, açık sistemde kaplar sıralı olarak ısıtılır. Açık kaplarda sıcaklık çözücünün atmosferik basınçta kaynama noktasıyla sınırlıyken, kapalı kaplarda sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilir [53]. 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) [54].



Şekil 1.3. MAE'de kapalı ve açık sistem

Kapalı kap teknolojisi, PLE teknolojisiyle çok benzerdir. Her iki sistemde de çözücü ısıtılır ve basınç uygulanır. Temel fark, ısıtmadır. Biri mikrodalga, diğeri geleneksel fırın ısıtmasıdır (Şekil 1.4.) [55]. PLE' de, etkili parametrelerin sayısı azalır. Bu nedenle bu tekniğin uygulanması pratikte daha basittir.



Şekil 1.4. Isıtma modelleri

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 ısıtma uygulanır ve çözücüsü 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 [20].

1.3.3.1. MAE Uygulamaları

MAE, sıvı örnekler için de uygun olmasına rağmen, tipik olarak katı örnekler için kullanılır. MAE uygun bir çözücü seçimiyle, organik bileşikleri dekompoze etmek ve yükseltmek için kullanılabilir. Ekstraksiyon genellikle 20-50 mL çözücü gerektirir [56].

MAE genellikle çevresel analizlerde kullanılır. Tortu ve toprak gibi matrislerden, poliaromatik hidrokarbonlar, polikloro bifeniller ve organoklorlu pestisitlerin ekstraksiyonları çalışılmıştır [57,58]. Zaman, sıcaklık, basınç ve nem içeriği gibi değişkenlerin ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmıştır. Çoğu çalışmada matris neminin ekstraksiyon verimini artırdığı bulunmuştur [20,55]. MAE gıda analizlerine de uygulanmıştır. Bouaid ve arkadaşları portakal kabuğunda atrazin ve dört organofosforlu pestisiti tayin etmişlerdir [59]. Ekstraksiyon hekzan/aseton (1:1) karışımında, 90 °C sıcaklıkta, 10 dakikada ve 475 watt (w) mikrodalga gücünde yapılmıştır. Ekstraktlar gaz kromatografisi-azot-fosfor detektör (GC-NPD) ile analiz edilmiştir. Papadakis ve arkadaşları, susam tohumlarında 16 organoklorin insektisitinin ekstraksiyonunu MAE ile gerçekleştirmişlerdir [60]. Çözücü karışımı olarak su:asetonitril (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 [61]. 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

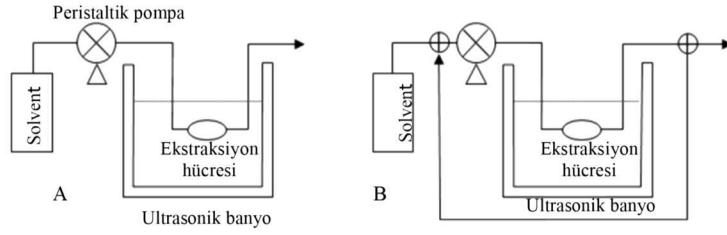
analiz edilmiştir [62]. Diğer bir uygulama alanı terpenler, alkaloidler, uçucu yağlar, karetenoidler gibi doğal ürünlerin ekstraksiyonudur. Paprikada renk pigmentleri ekstrakte edilmiştir. Aseton-su (1:1, v/v) çözücü karışımı kullanılarak elde edilen optimal koşullar; 120 saniye ekstraksiyon zamanı ve 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 [63]. Ayçiçeği tohumlarındaki pestisit atıklarının tayini için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak diklormetan çözücüsüyle 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 [64]. Toprakta nitratlanmış polisiklik aromatik hidrokarbonların hızlı ekstraksiyonu için mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu önerilmiştir. Işınlama gücü, zamanı, devir sayısı ve çözücü hacmi, deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir [65].

1.3.4. Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu (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 ufak kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve çözücü arasında etkin bir temas sağlar [66]. Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır. Katı örneklerin ekstraksiyonu ve bulamaç oluşumu işlemini destekler. Sıvı örneklerde ise,

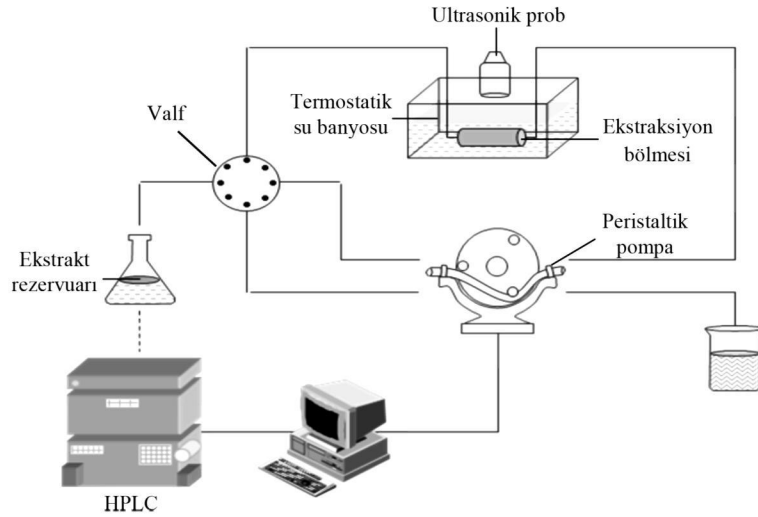
sıvı-sıvı ekstraksiyonu, homojenizasyonu veya emülsiyon haline getirmeyi desteklemek için kullanılır [67]. Katı örneklerden analitlerin ekstraksiyonu, su banyosuna ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla veya prob (ultrasonik aygıtların ucunda bir alıcı bulunan hareketli kısmı) gibi diğer cihazlarla gerçekleştirilir [68]. En çok kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur [69]. Ayrıca örneklerin sonikasyonu için güçlü silindirik bir prob kullanan daha etkin bir sistem geliştirilmiştir [70]. 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 [67].

Ekstraksiyon verimini artırmak için çözücü 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, çözücü miktarını azaltmayı sağlamak için analitik örnek hazırlama işlemlerine özel önem verilmektedir. Ultrason radyasyonun ilginç bir uygulaması dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyondur. Burada numune ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi [71,72] veya ultrasonik problu bir su banyosu içine konulur. Bu sistem taze ekstraksiyon çözücüsünün sürekli olarak örneğe pompalandığı, artan analit transferi olan açık bir sistem veya ekstraktın seyrelmesini engelleyen ekstraksiyon çözücüsünün yeniden dolaştığı kapalı bir sistem olarak kullanılabilir (Şekil 1.5.) [67]. MAE sistemi gibi, SAE sistemi de statik veya dinamik bir sistem olabilir. Analitler katı matriksten çözücüye transfer olur olmaz uzaklaştığından, dinamik ekstraksiyon kullanımı daha avantajlıdır. Diğer bir avantajı da, dinamik sistemde örneğin sürekli olarak taze çözücüye maruz kalmasıdır. Bu durum analitlerin örnek matriksinden çözücüye transferini artırır. Ekstraksiyon tipik olarak 20-200 mL çözücü gerektirir ve ekstraksiyon zamanı 2 ila 20 dakika aralığındadır.



Şekil 1.5. Dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi A) Açık sistem B) Kapalı sistem

Ayrıca, dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyon ile enstrümental analiz yönteminin çevrim içi bağlanması mümkündür (Şekil 1.6.).



Şekil 1. 6. Dinamik ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonun analiz sistemine bağlanmasının şematik gösterimi [73].

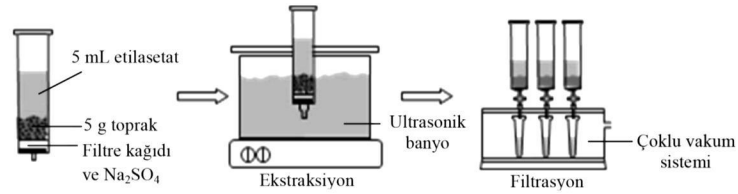
1.3.4.1. SAE Uygulamaları

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 [31].

Sanchez-Brunete ve arkadaşları toprakta pestisitlerin tayini için küçük kolonlarda ses dalgaları destekli ekstraksiyon olarak adlandırılan minyatürize edilmiş

bir teknik geliştirmişlerdir [74]. Şekil 1.7.' de toprak ekstraksiyonu Şematik olarak gösterilmiştir.

Bu teknik daha yőuksek polaritedeki karbamat pestisitlerin ekstraksiyonuna uygulanmıştır. Ekstraksiyon cőzőcőső olarak, % 82 ile % 99 aralığında geri kazanım elde edilmesini sağlayan metanol seğilmiştir [75]. Son zamanlarda, farklı kimyasal sınıfta ve geniş polarite aralığında 50 pestisit in eş zamanlı analizinde uygulanan bu yőontemde etil asetat ekstraksiyon cőzőcőső olarak kullanılmıştır. Yőuksek tekrarlanabilirlik ve dőřuk gőzlenebilme limitleri elde edilmiştir [76].



Şekil 1.7. Kőçük kolonlarda ses dalgaları-destekli ekstraksiyonun Şematik gösterimi

Ses dalgaları-destekli Soxhlet ekstraksiyonu ayęięeęi, kolza ve soya fasulyesi tohumlarından toplam yağ iğeriğini ekstrakte etmek için kullanılmıştır. 10 g örnek, selőloz ekstraksiyon kartuşuna 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 kartuşuna ses dalgaları uygulanması, yağın kantitatif ekstraksiyonu için gerekli Soxhlet ekstraksiyon cevrim sayısını cők bőyők őlęde azaltmış böylece ekstraksiyon zamanı geleneksel işlemlere kıyasla yarı yarıya azalmıştır [49].

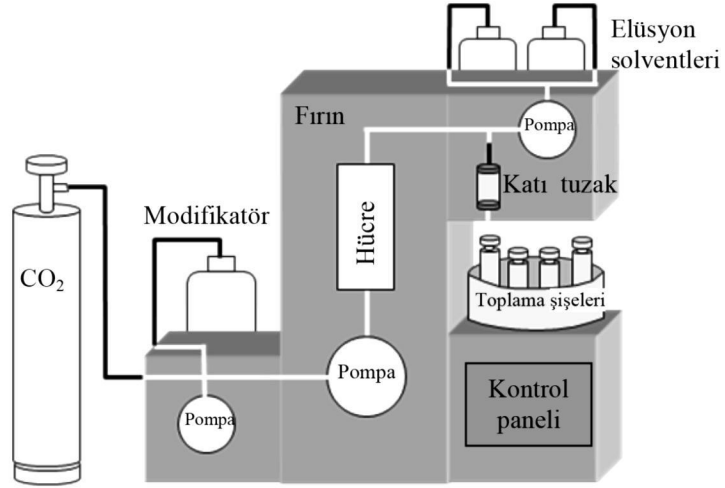
1.3.5. Sőperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)

SFE' de, ekstraksiyon sıvısı, kritik ūstő haldedir. Sőperkritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı ūzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı ūzerinde basınc uygulanan bir element, madde veya karışım olarak tanımlanır. Bir sőperkritik 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 [77,78]. 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 [77]. SFE’ de, akışkan sürekli olarak örnek içinden geçmeye zorlanır. Bu yüzden kantitatif veya tam bir ekstraksiyon sağlayabilir [79]. 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 diklorometandır.

SFE’ de süperkritik akışkan üretimi, basınç, sıcaklık ve akış hızı kontrolü sağlayan bir cihazla gerçekleştirilir (Şekil 1.8.) [33]. Genellikle ekstraksiyon dinamik moda uygulanır. Fakat statik veya statik/dinamik birleştirilmiş ekstraksiyon da uygulanabilir. Ekstrakt ya uygun bir çözücü içinde veya katı-faz tuzağında (trap) toplanır. Ekstraksiyon 10-20 mL çözücü gerektirir ve ekstraksiyon süresi 20-60 dakika aralığındadır. Geleneksel yöntemlere göre belirgin avantajı kısa ekstraksiyon zamanı ve organik çözücülerin az kullanımındır. Bazı çalışmalar 20-60 dakikalık SFE’ nin, birkaç saatlik Soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek geri kazanımlar sağladığını göstermiştir [80,81]. Referans standart materyaller olan tortu ve kas dokusundan poliklorlu bifenillerin, SFE ve Soxhlet ekstraksiyonuyla tayini yapılarak

yontemlerin karşılaştırılması sağlanmıştır. SFE ile poliklorlu bifenillerin tayininde ekstraksiyon süresi 18-24 saatten 50 dakikaya indirilmiş ve Soxhlet ekstraksiyonu ile 250 mL olan organik çözücü kullanımı 7,5 mL ye düşürülmüştür [82]. Genelde, SFE katı örneklerden organik analitlerin ekstraksiyonu için kullanılır. Isısal olarak kararsız analitler için de uygundur.



Şekil 1.8. SFE Sistemi

SFE, çevresel, farmasotik, 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 [83], preslenerek elde edilen yeşil kahve yağında [84], ham palmiye yağında [85] ilgilenilen bileşiklerle zenginleştirilmiş ekstraktlar elde etmek için alternatif bir saflaştırma metodu olarak SFE önerilmiştir. Yeşil çaydan secici olarak kafein ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak su ile süperkritik CO₂ kullanılmış ve matriksten antioksidanların ekstraksiyonu önlenmiştir [86]. Uçucu yağlar, yağ asitleri [87] ve/veya karotenoidler gibi biyoaktif bileşikler [88] 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 [89].

SFE' nin en ilginç uygulamalarından biri, genetik olarak değiştirilmiş farklı mısır ve soya türlerinde amino asit 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 [90].

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 [91]. Tarımsal ve endüstriyel toprak örnekleri suyla modifiye edilmiş süperkritik CO₂ kullanarak 300 bar basınçta, 130 °C sıcaklıkta ve 50 dakika süreyle ekstrakte edilmiştir. Kirlilikler alümina 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.

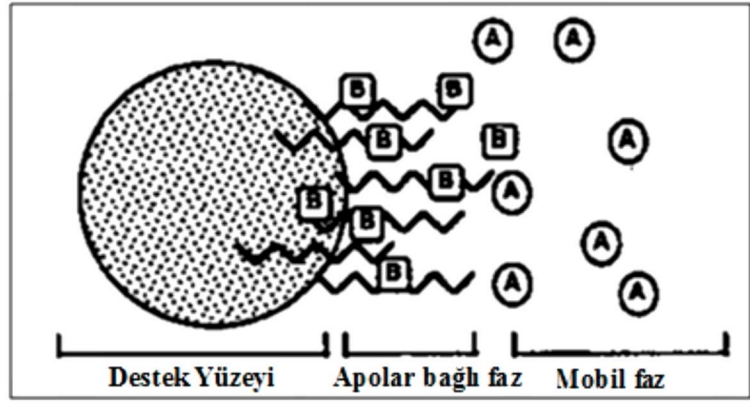
1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Kromatografi, karışımlardaki kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan bir analitik metottur [92]. Sıvı kromatografide (LC), hareketli faz, sıvı; durgun faz, çok küçük boyutta katı parçacıklardan oluşur. Hareketli fazda bulunan bileşenler, sabit faz dolgu maddesiyle etkileşirler. Numunedeki her bileşen farklı miktarlarda tutulduğu için sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler.

HPLC günümüzde,

1. Sıcaklıkla bozulan maddelerin ayrımlarında kullanılabilmesi
2. Etkin ayırma ve hızlı analiz sağlanması
3. HPLC kolonlarının rejenerasyon gerektirmeden tekrar kullanılabilmesi
4. Ayırmanın etkinliğine tesir eden parametrelerin kontrolü ile tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi
5. Cihazın otomasyona ve veri analizine uygun olması
6. Çok çeşitli detektörle tayin imkânı tanınması
7. Geniş skalada çalışmaya adapte edilebilmesi ve preparatif amaçlar için uygun olması
8. Doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesi. Nedenleriyle oldukça yaygın kullanılan bir ayırma tekniği haline gelmiştir.

Sıvı kromatografi çalışmalarının % 90 kadarı ters faz sıvı kromatografi modunda gerçekleştirilir. Ters faz sıvı kromatografi (RP-HPLC), hidrofobik karakterli kimyasal bağlı durgun faz ve bundan daha polar mobil faz ile gerçekleştirilen bir dağılma/adsorpsiyon kromatografisi türüdür. Mobil faz olarak suyu metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran gibi çözücüler ile karışımları kullanılır. Bu tip bir çalışmada, durgun faz apolardır. Dolayısı ile apolar bileşikler, bu tip durgun fazla daha etkin etkileşerek daha yavaş hareket ederler. Daha polar bileşikler, kolonu hızla terk ederler. Şekil 1.9.' da hidrofobik karakterli analitin apolar yüzeyle etkileşimi, şema olarak verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi hidrofobik analit, apolar bağlı yüzeyle daha çok etkileşime girer ve en son yüzeye tutunur.

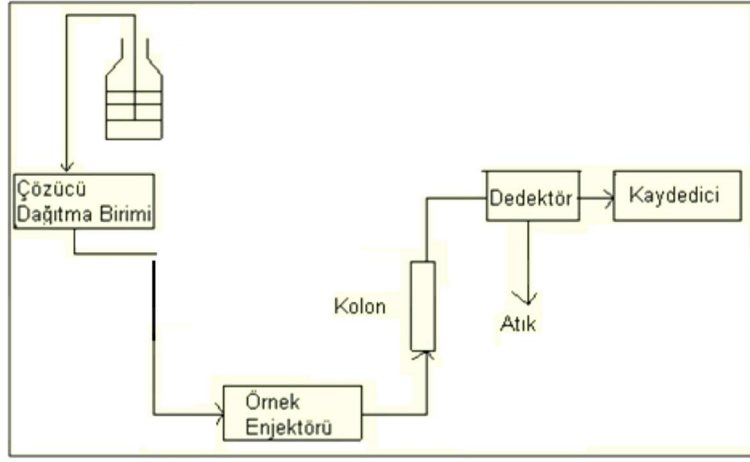


Şekil 1.9. Hidrofobik karakterli analitin apolar yüzeyle etkileşimi; A: çok polar analit
B: az polar analit

1.4.1. HPLC Cihazı

Bir sıvı kromatografi sistemi özetle aşağıdaki bileşenlere sahiptir (Şekil 1.10.):

- Sistem kontrol ünitesi
- Pompalama sistemi
- Numune enjeksiyon sistemi
- Kolon
- Detektör
- Mobil faz hazneleri
- Yazıcı

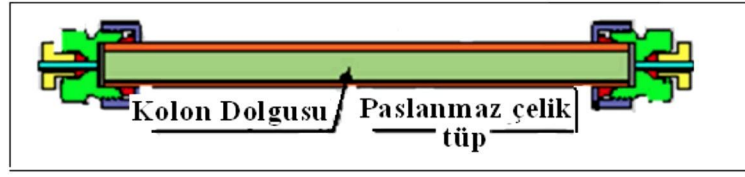


Şekil 1.10. Sıvı kromatografi cihazının şematik görünüşü

1.4.2. HPLC de Kolon Seçimi

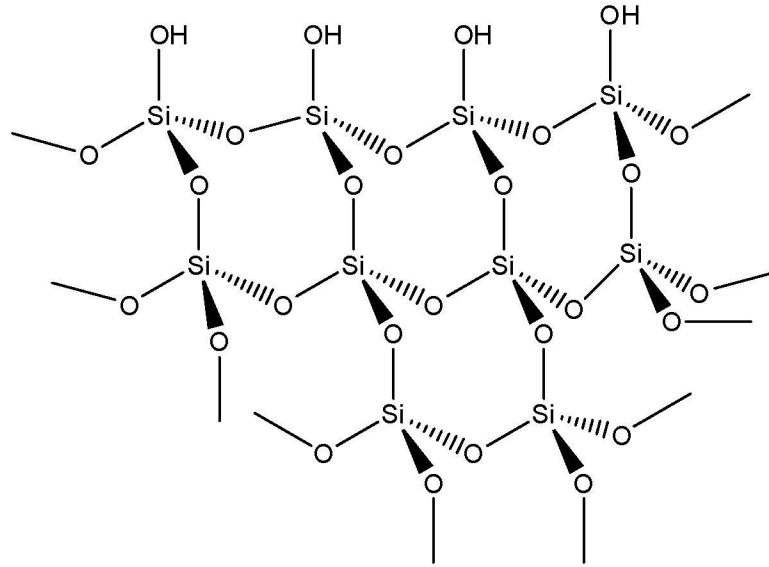
Sıvı kromatografik çalışmalarda alıkonmayı etkileyen temel faktörlerden biri, analitin kolon ile etkileşimidir. Bu nedenle bir ayırmaya başlanırken ilk öncelik, iyi bir kolon seçimidir. RP-HPLC’ de dolgu maddesi olarak kullanılanların çoğu silika esaslı bağlı fazlar içerir. RP- HPLC de sıklıkla kullanılan durgun fazlar, C₈, C₁₈ düz zincirli alkil gruplu silika yapısındadır. Bu kolonlar C-8 ve C-18 diye tanımlanır. Ancak aynı tipte olsalar bile farklı özellikte olacakları ve farklı davranış gösterecekleri bilinmelidir. Farklı kolonlarda bileşiklerin elüsyon sırası ve ayrılma davranışları farklıdır.

LC çalışmalarında önce cam kolonlar kullanılmıştır. Bunların uzunlukları 50-500 cm olup çapları 1-5 cm dir. Günümüzde paslanmaz çeliklere dolgu maddesi konulmakta ve bunlar kolon olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.11.). Farklı tipte ve farklı tanecik boyutunda yüzlerce tip kolon geliştirilmiştir. Gerektiğinde seri bağlanarak uzunlukları ve bir diğer deyimle etkin tabaka sayıları arttırılmaya çalışılmaktadır. Kolon dolgu maddelerinin parçacık boyutlarının küçülmesi (3-10 µm) ile kolon etkinliği arttırılmıştır.



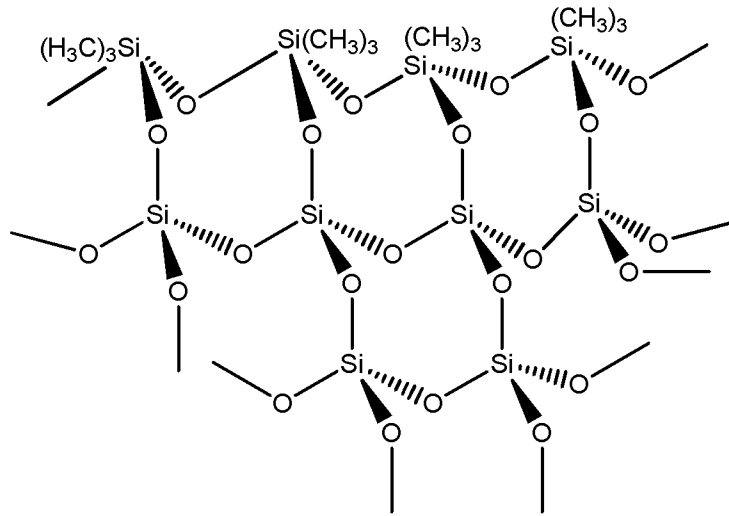
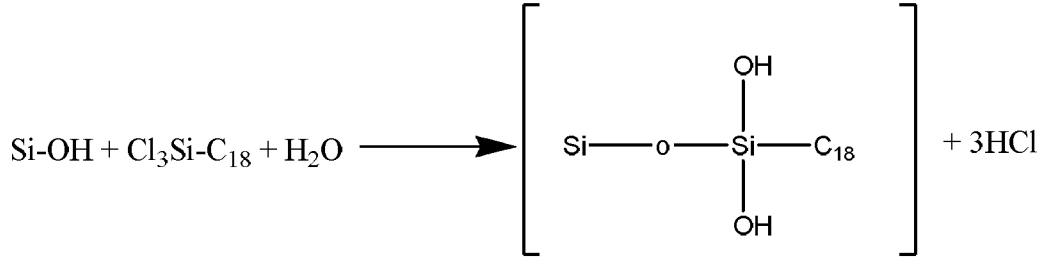
Şekil 1.11. Standart kolon donanımı

Silika destek yüzeyine durgun fazın kovalent bağlanması sonucunda, termal hidrolik ve kararlı bağlı faz oluşur. Şekil 1.12.' de durgun faz olan silika ve silanoller belirtilmiştir. Silikanın uzun zincirli hidrokarbon grupları ile alkilenmiş durumu Şekil 1.13.' de gösterilmiştir.



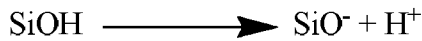
Şekil 1.12. Durgun Faz: Silika SiO₂

Silika dolgu maddesinden bağılı fazın sentezine ilişkin tepkime, aşağıdaki gibidir:



Şekil 1.13. Uzun zincirli hidrokarbon grupları ile alkillenmiş silika

Silanol grupları, yüzeyde aşağıda verilen denklem gereği iyonlaşır;



Bu denge, pK_a , SiOH iyonlaşma sabiti ile karakterize edilir ve sabitin değeri 6,5' dir. Silanol gruplarının iyonlaşması pK_a SiOH'ın üzerindeki pH değerlerinde iyonlaşmanın daha fazla olmasından dolayı durgun fazda negatif yüklenmenin artmasına sebep olur. Bu durum (-) yüklü iyonların gözenekleri terk etmelerine yol açar. Sonuçta negatif kapasite faktörleri elde edilir. İyonik dışlama, hareketli fazın iyon şiddetinin artması ile minimize edilebilir. Mobil fazın yüksek iyon şiddeti, silanolü maskeleyen etkisi nedeniyle pik şeklini iyileştirir. Ancak bu durum kolon bozunmasının artmasına sebep olabilir. Ayrıca silanol gruplarının farklı çevreleri, bunların farklı davranmalarına neden olur. Silanol grupları, çözünen moleküller ile

elektrostatik olarak etkileşebilir. Bu etkileşimler uzun mesafede etkindir ve çözünen moleküller yüzeye yaklaşamayacak kadar büyük olduğunda bile büyük rol oynar. Silanol grupları, mobil fazın bileşenleri ile (su, organik modifiyer, tampon iyonları) de etkileşebilir ve bu etkileşim, durgun fazın yapısını ve bileşimini değiştirebilir. Kolonun ayırmadaki olumsuz etkileri, materyalin yapısında metal safsızlıklarının bulunmasından da kaynaklanır.

Oktadesil silika kolonlarda silanol gruplarının tamamı kapatılmamıştır. Kolonda kalıntı silanol gruplarının bozucu etkisi, silanol gruplarının yeterince kapatılmadığı durumda daha etkindir. Silika esaslı ters faz kolonlarında kalıntı silanol grupları, polar bileşikler ile etkileşir. Bu istenmeyen etkileşimleri azaltmak için endcapping (silanol gruplarını kapatma) işlemi uygulanır. Metil grupları, kalıntı silanol gruplarının kapatılmasında tercih edilir. Polar bileşiklerle olumsuz etkileşim istenmiyorsa endcapped kolonlar tercih edilir [93].

Kolon dolgu malzemesinde dikkat edilmesi gereken bir diğer kavram karbon yüklemesidir (Şekil 1.14.). Karbon yüklemesi durgun fazdaki karbon içeriğini ifade eder. Silika esaslı kolonlarda kolon silika materyaline bağlı fazın miktarını ifade eder. Aynı durgun fazın kullanılması durumunda kolon dolgu taneciklerinin yüzey kaplamasını karakterize etmek için kullanılan bir terimdir. C₁₈ kolonların karbon yüklemesi, C₈ kolonlardan daha yüksektir: Karbon yüklemesi daha az olan kolonların hidrofobik özelliği daha düşüktür ve karbon yüklemesi daha büyük olan kolonlardan daha düşük alıkonma zamanları söz konusudur. Karbon yüklemesi arttıkça, kapasite faktörleri artar. Benzer hidrofobik özellikteki bileşikler için ayırma faktörü de büyür.



Şekil 1.14. Karbon Yüklemesi

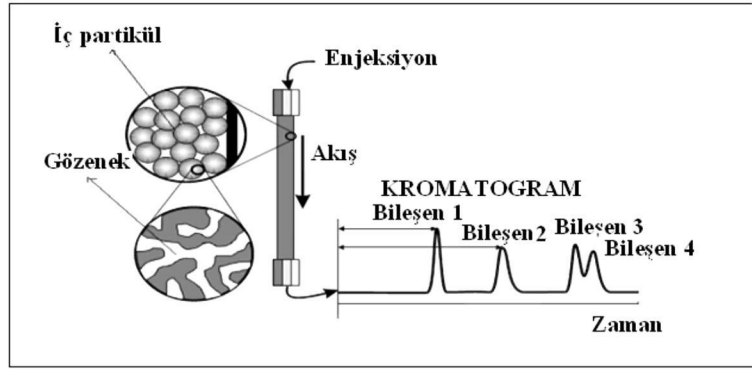
Ters faz sıvı kromatografi kolonlarının ilk geliştirilenlerinde pH aralığı, 1-8 dir. Birçok kolon düşük pH' larda ($pH < 3$) çalışmaya uygundur. Ancak düşük pH' larda çalışılması durumunda, bazı bileşiklerin kararsız olması, protonlanmış bazik bileşiklerin çok çabuk elue olması ve bu pH'larda bant genişliğinin yeterli olmaması nedeniyle pH 4-8 ve hatta $pH > 9$ koşullarında çalışmak uygun gelebilir. Bu nedenle bazlarla çalışmada pH kararlılığı artırılmış ve pH aralığı genişletilmiş kolonlar gerekir.

1.4.3. İzokratik ve Gradient Ayırma

Bir kromatografik ayırmada çalışmacı kolon tipine ve kolon boyutlarına karar verdikten sonra organik modifiyer tipine ve tamponuna karar verir. Bu noktada elüsyon modunu seçmek zorundadır. Elüsyon gücünü değiştirmeden aynı çözücü ile yapılan ayırma, izokratik ayırmadır. Polariteleri farklı iki (veya daha fazla) çözücü kullanılması durumunda gradient ayırma söz konusudur. Gradient ayırmada sıklıkla 2 çözücü kullanır. Bunlardan ilki, su veya az miktarda organik çözücü içeren ikili karışımdır. İkinci ise organikçe zengin veya tamamen organik olan mobil fazdır. İzokratik elüsyonla ayrılamayan maddeler, gradient elüsyonla ayrılabilen; geç elüe olan maddelerin alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir. Gradient çalışmada akış hızı kolonun dengelenmesine olanak sağlayacak şekilde seçilir. Bu nedenle akış hızı, izokratik elüsyondan daha düşüktür. Ayrıca gradient elüsyonda hayalet pikler, baseline da gürültü ve çözücü karışım ekipmanından dolayı problemler vardır. Son zamanlarda kolon gelişiminin olumlu getirileri, çok az bir dengeleme yapılmasının yeterli olabileceğini ve alıkonma zamanlarında yeterli tekrarlanabilirliğin elde edilebildiğini göstermiştir.

1.4.4. Kromatografide Temel Parametreler

Kromatografide veri yorumlanmasında kromatogram esas alınır. Kromatogram, tayini yapılan numunenin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun dedektörle saptanması ile elde edilmiş pik grafiklerdir. Kolonu terk eden maddelerin derişimleri uygun biçimde ölçülür; zamana karşı y- ekseninde işaretlenerek ‘kromatogram’ adı verilen grafikler elde edilir (Şekil 1.15.).



Şekil 1.15. Kolonda analit bileşenlerinin ayrılması ve kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında kullanılan başlıca parametreler aşağıda verilmiştir:

- i. Alıkonma zamanı, t_R ve kapasite faktörü, k
- ii. Seçicilik, α
- iii. Etkin tabaka sayısı, N
- iv. Ayırma gücü, R_s

1.4.4.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı ile (t_R) tanımlanır. Kromatografik karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine sıklıkla kapasite faktöründen (k) yararlanılır. Analizi yapılan türlerin kolon içinde göç etme hızı, kapasite faktörü olarak ifade edilir.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Yukarıdaki formülde t_0 alıkonulmayan türün dedektöre kadar ulaşma zamanı (ölü zaman), t_r , analitin dedektöre ulaşma zamanıdır. Kapasite faktörü; uygulanan yönteme, her maddenin fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklılıklar gösteren bir değerdir. Kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Bileşenin kolonda iyi tutulması durumunda k değeri büyük olur yani bileşen kolon boyunca yavaş ilerliyor demektir. Buna mukabil k değeri küçük ise bileşen mobil faza ilgi duyuyor yani bileşen kolon boyunca hızlı ilerliyor demektir. HPLC çalışmalarında k mümkün olduğu kadar 1 ile 10 arasında tutulmalıdır. Kapasite faktörü çok küçük olursa, bileşik çözücü pikinden ayrılamaz; çok büyürse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerinin bu aralıkta olması, mobil faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.

1.4.4.2. Seçicilik

Kolonda daha uzun süre tutulan bileşene ait kapasite faktörünün, daha kısa süre tutulan bileşenin kapasite faktörüne oranı seçiciliği verir. Seçicilik faktörünün matematiksel ifadesi, aşağıdaki eşitlikte verilmiştir. α değeri, 1,15 ise iki bileşiğin %98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

$$\alpha = k_2/k_1 = (t_{R2} - t_{R0}) / (t_{R1} - t_{R0})$$

1.4.4.3. Teorik Tabaka Sayısı

Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgili olması münasebetiyle kolonun en önemli parametresidir. N' nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına (akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi gibi), dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ dir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntıyla ifade edilir:

$$N = 5,54(t_R/W_{0,5})^2$$

Yukarıdaki bağıntıya göre;

N: Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

1.4.4.4. Ayırma Gücü

Bir numunede bulunan bileşenlerin ne derece ayrıldıklarını gösteren kantitatif terimdir. Aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_A + W_B}$$

Burada,

R_s : Pik çifti için ayırma gücü

W: Kromatogramdaki pikin kenarından çizilen teğetlerle taban çizgisi arasında kalan uzaklıktır.

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak da hesaplama yapılabilir:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

Burada;

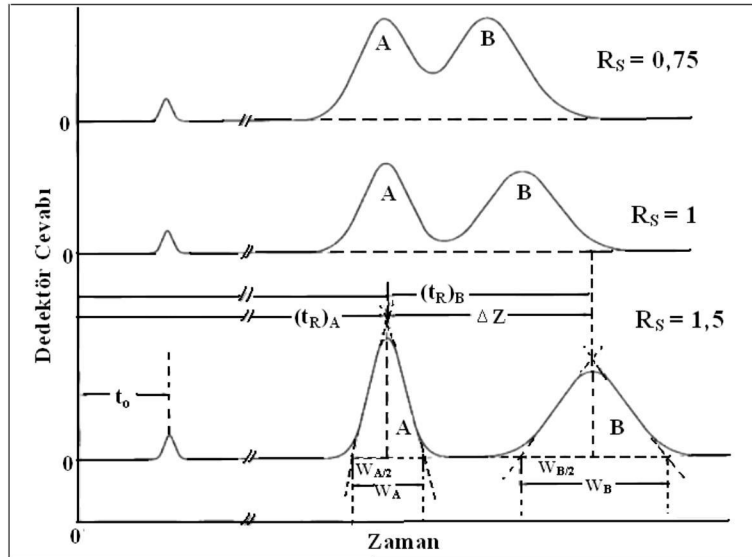
R_s : Pik çifti için ayırma gücü,

N: Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k_2 : İkinci pikin kapasite faktörüdür.

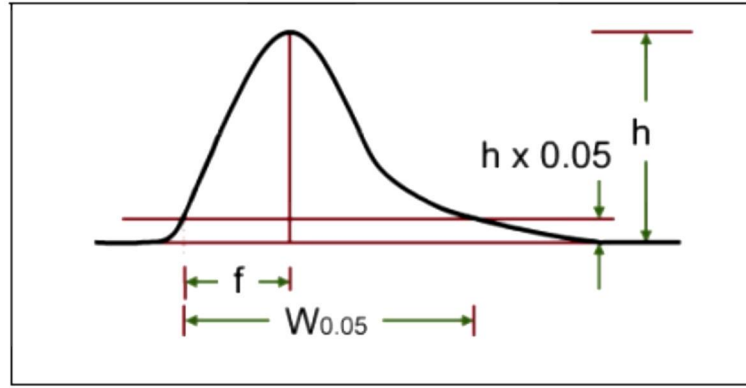
Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Sıvı kromatografide metot geliştirmede tüm pikler için ayırma gücünün $R_s \geq 1,5$ olması gerekmektedir. Şekil 1.16.' de üç R_s değerinde ayrılma görülmektedir.



Şekil 1.16. Aynı pik çifti için üç farklı ayırma gücü

1.4.4.5. Kuyruklanma Faktörü

Kromatografide bir diğer önemli faktör de kuyruklanma faktörüdür. Pik yüksekliğinin %5'inde hesaplanır. Pikin simetrik davranışını ifade eder. Simetrik bir pikte bu faktör 1'e eşittir. Rakamın 1 den farklı olması, kuyruklanmayı gösterir. Şekil 1.17.'de kromatogram üzerinde kuyruklanma gösterilmiştir.



Şekil 1.17. Kuyruklanma faktörünün kromatogram üzerinde gösterilişi
($Tf=W_{0,05}/2f$)

1.4.5. Mobil Faz Optimizasyonu

Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonma davranışlarında en önemli rolü oynar[94,95]. HPLC de çözücü gücü, polaritenin bir fonksiyonu olarak ifade edilebilir. HPLC çözücülerinde ayırma gücü, polarite ile terslik gösterir. Diğer bir deyişle su gibi polar bir çözücünün tetrahidrofur gibi apolar bir çözücünün yanında zayıf ayırma gücü gösterdiğini söyleyebiliriz. Bilindiği gibi sıvı kromatografide mobil faz olarak genellikle su organik çözücü ikili karışımları kullanılır. Mobil faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve HPLC' de çözünenin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. HPLC de alıkonma, mobil fazın organik çözücü içeriğinin artması ile azalır. Bu güç, çoğu zaman organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir. Sabit pH' da alıkonmanın çözücü bileşimi (ϕ) ile değişimini belirlemek üzere aşağıdaki doğrusal yaklaşım kullanılır [96].

$$\log k_i = \log k_0 - S_\phi$$

Bu lineer bağıntının geliştirilmesi için organik modifiyerin farklı derişimlerinde kapasite faktörleri belirlenir ve x ekseninde organik modifiyerin derişimi, y ekseninde kapasite faktörlerinin logaritması kullanılarak grafik hazırlanır. Bu tür bir lineer grafikte S, eğimdir; organik çözücünün çözücü gücü ile ilgili faktördür. Kapasite faktörü 1-10 arasında değilse logk' nın ϕ' ye göre çizimi doğrusal olmayan bir ilişki verir. İkinci dereceden denklemi kullanmamak için kapasite faktörünün 1- 10 arasında olması istenir. Bu bağıntıda k_0 , ϕ sıfır olduğunda yani mobil fazın organik modifiyer ihtiva etmemesi diğer bir deyişle saf su veya sulu tampon çözelti mobil faz olarak kullanıldığı koşuldaki kapasite faktörüdür. Bu bağıntı, HPLC de metot geliştirmede mobil fazın çözücü gücünün hesaplanmasında kullanılır. S değerleri, su için 0; metanol için 2,6; asetonitril için 3,2 ve tetrahidrofur için 4,5 dir [97,98].

1.4.6. Mobil Faz pH Standardizasyonu

Bir kromatografik ayırmada mobil faz pH sı, tamponlarla belirlenir. Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH' sı, önceleri sulu çözeltinin pH' sı olarak alınmıştır. Günümüzde organik modifiyer ilavesi ile pH değişimini göz önünde bulundurmak gerekir[99,100]. pH' sının sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir. HPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur [101-103].

Su ve su-organik çözücü karışımlarında referans değer pH standart çözeltisi (RVS) olarak potasyum hidrojen fitalat çözeltisi seçilmiştir ve 0,05 mol/kg fitalat temel alınmıştır [104-106].

Mobil fazın pH' sı, alıkonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Mobil faz pH' sı, çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve mobil faz katkılarının

davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. Mobil faz pH optimizasyonu, çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha karmaşıktır.

1.4.7. Alıkonmaya Etki Eden Faktörler

HPLC de seçicilik ve alıkonma, bileşiklerin, elüe edicinin, durgun fazın etkileşimi ile ilgilidir. Daha önce belirtildiği gibi alıkonmayı etkileyen temel faktörlerden biri, analitin kolon ile etkileşmesidir. İyonlaşabilen analitlerin aynı kolonda alıkonmasına; organik modifiyerin tipi, organik modifiyerin derişimi, sıcaklık ve mobil faz pH' sı etki etmektedir. HPLC ayırmalarında kullanılan organik modifiyer derişiminin artırılması elüsyonu hızlandırır yani alıkonmayı azaltır [107].

Alıkonmaya etki eden bir diğer faktör sıcaklıktır. Genel bir ifade ile Genel bir ifade ile sıcaklık artışı ile alıkonma azalır log k' ya karşı 1/T grafiği yaklaşık olarak lineerdir. Kabaca bir tahminle sıcaklıktaki 30 °C artış alıkonmayı 2 kat azaltır [108]. Sıcaklık arttıkça kromatografik verim artar; kolon geri basıncı azalır. Buna ek olarak sıcaklığı artırmak numunenin çözünürlüğünü artırır. Kolon sıcaklığını kontrol etmenin bir diğer avantajı alıkonma zamanı kararlılığının gelişmesidir. Bununla birlikte HPLC ayırmalarındaki seçicilik üzerinde sıcaklık etkisi çok azdır [109]. Göz önünde bulundurulması gereken bir diğer husus da sıcaklık artışının bağlı fazın bozunmasını artırıcı netice doğurmasıdır, bu sebepten kolon üreticileri çalışma sınırlarını önermektedir.

Dar sıcaklık aralığında, sıcaklığın alıkonma faktörü üzerindeki etkisi genellikle Van't Hoff eşitliği ile açıklanabilir. Bu eşitlik aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\log k = -\frac{\Delta H}{2,3 RT} + \frac{\Delta S}{2,3 R} + \log \Phi$$

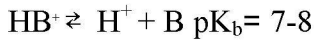
Bu bağıntıda ΔH ve ΔS , analitin durgun fazla ve mobil fazla etkileşiminin sonucunda oluşan entalpi ve entropi değişimidir. R gaz sabiti ve Φ faz oranını ifade etmektedir. Bu bağıntıya göre dar sıcaklık aralığında log k ya karşı 1/T grafiği

lineerlik göstermektedir[110]. ΔH , ΔS ve Φ parametreleri bu aralıkta sıcaklıktan bağımsızdır. Aynı şekilde Van't Hoff eşitliği denge sabiti K_a 'nın sıcaklıkla değişimini de açıklar:

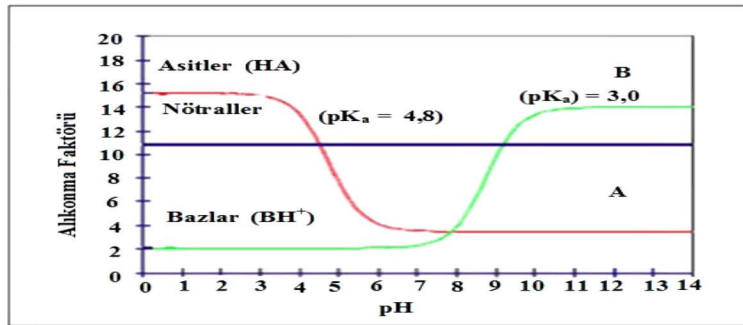
$$pK_a = \frac{\Delta H_a}{2,3 RT} - \frac{\Delta S_a}{2,3 R}$$

Kromatografik ayırmada mobil faz pH' sı, iyonlaşabilen bileşiklerin (organik asit, organik baz) ayrılmalarında önemli bir faktördür. Mobil fazın pH' sı, analitin iyonlaşması ve solvasyonu, analitlerin durgun fazla etkileşimini, durgun faz yapısı ve özelliklerini, bağlı fazın kararlılığını ve silika dolgunun çözünmesini etkiler. HPLC de mobil faz pH sı, özellikle iyonlaşabilen bileşiklerle çalışmada çok etkindir.

Bilindiği gibi zayıf asit ve zayıf bazların iyonlaşmaları aşağıdaki gibidir.



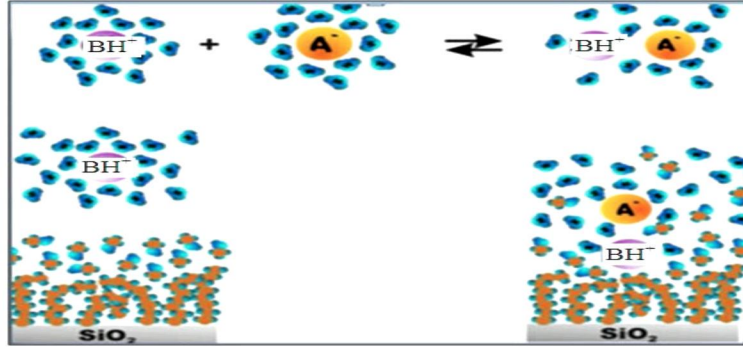
Zayıf asitte $pH > 4-5$ iken temel tür A^- , zayıf bazda $pH < 7-8$ iken temel tür BH^+ dir. İyonlaşmış türler, daha kısa sürede elüe olmaktadır (Şekil 1.18.).



Şekil 1.18. Asit, baz ve nötral bileşikler için alıkonma faktörüne karşı pH grafiği

Asidik bileşiklerle çalışılırken, pik şeklinin iyileştirilmesi amacıyla mobil faz modifiyerleri kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan mobil faz modifiyeri TFA ve asetik asittir. Düşük derişimlerde kullanılması TFA için tercih sebebi olmaktadır. Protonlanmış bazik bileşiklerin alıkonmasında ise inorganik mobil faz

modifiyerleri etkilidir. Analitin mobil fazdaki solvasyon-desolvasyon dengesinin değişmesi ile ilişkilendirilen bu durum kaotropik etki olarak adlandırılmaktadır. İyon durumundaki bazik bileşiklerin alıkonması, mobil faz pH sına vetampon derişimine bağlıdır. Şekil 1.19.' da tampon anyonunun, bazik bileşiğin alıkonmasındaki etkisi şema olarak verilmiştir [111].



Şekil 1.19. Hidrofobik yüzeyde protonlanmış bazın alıkonmasında kaotropik madde etkisi

1.5. Validasyon Parametreleri

1.5.1. Doğruluk

Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Seçilen her bir derişim için minimum 5 tayin yapılmalıdır. Bu tayinlerden minimum 3 tanesi ortalama değerin %15 inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki derişim için bu sapma % 20' yi geçmemelidir [112].

Gerı kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar:

i.Referans bir yöntemle karşılaştırmak:

Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, er lim alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (%BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir [113,114].

$$\%BSS = \frac{SS}{X_{ort}} \times 100$$

$$\%BH = \frac{GD - X_{ort}}{GD} \times 100$$

GD: Gerçek Değer

SS: Standart Sapma

X_{ort}: Ortalama Değer

ii. Kr matriks ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:

Farmasötik dozaj formları gibi matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrikse değişik derişimlerde eklenir. Boş matriks, ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur.

Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er lim yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

iii. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi:

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları, matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi, deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar, ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

1.5.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan her bir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Bunlardan en az 3 deney sonucunun % BSS' 1, teorik değerin % 15'inden daha fazla sapma göstermemelidir.

Kesinlik, tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) olmak üzere üç kısımda incelenmektedir.

1.5.2.1. Tekrarlanabilirlik

Kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır (30-40 ölçüm tercih edilmelidir). Bu tekrar

edilebilirlik, gün içi kesinlik olarak da adlandırılır. Kesinlik, elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 1,0$ olmalıdır [115].

1.5.2.2. Orta-Kesinlik

Orta kesinlik, laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Farklı günlerde, farklı analizciler veya farklı cihazlar kullanılarak belirlenen değerlerdir. Günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değer, çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Bu kesinliği sağlayan çalışma, diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla yapılır. Orta kesinlik, elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 2,0$ olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

1.5.2.3. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik, özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Özellikle yöntem standardizasyonu çalışmalarında kullanılan bir kesinlik değeridir. Geliştirilecek yöntem, farklı laboratuvarlarda aynı anda kullanılacaksa bu kesinliğin hesaplanması ve değerinin raporda belirtilmesi gerekir. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm yapılır. Deneyler en az bir kaç gün ara ile yapılmalıdır. Tekrar elde edilebilirlik, ölçülen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 2,0$ olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir [115].

1.5.3. Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin, numunede mevcut girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Özellikle kararlılık tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır [116].

Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır. Seçicilik, 2 yolla saptanır:

- i. Tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin girişim yapma oranına veya ayırma yöntemlerinde, “Ayırım gücü” (R_s) değerlerine bakılır. Bu değer ayırma yöntemleri için $R_s \geq 2,0$ olmalıdır.
- ii. Ayırma yöntemlerinde duyarlı bir detektör seçilebilir. İncelenecek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan detektörler, elektrokimyasal veya radyoaktivite detektörleridir. Bu detektörler belli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin girişim yapma ihtimalini yok ederler.

1.5.4. Teşhis Sınırı (LOD)

Analitin belirlenebildiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Teşhis Sınırı aşağıdaki gibi hesaplanır,

$$LOD= 3 \times SS / m$$

Bu eşitlikte SS, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

1.5.5. Tayin Alt Sınırı

Analizi yapılan maddenin miktarının kabul edilebilir düzeyde kesinlikte ve doğrulukta tayin edilebileceği kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır. Tayin Alt Sınırı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ= 10 \times SS / m$$

Burada SS, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. Bir yöntemde SS ve m değerleri, LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.

1.5.6. Doğrusallık

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon katsayısı (r), doğrusallığı veren parametredir. Doğrusallık, korelasyon katsayısı r, 0,999 ise sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltilerden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin % 50 sinden düşük ve üst sınır da % 150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması

gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesim değerlerinin %BSS' ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

1.5.6.1. Kalibrasyon Grafiği

Analitin bilinen derişimleri ile değişen değişkenin cevapları arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için cihazdan ölçülen değerler kullanılarak hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur.

1.5.6.2. Duyarlılık

Duyarlık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak da tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır.

1.5.6.3. Çalışma Aralığı

Yeterli doğruluk ve duyarlıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduktan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50' sinden düşük ve %150' sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın % 50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

1.5.6.4. Sağlamlık

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

1.5.6.5. Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışma, aynı laboratuarda farklı analizciler tarafından; aynı laboratuarda farklı cihazlar tarafından farklı laboratuarda gerçekleştirilmesi gerekir. Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir [117].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Materyal

2013 yılı Mayıs ayında Karadeniz bölgesinden (Prof. Dr. Atalay SÖKMEN gözetiminde) toplanan *Arctostaphylos uva-ursi* yaprakları karanlık odada, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kuru yapraklar 80-100 mesh boyutunda öğütülmüştür.

Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta ve analizlerde kullanılan kimyasallar HPLC saflığındadır. Analitik kalitedeki NaOH ve HCl Merck firmasından temin edilmiştir. Tampon çözeltilerin filtrasyonu için 0,45 µm boyutunda membran filtre (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan Arbutin in özellikleri aşağıda belirtilmiştir;

Çizelge 2.1. Kullanılan Arbutin standardının özellikleri

Marka	Sigma Aldrich
Yüzde Saflık	>98
Lot No	BCBH0889V
Molekül Kütlesi (gr/gr mol)	272, 25

2.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

Ultrasonik destekli ekstraksiyon Bandelin Sonerex marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Solüsyonların pH düzeyleri Mettler Toledo-Seven Easy pH metre ile kontrol edilmiştir. Erlenlerin içerisine öğütülmüş numuneden 200 mg tartılarak aktarılmıştır. Üzerine deney programında (Çizelge 2.3.) belirtilen miktarda ve yine belirtilen pH da çözücü ilave edilmiştir. Erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp lastikle sabitlenmiştir (Resim 2.1.). Ultrasonik banyonun sıcaklığı ve süresi ayarlanmıştır. Standart ultrasonik koşullar için erlenler

ultrasonik banyo içerisine yerleştirilmiştir. Banyodaki su ile erlen içerisindeki çözelti seviyesi aynı tutulmuş ve ultrasonik banyo çalıştırılmıştır.



Resim 2.1. Ultrasonik banyoya öncesi numune



Resim 2.2. Ultrasonik banyo sonrası ilk filtrasyon işlemi



Resim 2.3. 0,45 mikronluk membran ile vial filtrasyon işlemi (sağda)

Çözeltilerdeki pH 1 ve 13 seviyesini ayarlamak için Merck marka NaOH ve HCl kullanılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra kapilerin tıkanmasını önlemek amacıyla çözelti önce Whatman marka filtre kağıdı (Resim 2.2.) ile sonrasında 0,45 mikronluk membran filtre ile filtre edilmiştir (Resim 2.3.).

Çizelge 2.2. Bağımsız değişkenlerin değerleri ve sembolleri

Bağımsız değişkenler	Birimler	Değişkenlerin sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	+1
Çözücü/katı oranı	Mg/ml	X1	20	30	40
pH	pH	X2	1	7	13
Ekstraksiyon süresi	Dk	X3	30	60	90
Ekstraksiyon sıcaklığı	°C	X4	40	60	80

Çizelge 2.3. Deney Koşulları

Deney No	Çözücü Miktarı(ml) X1	pH X2	Süre (dk) X3	Sıcaklık (°C) X4
1	40,00	7,00	30,00	60,00
2	40,00	7,00	60,00	80,00
3	30,00	13,00	60,00	80,00
4	30,00	13,00	60,00	40,00
5	30,00	7,00	60,00	60,00
6	30,00	13,00	30,00	60,00
7	30,00	1,00	60,00	40,00
8	40,00	1,00	60,00	60,00
9	30,00	7,00	30,00	80,00
10	30,00	13,00	90,00	60,00
11	30,00	7,00	60,00	60,00
12	30,00	7,00	60,00	60,00
13	30,00	1,00	90,00	60,00
14	20,00	13,00	60,00	60,00
15	30,00	7,00	90,00	80,00
16	30,00	7,00	30,00	40,00
17	40,00	7,00	90,00	60,00
18	30,00	1,00	30,00	60,00
19	30,00	7,00	60,00	60,00
20	20,00	7,00	60,00	40,00
21	30,00	7,00	60,00	60,00
22	30,00	7,00	90,00	40,00
23	20,00	7,00	30,00	60,00
24	20,00	7,00	90,00	60,00
25	20,00	7,00	60,00	80,00
26	40,00	13,00	60,00	60,00
27	40,00	7,00	60,00	40,00
28	30,00	1,00	60,00	80,00
29	20,00	1,00	60,00	60,00

2.3. Kromatografik Koşullar (HPLC metodu)

Arbutinin tanımlanması ve kantitatif olarak miktarının belirlenmesi Agilent marka 1260 model kromatografik sistem ile yapılmıştır. HPLC sistemi autosampler quaternary pompa, kolon kompartımanı ve multiwavelength dedektör içermektedir. Miktar analizleri ACE 5 C-18, Bach:V12-711, Boyutlar: 250x4,6 mm, Parça No: ACE-121-2546, Seri No: A116709 kolon ile yapıldı. Mobil faz olarak Metanol,

Deiyonize Su (10:90 V/V) kullanılmıştır. Analiz süresi 10 dakika, kolon sıcaklığı 30 °C ve dedeksiyon 280 nm dir [118].

Çizelge 2.4. HPLC Metotu

Kolon	ACE 5 C-18, Bach:V12-711, Boyutlar: 250x4,6 mm, Parça No: ACE-121-2546, Seri No: A116709
Mobil Faz	Metanol, Deiyonize Su (10:90 V/V)
Enjeksiyon Hacmi	20 mL
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Dedeksiyon	280 nm
Akış Hızı	1.2 ml/dk.
Analiz Süresi	10 dakika

2.3.1. HPLC Analiz Metodunun Validasyon Çalışmaları

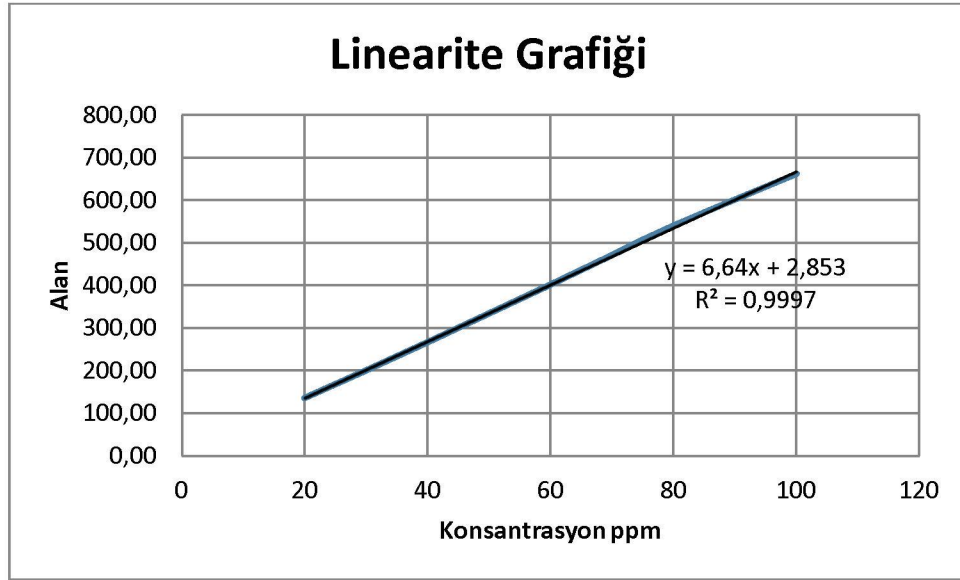
Analiz metodunun validasyon çalışmaları kapsamında SigmaAldrich firmasından temin edilen toz formundaki arbutin standardı kullanılarak 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm ve 100 ppm lik standart solüsyonlar hazırlanmıştır. Bu standart solüsyonlar her biri beşer kez ardışık 3 gün boyunca HPLC cihazına enjeksiyonu yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarından yararlanılarak gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, kalibrasyon doğrusallığı ve tekrarlanabilirlik testleri yapıp, konsantrasyon aralığı, korelasyon katsayısı, kayma, eğim, teşhis limiti değeri (LOD), tayin limiti değeri (LOQ) ve alıkonma zamanı tespit edilmiştir.

Çizelge 2.5. Analitik metodun validasyonu süresince farklı parametrelerin testinden elde edilen sonuçlar

Parametreler	Arbutin	
Doğrusallık	Konsantrasyon Aralığı ppm	20-100
	Korelasyon Katsayısı	0,9997
	Kayma	2,853
	Eğim	6,64
LOD ppm	0,261	
LOQ ppm	0,869	
Alıkonma Zamanı dk	3,710	

2.3.1.2. Analitik Metodun Doğrusallığı

5 farklı konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusallığı elde edilmiştir.

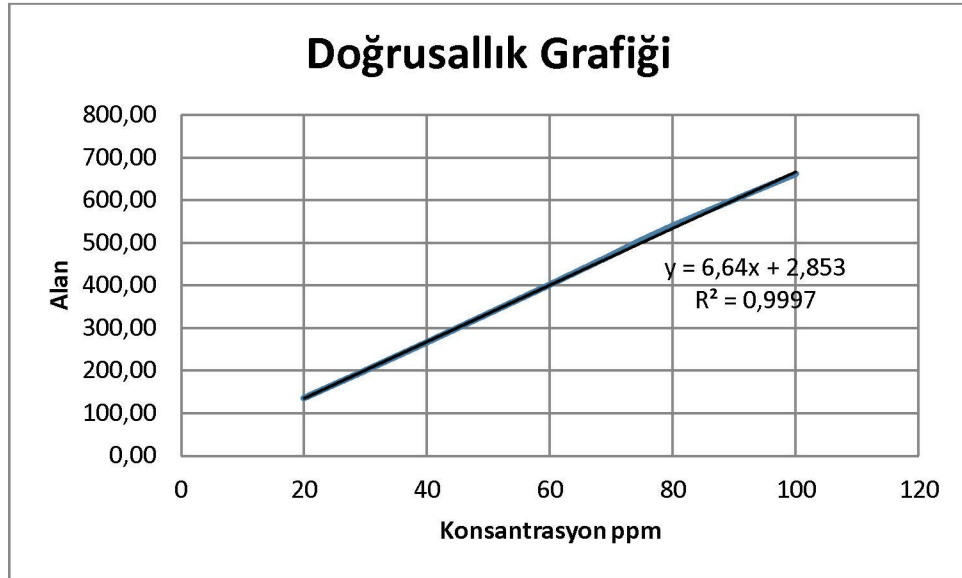


Şekil 2.1. Standartların doğrusallığı

Cihazın kalibrasyonu için 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm lik standart solüsyonlarından 3 gün ardı ardına beşer enjeksiyon yapılmıştır. Bu enjeksiyonlardan elde edilen kromatogramlar ve pik alanları aşağıdaki gibidir.

Çizelge 2.6. 1.gün kalibrasyon tablosu

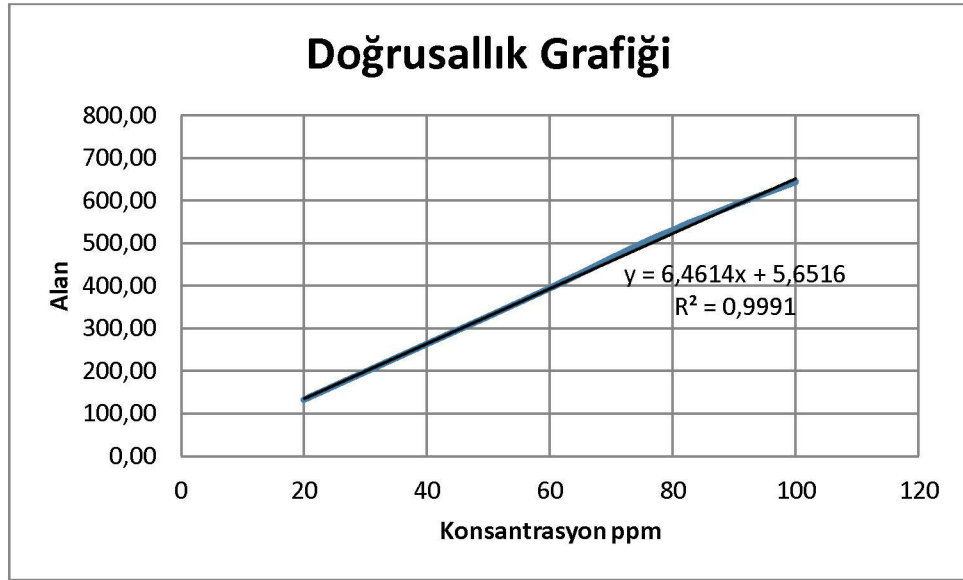
Konsantrasyon ppm	20	40	60	80	100
1. Enjeksiyon	135,40	267,36	400,64	539,60	663,08
2. Enjeksiyon	134,88	266,42	402,08	539,71	662,05
3. Enjeksiyon	134,97	266,90	402,00	540,25	663,85
4. Enjeksiyon	135,17	266,35	401,35	541,12	662,24
5. Enjeksiyon	135,70	267,30	401,45	539,36	662,02
Ortalama	135,22	266,87	401,50	540,01	662,65
Standart Sapma	0,3329	0,4740	0,5811	0,7018	0,7984



Şekil 2.2. 1. Gün Kalibrasyon doğrusallığı

Çizelge 2.7. 2.gün kalibrasyon tablosu

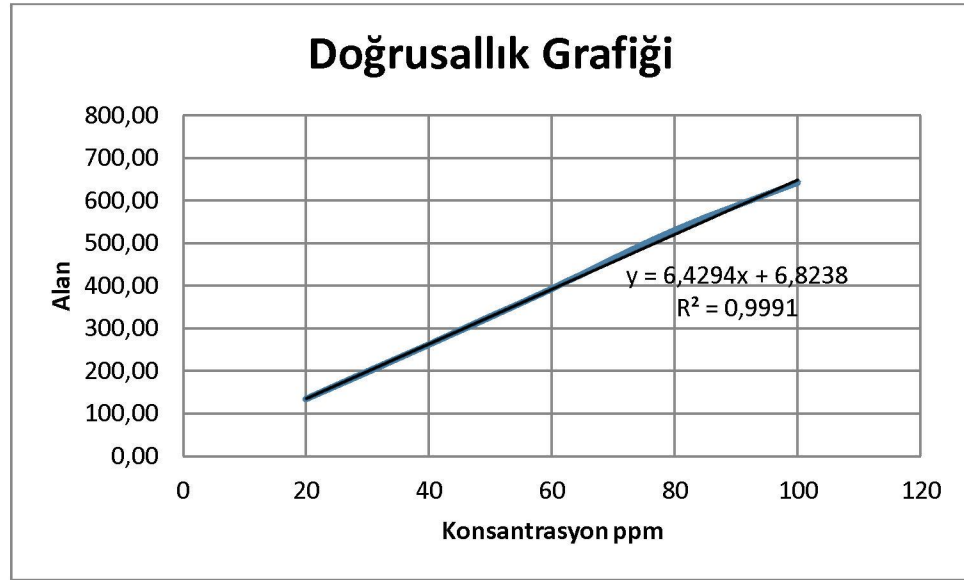
Konsantrasyon ppm	20	40	60	80	100
Enjeksiyon	133,04	263,17	394,76	531,71	644,76
Enjeksiyon	131,91	263,55	393,91	532,55	643,86
Enjeksiyon	131,68	263,75	395,97	531,25	644,57
Enjeksiyon	132,17	262,90	394,30	532,12	643,80
Enjeksiyon	132,43	264,65	394,73	531,35	644,44
Ortalama	132,25	263,60	394,73	531,80	644,29
Standart Sapma	0,5252	0,6713	0,7739	0,5427	0,4321



Şekil 2.3. 2. Gün Kalibrasyon doğrusallığı

Çizelge 2.8. 3. gün kalibrasyon tablosu

Konsantrasyon ppm	20	40	60	80	100
Enjeksiyon	133,85	262,20	392,69	530,29	642,83
Enjeksiyon	134,95	262,40	392,67	530,70	643,70
Enjeksiyon	132,82	263,75	393,60	530,86	643,43
Enjeksiyon	133,73	262,54	393,64	530,80	641,66
Enjeksiyon	133,43	262,08	393,91	530,35	641,86
Ortalama	133,76	262,59	393,30	530,60	642,70
Standart Sapma	0,7774	0,6701	0,5802	0,2628	0,9134



Şekil 2.4. 3. Gün kalibrasyon grafiği

2.3.1.3. Teşhis Limiti Değeri (LOD) ve Tayin Limiti Değeri (LOQ) Belirlenmesi

$$y = 6,64 x + 2,853 \quad R^2 = 0,999 \quad SS = 0,577$$

i. Dedeksiyon Limitinin (LOD) Hesaplanması:

$$LOD = 3,3 \times SS/m$$

$$LOD = 0,287$$

ii. Tayin Limitinin (LOQ) Hesaplanması:

$$LOQ = 10 \times SS/m$$

$$LOQ = 0,868$$

2.3.1.4. Tekrarlanabilirlik Testleri

Çizelge 2.9. Gün içi günler arası pik alanı değerleri

	ENJEKSİYON	20 PPM	40 PPM	60 PPM	80 PPM	100 PPM
1. GÜN	1	135,40	267,36	400,64	539,60	663,08
	2	134,88	266,42	402,08	539,71	662,05
	3	134,97	266,90	402,00	540,25	663,85
	4	135,17	266,35	401,35	541,12	662,24
	5	135,70	267,30	401,45	539,36	662,02
	ORTALAMA	135,22	266,87	401,50	540,01	662,65
	SD	0,3329	0,4740	0,5811	0,7018	0,7984
	% RSD	0,2462	0,1776	0,1447	0,1300	0,1205

2. GÜN	ENJEKSİYON	20 PPM	40 PPM	60 PPM	80 PPM	100 PPM
	1	133,04	263,17	394,76	531,71	644,76
	2	131,91	263,55	393,91	532,55	643,86
	3	131,68	263,75	395,97	531,25	644,57
	4	132,17	262,90	394,30	532,12	643,80
	5	132,43	264,65	394,73	531,35	644,44
	ORTALAMA	132,25	263,60	394,73	531,80	644,29
	SD	0,5252	0,6713	0,7739	0,5427	0,4321
	%RSD	0,3971	0,2546	0,1961	0,1020	0,0671

3. GÜN	ENJEKSİYON	20 PPM	40 PPM	60 PPM	80 PPM	100 PPM
	1	133,85	262,20	392,69	530,29	642,83
	2	134,95	262,40	392,67	530,70	643,70
	3	132,82	263,75	393,60	530,86	643,43
	4	133,73	262,54	393,64	530,80	641,66
	5	133,43	262,08	393,91	530,35	641,86
	ORTALAMA	133,76	262,59	393,30	530,60	642,70
	SD	0,7774	0,6701	0,5802	0,2628	0,9134
	%RSD	0,5812	0,2552	0,1475	0,0495	0,1421

Çizelge 2.10. Pik Alanına Dayalı Tekrarlanabilirlik

PİK ALANINA DAYALI TEKRARLANABİLİRLİK					
	20 PPM	40 PPM	60 PPM	80 PPM	100 PPM
1. GÜN	0,2462	0,1776	0,1447	0,13	0,1205
2. GÜN	0,3971	0,2546	0,1961	0,102	0,0671
3. GÜN	0,5812	0,2552	0,1475	0,0495	0,1421

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

3. SONUÇLAR

3.1. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Proses

Değişkenlerinin Etkisi

Design Expert 8.0.7.1 ile tasarlanmış Box-Behnken tasarım çalışmalarının deneysel koşulları aşağıdaki tabloda sunulmuştur. Tablo ayrıca ultrasonik destekli ekstraksiyondan elde edilen ekstraksiyon verimliliği üzerine sıcaklık, zaman, çözücü/katı oranı ve pH'ın etkilerini göstermektedir.

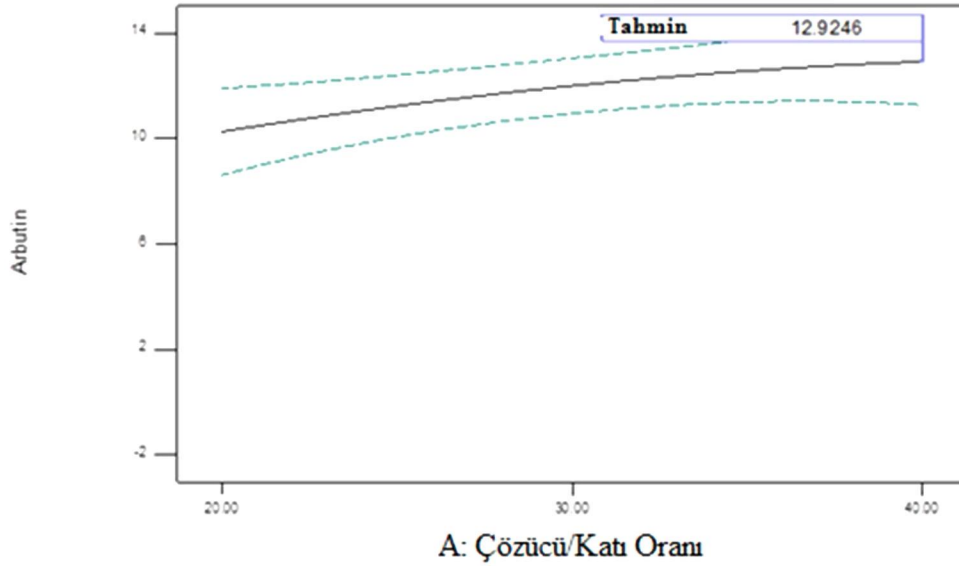
Çizelge 3.1. Ekstraksiyon verimi için deneysel sonuçlar ve bağımsız değişkenlerin (X1, X2, X3, X4) Box-Behnken tasarımı

Deney No	Çözücü Miktarı(ml)	pH	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Verim (mg Arbutin/ 200 mg numune)
1	40,00	7,00	30,00	60,00	11,16
2	40,00	7,00	60,00	80,00	13,52
3	30,00	13,00	60,00	80,00	0,00
4	30,00	13,00	60,00	40,00	0,00
5	30,00	7,00	60,00	60,00	11,85
6	30,00	13,00	30,00	60,00	0,00
7	30,00	1,00	60,00	40,00	0,00
8	40,00	1,00	60,00	60,00	0,00
9	30,00	7,00	30,00	80,00	12,07
10	30,00	13,00	90,00	60,00	0,00
11	30,00	7,00	60,00	60,00	10,82
12	30,00	7,00	60,00	60,00	10,68
13	30,00	1,00	90,00	60,00	0,00
14	20,00	13,00	60,00	60,00	0,00
15	30,00	7,00	90,00	80,00	12,33
16	30,00	7,00	30,00	40,00	7,95
17	40,00	7,00	90,00	60,00	10,43
18	30,00	1,00	30,00	60,00	0,00
19	30,00	7,00	60,00	60,00	11,46
20	20,00	7,00	60,00	40,00	9,26
21	30,00	7,00	60,00	60,00	12,18
22	30,00	7,00	90,00	40,00	8,32
23	20,00	7,00	30,00	60,00	9,84
24	20,00	7,00	90,00	60,00	10,90
25	20,00	7,00	60,00	80,00	11,06
26	40,00	13,00	60,00	60,00	0,00
27	40,00	7,00	60,00	40,00	7,66
28	30,00	1,00	60,00	80,00	0,00
29	20,00	1,00	60,00	60,00	0,00

*Veriler 3 enjeksiyonun ortalaması olarak verilmiştir.

3.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Çözücü/katı oranının etkisi

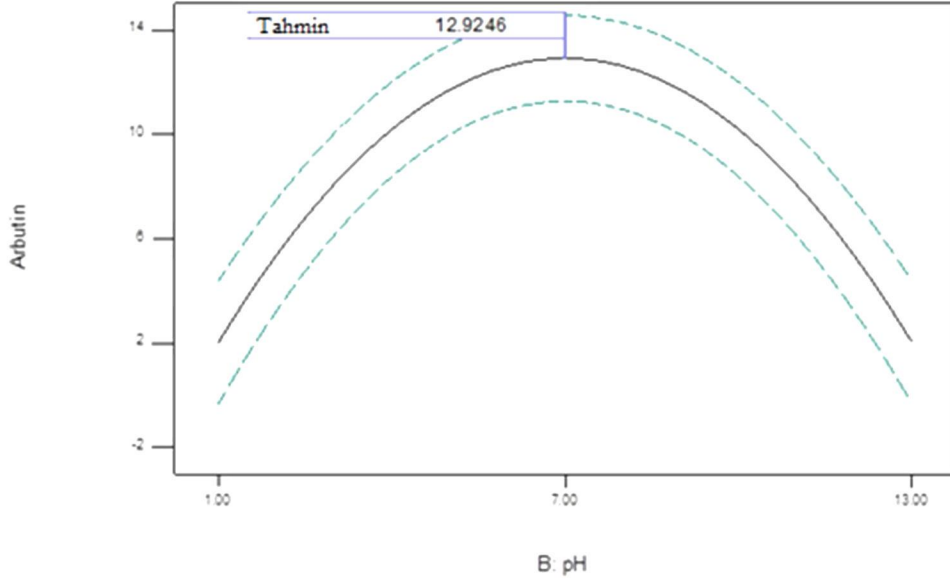
Çözücü/katı oranı önemli bir faktördür ve ekstraksiyon verimliliğini optimize etmek için kullanılmıştır. Büyük çözücü hacimleri metodu zorlaştırır ve gereksiz atıklara sebep olurken, küçük çözücü hacimleri ise tamamlanmamış ekstraksiyona sebep olur. Çözücü/katı oranının etkisini değerlendirmek için farklı çözücü/katı oranlarında (20/200, 30/200, 40/200) bir seri deney yapılmıştır. Şekil 3.1. çözücü hacminin artmasıyla ekstraksiyon veriminin arttığını göstermektedir. Yüksek difüzyona sebep olan yüksek çözücü/katı oranı kullanıldığı zaman yürütücü güç olan konsantrasyon gradyentinin daha yüksek olacağı varsayıldığı için, çözücü miktarının artışıyla verimin artışı kütle transfer prensipleriyle uygundur.



Şekil 3.1. Arbutin veriminin çözücü/katı oranıyla değişimi

3.3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Çözücü pH ın etkisi

Arbutinin ekstraksiyon verimi üzerine çözücü pH ın etkisi 1-13 aralığında test edildi ve sonuçlar Çizelge 3.1. de gösterilmiştir. Açıkça görülmektedir ki ekstraksiyon verimi pH 7 de maksimumdur. pH 1 ve 13 de HPLC analizlerinde ekstraktlar içerisinde arbutin gözlenmemiştir. Bu durum pH 1 ve pH 13 gibi yüksek asidik ve yüksek alkali ortamlarında arbutinin parçalandığını göstermektedir.

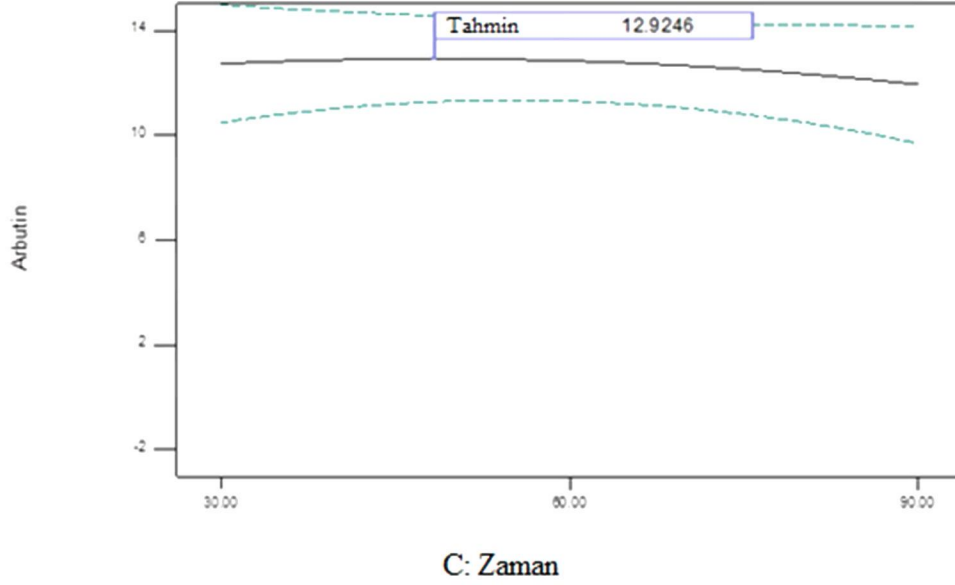


Şekil 3. 2. Arbutin veriminin pH ile değişimi

3.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Zamanının Etkisi

Arbutinin ekstraksiyon verimi üzerine ultrason zamanının etkisi 30-90 dakika aralığında test edildi. Ve sonuçlar Çizelge 3.1. de verilmiştir. Sonuçlar gösteriyor ki ekstraksiyon zamanıyla arbutin verimi çok fazla değişmemektedir. Arbutinin

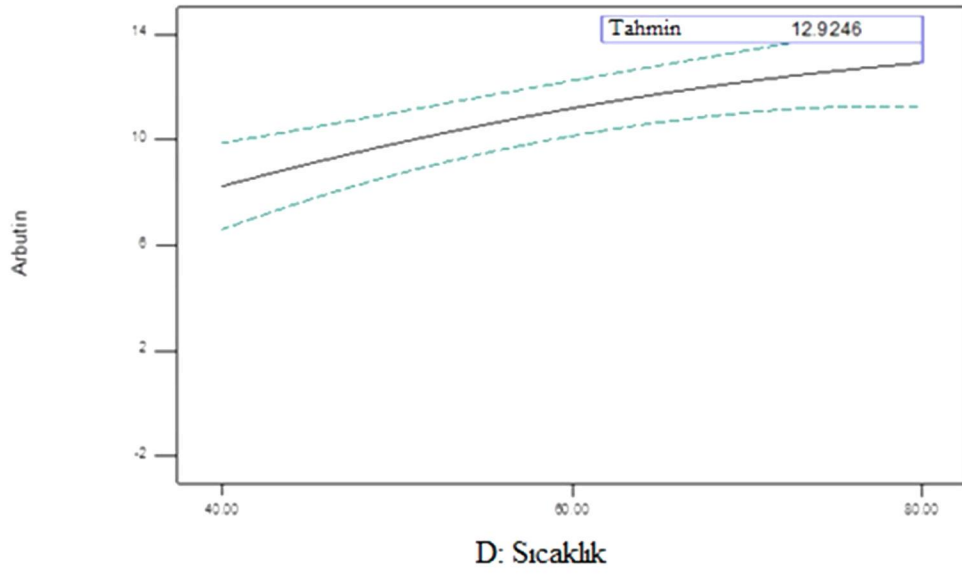
çözücüde salınması ve hücre duvarlarının zarar görmesi için 30 dakika ultrason süresi yeterli olmaktadır.



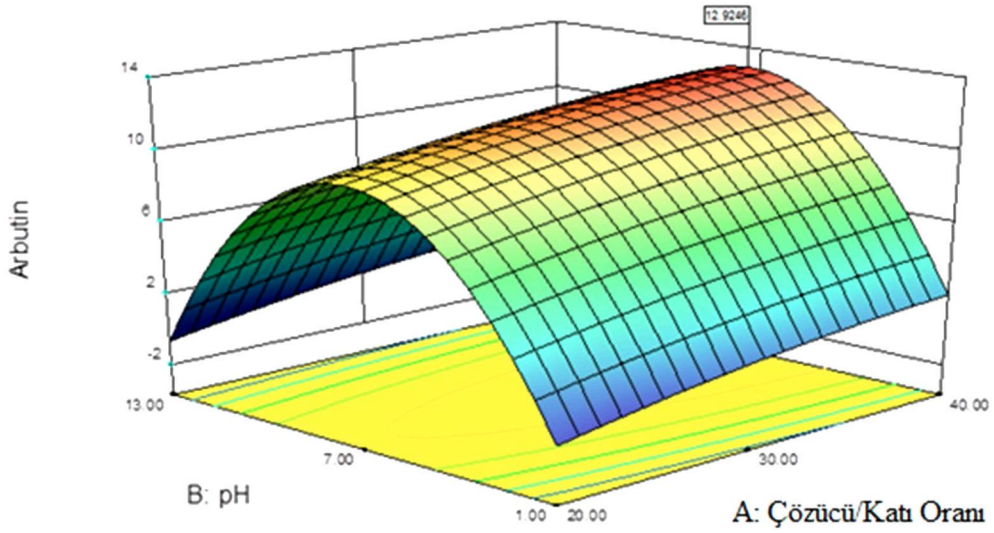
Şekil 3.3. Arbutin veriminin ekstraksiyon zamanıyla değişimi

3.5. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Performansı Üzerine Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi

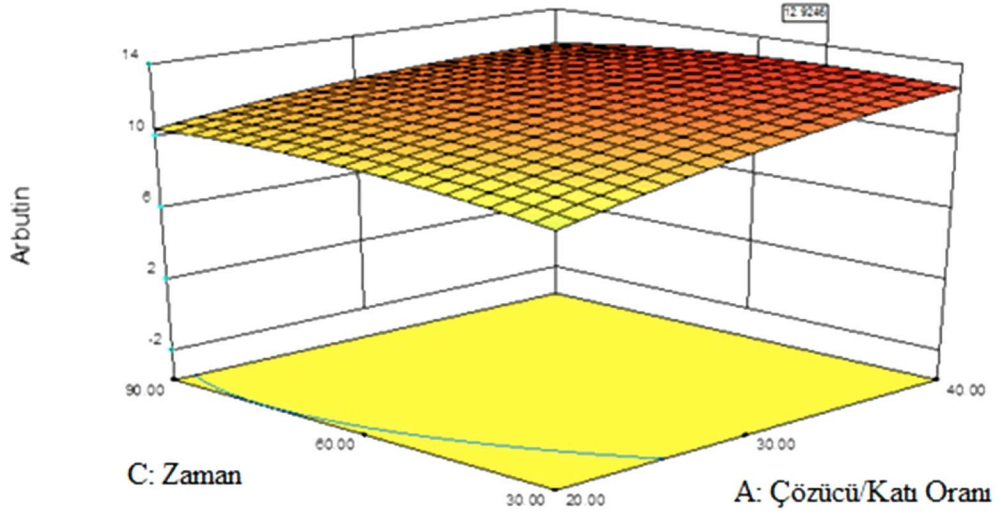
Daha yüksek sıcaklıklarda çalışmak pratik ve ekonomik olmadığı için ayı üzümü yapraklarının ekstraksiyonu 40-80 °C aralığında değişen sıcaklıklarda yapılmıştır. Beklenildiği gibi arbutinin ekstraksiyon verimi sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kararlı bir şekilde arttığı gözlemlenmektedir. Kütle transferi sıcaklıkla artar tezini doğrulamıştır. Genelde yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyonlar kütle transferini ve ekstraksiyon performansını artırır.



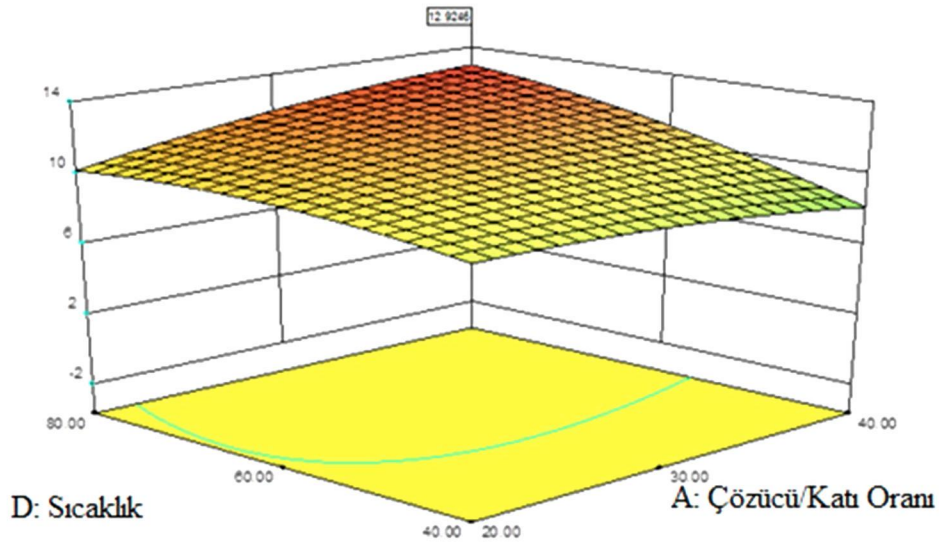
Şekil 3.4. Arbutin veriminin sıcaklıkla değişimi



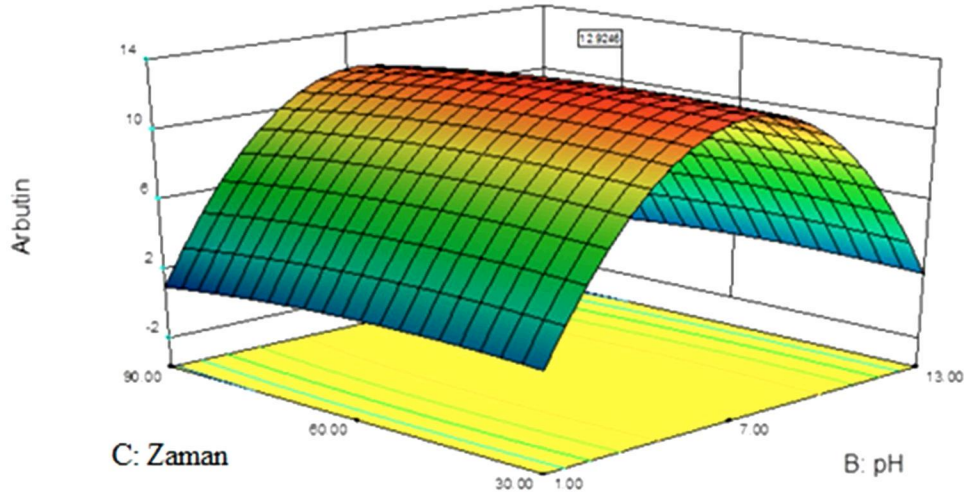
Şekil 3.5. Çözücü pH ına çözücü/katı oranının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği



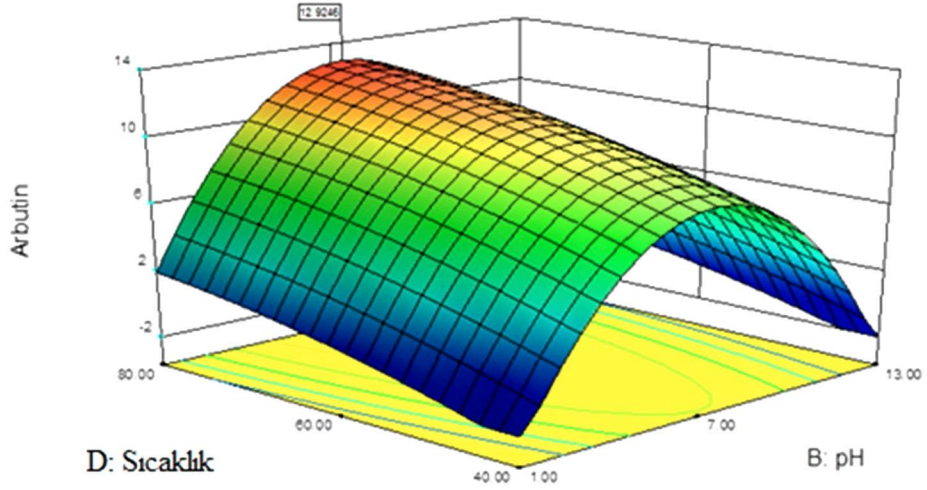
Şekil 3.6. Ekstraksiyon zamanına çözücü/katı oranının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği



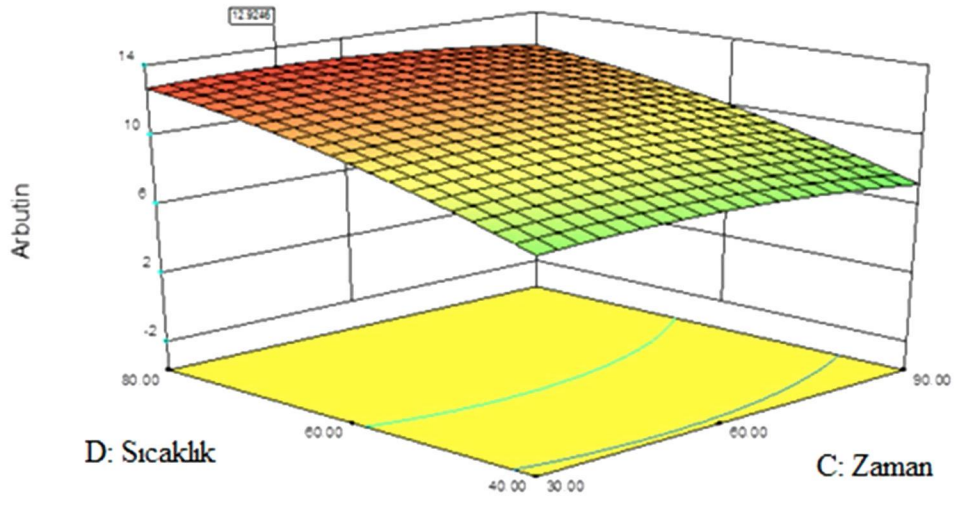
Şekil 3.7. Ekstraksiyon sıcaklığına çözücü/katı oranının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği



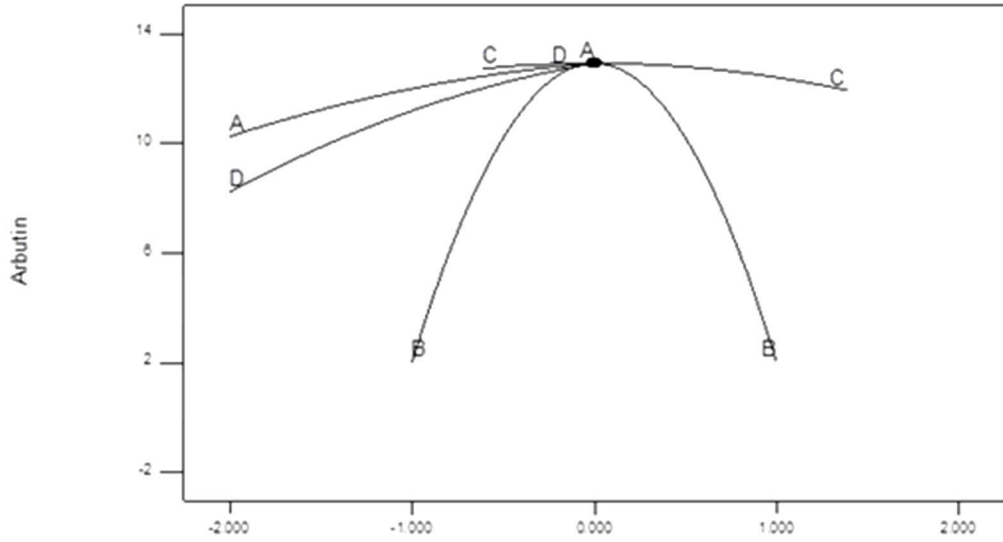
Şekil 3.8. Ekstraksiyon zamanına çözücü pH sının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 3.9. Ekstraksiyon sıcaklığına çözücü pH sının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 3.10. Ekstraksiyon sıcaklığına ekstraksiyon zamanının bir fonksiyonu olarak ayı üzümü yapraklarının verimi için yüzey yanıt grafiği



Şekil 3.11. Arbutin veriminin tüm değişkenler ile değişimi grafiği (A: Çözücü/katı oranı B: pH C: zaman D: sıcaklık)

3.6. Yüzey Yanıt Metoduyla Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu

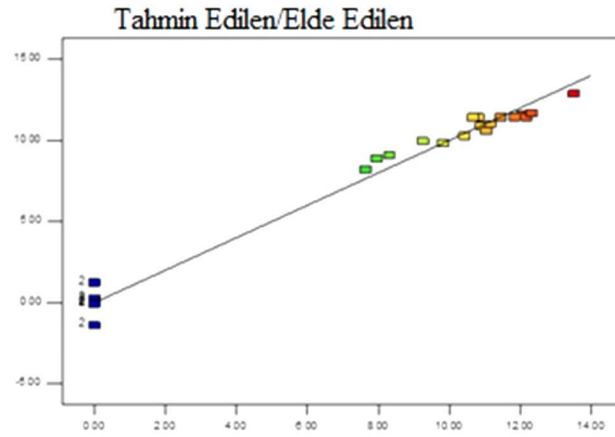
Aynı anda tek faktör yaklaşımı olarak bilinen proses değişkenlerinin bireysel etkileri önceki bölümde belirtilmiştir. Bu klasik yaklaşım proses değişkenlerinin birbiriyle olan muhtemel etkileşimlerini göz ardı eder. Yüzey yanıt metodolojisi işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur. Çizelge 3.1. minimum, orta, maksimum noktaları içeren dört parametreyi (pH, çözücü/katı oranı ve sıcaklık) göstermektedir. 29 deney çalışılmıştır, bu 29 deney dizayn expert software tarafından rastgele seçilmiş ve yanıtlar kaydedilmiştir (Çizelge 3.1.). Yazılım nedeniyle yüzey yanıt metodolojisi kullanan, ekstraksiyon verimleri için sadece adım adım ileri değil aynı zamanda geri yok etme regresyonlarını uygulayan kuadratik bir model elde edilmiştir. Yazılımdan yüzey yanıt metodu kullanan kuadratik bir model aşağıda verildiği gibi türetilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Arbutin} = & -12,92274 + 0,04390 X_1 + 4,23364X_2 + 0,11837 X_3 + 0,10087 X_4 + \\ & 8,14164 \cdot 10^{-17} X_1X_2 - 1,49167 \cdot 10^{-3}X_1X_3 + 5,07500 \cdot 10^{-3}X_1X_4 - 3,94746 \cdot 10^{-17} X_2X_3 - \\ & 1,55431 \cdot 10^{-16} X_2X_4 - 4,58333 \cdot 10^{-5} X_3X_4 - 4,07750 \cdot 10^{-3}X_1^2 - 0,30240 X_2^2 - 5,68333 \\ & 10^{-4} X_3^2 - 1,53812 \cdot 10^{-3} X_4^2 \end{aligned} \quad (3.1.)$$

Çizelge 3.2. de X_4 , X_1X_4 , X_2^2 uygun model terimleridir. Çünkü bu terimlerin $\text{prob}>f$ değerleri 0.100 den küçüktür. Ancak $\text{prob}>f$ değerleri 0.100 den büyük olanlar uygun olmayan model terimleridir. Uygun olmayan model terimlerinin regresyon katsayıları hariç tutulduktan sonra yeni model yeni koşulu daha iyi açıklamak için aşağıdaki şekilde verilebilir.

$$\text{Arbutin} = -12,92274 + 0,10087 X_4 + 5,07500 \cdot 10^{-3}X_1X_4 - 0,30240 X_2^2 \quad (3.2.)$$

Bu denklemden hesaplanan arbutinin teorik değerleri deneysel olarak elde edilen sonuçlara karşı grafiğe geçirildi. Bu ilişki aşağıdaki grafikte verilmiştir.



Şekil 3.12. Denklemden elde edilen değerler ile deneysel verilerin karşılaştırılması

Optimum ekstraksiyon koşulları dizayn expert software optimizasyonu kullanarak bulunmuştur. Bu değerler pH:7, çözücü/katı oranı: 40, zaman: 48,41 dakika, sıcaklık: 80 °C olarak belirlenmiştir. Bu işletme koşullarında maksimum yanıt 12,9246 mg arbutin/200 mg numune olarak belirlenmiştir.

Optimal koşullar bulunduktan sonra gerçek numune ekstraksiyonu deneyleri 6 kez tekrarlanmış ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplanmıştır.

Ortalama: 12,8553

Standart Sapma: 0,015

Relatif Standart Sapma: 0,425

Arbutin Verim (mg/200 mg numune): 12,8553±0,015

İstatistiksel değerlendirme için sonuçların uygun olduğu belirlenmiştir.

3.7. Model Uygunluğu

Ekstraksiyon verimlerinin yanıtları için dizayn expert 8.0.7.1 in kuadratik denklemleri için varyans (ANOVA) analizleri Çizelge 3.2. de verilmiştir.

Değişkenlerin en uygununu elde etmek için stepwise (adım adım) regresyonu kullanılmıştır. Bu prosese göre adı geçen değişkenler test edilmiştir. İleri ve geri teknikler kullanan verilen alfa düzeyleri (0,1) içerisinde değerlendirilmiştir. Geri teknikler parametreleri tahmin etmek için tüm değişkenleri içermektedir. Daha sonra alfa düzeyde uygun olmayan parametrelili her bir değişken denklemden atılmış bu proses önemli değişken kalmayınca kadar devam etmiştir. Geri tekniklere benzer şekilde ileri teknikler de verilen alfa düzeyleri içerisinde verilen değişkenleri değerlendirmekte kullanılmıştır. Geri tekniklerden farklı olarak ileri teknikler, denklemden bulunmayan hiçbir değişken ile başlamaz. Standardize betanın en yüksek değerlerine sahip önemli değişkenler ($p < 0,05$) denkleme katılacaktır.

Çalışmamızda, türetilen model ekstraksiyon verimleri için R-Kare (0,9853); Sıfatsal R-Kare (0,9705) ve Yüklemsel R-Kare (0,9235) değerleri elde edilmiş ve bu değerler türetilen modelin hassasiyetini göstermektedir. Sonuçta, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile ayı üzümü yapraklarından ekstraksiyon veriminin belirlenmesi yüzey yanıt modellemesi ile başarılabilir. Ayrıca varyasyon katsayısı değeri (C.V. %) 15,06 olarak bulunmuştur. Bu düşük varyasyon değeri deneysel sonuçların güvenilirliği ve yüksek hassasiyetini gösterilmektedir.

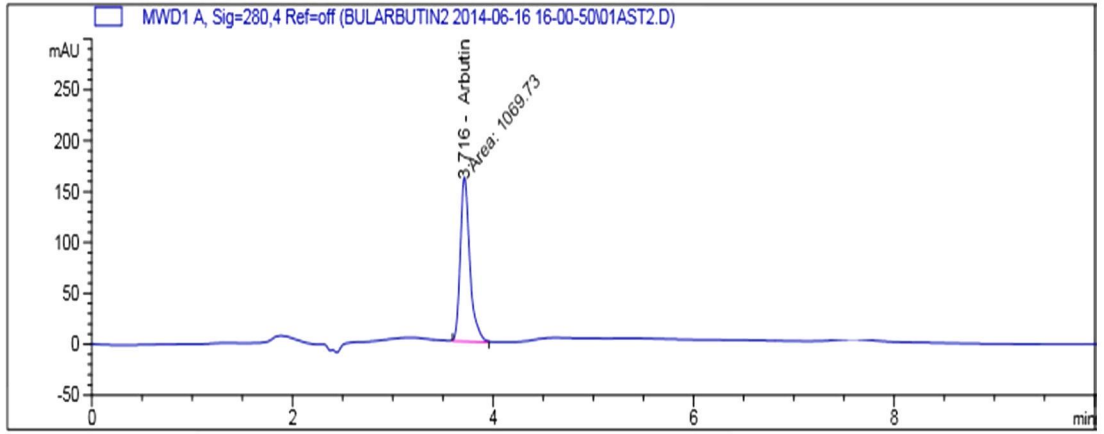
Çizelge 3.2. ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri Olasılık>f
Model	831,64	14	59,40	66,91	< 0,0001
X1-Slv./Slk.	0,24	1	0,24	0,27	0,6085
X2-pH	0,000	1	0,000	0,000	1,0000
X3-Zaman	0,077	1	0,077	0,087	0,7730
X4-Sıcaklık	20,78	1	20,78	23,40	0,0003
X1 X2	0,000	1	0,000	0,000	1,0000
X1 X3	0,80	1	0,80	0,90	0,3583
X1 X4	4,12	1	4,12	4,64	0,0491
X2 X3	0,000	1	0,000	0,000	1,0000
X2 X4	0,000	1	0,000	0,000	1,0000
X3 X4	3,025 10 ⁻³	1	3,025 10 ⁻³	3,407 10 ⁻³	0,9543
X1 ²	1,08	1	1,08	1,21	0,2890
X2 ²	768,75	1	768,75	865,91	< 0,0001
X3 ²	1,70	1	1,70	1,91	0,1884
X4 ²	2,46	1	2,46	2,77	0,1185
Artık Değer	12,43	14	0,89	-	-
Uyum Eksikliği	10,76	10	1,08	2,58	0,1873
Hata	1,67	4	0,42	-	-
Düz. Toplam	844,07	28	-	-	-

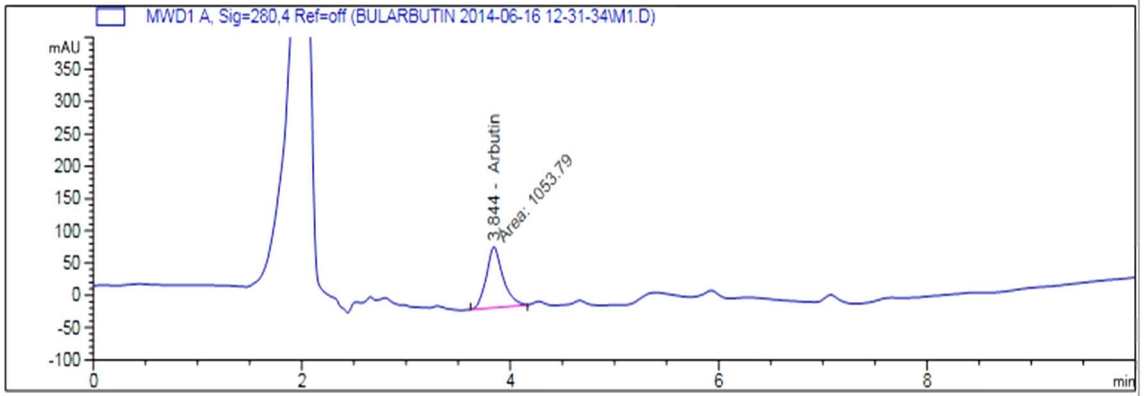
*Düz. Toplam: Düzeltilmiş ortalamaların toplamı

*df: Serbestlik derecesi

Sonuç olarak yüzey yanıt modellemesi ultrasonik destekli ekstraksiyon ile ayı üzümü yapraklarından ekstraksiyon veriminin belirlenmesinde başarılı bir şekilde uygulanabilir. Varyasyon katsayısının düşük değeri yüksek hassasiyeti ve deney sonuçlarının güvenilirliğini göstermektedir. Çalışmamızda % C.V. değeri 15,06 bulundu. Şekil 3.12. ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimi ile ilgili eşitlik 3.2. den hesaplanan veri ve deneysel veri arasındaki ilişkiyi göstermektedir. İşletme koşullarında deneysel veri ile modelden hesaplanan verinin uyum içinde olduğu görülmektedir. Şekil 3.13. arbutin standart solüsyonunun kromatogramını göstermektedir. Şekil 3.14. de ayı üzümü yapraklarının kromatogramlarını göstermektedir.



Şekil 3.13. Arbutin standardının kromatogramı



Şekil 3.14. Ayı üzümü yapraklarının ekstraktının kromatogramı

4. TARTIŞMA

Arbutinin potansiyel kaynağı ayı üzümü yaprakları bu çalışmada araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Kurutulmuş yapraklar ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi çevre dostudur ve geleneksel ekstraksiyon metotlarına göre daha az zaman gerektirdiği için ve daha az çözücü tüketimi olduğu için alternatiftir. Çalışmamızın sonuçları önermektedir ki pH: 7, çözücü/katı oranı: 40 ml / 200 mg numune, ekstraksiyon zamanı: 48,41 dakika ekstraksiyon sıcaklığı: 80 °C en iyi ekstraksiyon verimi için işletme koşulları olarak belirlenmiştir. Bu işletme koşullarında ekstraksiyon verimi 12,9246 mg arbutin/200 mg numune elde edilmiştir. Optimal koşullar bulunduktan sonra gerçek numune ekstraksiyon deneyleri 6 kez tekrarlanmış ve sonra relatif standart sapmalı ortalama hesaplanmıştır. Arbutin verimi (mg arbutin/200mg numune): $12,8553 \pm 0,015$. Sonuçlar istatistiksel değerlendirme için uygun olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. İnternet: Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi, 2009, <http://sifalibitkiler.rejimdiyet.com/faydalarina-gore/bobrege-faydalilar/ayi-uzumuvaccinium-arctostaphylos-nelere-iyi-gelir-nelere-faydalidir.htm>
2. Galletta, G.J., 1975, "Blueberries and Cranberries", Editörler: J. Janick and J.N. Moore, *Purdue Univ. Press*, West Lafayette, 154-196.
3. Karaer, F. ve Adak, Y., 2006. Türkiye Florasında Üzümsü Meyve Olarak Kullanılan Taksonların Yayılış Alanları ve Ekolojik Özellikleri, *II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, Tokat, 141-144.
4. Altun, L., 2006. Çaykara Yöresinde Doğal Olarak Yetişen Trabzon Çayı'nın (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Bazı Ekolojik Özellikleri.
5. Çelik, H., 2006. Karadeniz Bölgesindeki Asitli Topraklar İçin Mükemmel Bir Meyve, Likapa (Yaban Mersini), *Of Ziraat Odası Yayın Organı*, Çiftçi Dünyası, 3-7.
6. Karikas GA, Euerby MR, Waigh RD, 1987, Isolation of piceoside from *Arctostaphylos uva-ursi*, *Planta Med*, 53: 307-308.
7. Jahodar L, Leifertova I, Lisa M, 1985, Elimination of arbutin from the organism, *Folia Pharm*, 8: 7-15.
8. O'Donoghue JL, 2006, "Hydroquinone and its Analogues in Dermatology - A Risk Benefit Viewpoint", *J Cos Derm*, 196-203.
9. Jahodar L, Sovova M, Klemnera P, 1986, The effect of ionising irradiation on the growth of *Arctostaphylos uva-ursi* and the production of arbutin. *Folia Pharm*, 69-76.
10. Kenndler F, Schewer Ch, Fritsche B, Pöhm M, 1990, Determination of arbutin in *Uvea-ursi Folium* (bearberry) by capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr*, 383-388.
11. Assaf MH, Ali AA, Makboul MA, Beck JP, Anton R, 1987, Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*, quantitative estimation of arbutin, cytotoxic activity of hydroquinone, *Planta Med*, 343-345.
12. Lutterbach R, Stockigt J, 1992, High-Yield formation of arbutin from hydroquinone by cell-suspension cultures of *rauwolfia serpentina*, *Helv Chim Acta*, 2009-2011.

13. Lutterbach R, Stockigt J, 1993, *p*-Hydroxyphenyl-*O*- β -D-primeveroside, a novel glycoside formed from hydroquinone by cell suspension cultures of *rauwolfia serpentina*, *J Nat Prod*, 1421-1422.
14. Keller H, Hohlfeld H, Wray V, Hahlbrock K, Scheel D, Strack D, 1996, Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*, *Phytochemistry*, 389-396.
15. 2006, Chemical Information Review Document for Arbutin and Extracts from *Arctostaphylos uva-ursi*, [National Toxicology Program](#).
16. Halder RM, Richards GM, 2004, Topical Agents Used in the Management of Hyperpigmentation, *Skin Therapy Lett.*, 1-3.
17. Tokiwa Y, Kitagawa M, Raku T, 2007, Enzymatic Synthesis of Arbutin Undecylenic Acid Ester and its Inhibitory Effect on Melanin Synthesis, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 3105-3108.
18. Draelos ZD, 2007, Skin Lightening Preparations and the Hydroquinone Controversy, *Dermatol Ther*, 308-13.
19. Ertam I, Mutlu B, Unal I, 2008, Efficiency of Ellagic Acid and Arbutin in Melasma, A Randomized, Prospective, Open-Label Study, *J Dermatol*, 570-4.
20. Eskilsson, C.S., Bjorklund, E, 2000, Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 227.
21. Luque-Garcia, J.L., de Castro, M.D.L., 2004, Focused microwave-assisted Soxhlet extraction, *devices and applications.*, *Talanta*, 571.
22. de Castro, M.D.L., Priego-Capote, F., 2010, Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383.
23. de Castro, M.D.L., Garcia-Ayuso, L.E., 1998, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369.
24. Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., Garbacik-Wesolowska, A., Szefer, P., 2004, Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/ Oder river estuary, *Baltic Sea. Food Chemistry*, 87.
25. Diagne, R.G., Foster, G.D., Khan, S.U., 2002, Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50.
26. Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., 1996, Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation, *Analytical Chemistry*, 68, 1033.

27. Mockel, H.J., Welter, G., Melzer, H., 1987, Correlation between Reversed-Phase Retention and Solute Molecular-Surface Type and Area, Theoretical Outlines and Retention of Various Hydrocarbon Classes, *Journal of Chromatography*, 388, 255.
28. Moreno, E., Reza, J., Trejo, A., 2007, Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27, 239.
29. Lundstedt, S., van Bavel, B., Haglund, P., Tysklind, M., Oberg, L., 2000, Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils, *Journal of Chromatography A*, 883, 151.
30. Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Martinez, J.A., 2009, Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods., *Journal of Chromatography A*, 2,
31. R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, 2004, Sample Preparation, in *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, xyz, 256.
32. Bjorklund, E., Bowadt, S., Nilsson, T., Mathiasson, L., 1999, Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples., *Journal of Chromatography*, 836, 285.
33. Camel, V., 2001, Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst*, 126, 1182.
34. Wenzel, K.D., Hubert, A., Manz, M., Weissflog, L., Engewald, W., Schuurmann, G., 1998, Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses, *Analytical Chemistry*, 70, 4827.
35. Arnold, C.G., Berg, M., Muller, S.R., Dommann, U., Schwarzenbach, R.P., 1998, 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, 3094.
36. Schantz, M.M., Nichols, J.J., Wise, S.A., 1997, Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials, *Analytical Chemistry*, 69, 4210.
37. Heemken, O.P., Theobald, N., Wenclawiak, B.W., 1997, 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, 2171.
38. Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z., 1998, An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction. *Analytical Chemistry*, 70, 420.

39. Vandenburg, H.J., Clifford, A.A., Bartle, K.D., Zhu, S.A., Carroll, J., Newton, I.D., Garden, L.M., 1943, Factors affecting high-pressure solvent extraction (accelerated solvent extraction) of additives from polymers, *Analytical Chemistry*, 70, 193.
40. Pawliszyn, J., 2003, Sample preparation: Quo Vadis?, *Analytical Chemistry*, 75, 2543.
41. Smith, R.M., 2002, Extractions with superheated water, *Journal of Chromatography A*, 975, 31.
42. Ong, E.S., Cheong, J.S.H., Goh, D., 2006, Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials, *Journal of Chromatography A*, 1112, 92.
43. Cam, M., Hisil, Y., 2010, Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels, *Food Chemistry*, 123, 878.
44. Ferrera, Z.S., Sanz, C.P., Santana, C.M., Rodriguez, J.J.S., 2004, The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23, 469.
45. Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H.W., Huie, C.W., 2003, Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions, *Journal of Chromatography A*, 983, 153.
46. Luthria, D.L., Biswas, R., Natarajan, S., 2007, Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean, *Food Chemistry*, 105, 325.
47. Zhu, Y., Yanagihara, K., Guo, F.M., Li, Q.X., 2000, Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of chloroacetanilide and nitrogen heterocyclic herbicides in soil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4097.
48. Richter, B.E., Covino, L., 2000, New environmental applications of accelerated solvent extraction, *Lc Gc North America*, 18, 1068.
49. Bernal, J.L., Delnozal, M.J., Jimenez, J.J., 1992, Use of a High-Pressure Soxhlet Extractor for the Determination of Organochlorine Residues by Gas-Chromatography, *Chromatographia*, 34, 468.
50. Lopez-Avila, V., 1999, Sample preparation for environmental analysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29, 195.
51. Blanco, E.V., Mahia, P.L., Lorenzo, S.M., Rodriguez, D.P., Fernandez, E.F., 2000, Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366, 283.
52. Camel, V., 2000, Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19, 229.

53. Renoe, B.W., 1994, Microwave-Assisted Extraction, *American Laboratory*, 26, 34.
54. Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z., 1997, 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, 361.
55. Letellier, M., Budzinski, H., 1999, Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis*, 27, 259.
56. R. Kellner, M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M. Widmer, 2004, Sample Preparation, in *Analytical Chemistry: Modern Approach to Analytical Science*, 506-508.
57. Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M., Garrigues, P., 2002, Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 196.
58. LopezAvila, V., Benedicto, J., 1996, Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 15, 334.
59. Bouaid, A., Martin-Esteban, A., Fernandez, P., Camara, C., 2000, 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, 291.
60. Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2006, 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, 6.
61. Franke, M., Winek, C.L., Kingston, H.M., 1996, Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation, *Forensic Science International*, 81, 51.
62. Desrosiers, N.A., Betit, C.C., Watterson, J.H., 2009, Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues, *Forensic Science International*, 188, 23.
63. Kiss, G.A.C., Forgacs, E., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H., Ramos, A., 2000, Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annuum* L.) powders, *Journal of Chromatography A*, 889, 41.
64. Prados-Rosales, R.C., Garcia, J.L.L., de Castro, M.D.L., 2003, Rapid analytical method for the determination of pesticide residues in sunflower seeds based on focused microwaveassisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 993, 121.

65. Priego-Capote, F., Luque-Garcia, U., de Castro, M.D.L., 2003, 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, 159.
66. Capelo, J.L., Mota, A.M., 2005, Ultrasonication for analytical chemistry, *Current Analytical Chemistry*, 1, 193.
67. Tadeo, J.L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Garcia-Valcarcel, A.I., 2010, Application of ultrasound- assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil sample, *Journal of Chromatography A*, 1217, 2415.
68. Santos, H.M., Capelo, J.L., 2007, Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment, *Talanta*, 73, 795.
69. Huertas-Perez, J.F., Iruela, M.D., Garcia-Campana, A.M., Gonzalez-Casado, A., Sanchez- Navarro, A., 2006, Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatograph., *Journal of Chromatography A*, 1102, 280.
70. Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M., 2008, 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, 284.
71. Domeno, C., Blasco, M., Sanchez, C., Nerin, C., 2006, 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, 103.
72. Hyotylainen, T., Riekkola, M.L., 2007, Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 788.
73. Erbay, Z., Icier, F., 2010, The Importance and Potential Uses of Olive Leaves, *Food Reviews International*, 26, 319.
74. Sanchez-Brunete, C., Perez, R.A., Miguel, E., Tadeo, J.L., 1998, Multiresidue herbicide analysis in soil samples by means of extraction in small columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 823, 17.
75. Sanchez-Brunete, C., Rodriguez, A., Tadeo, J.L., 2003, Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1007, 85.
76. Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Tadeo, J.L., 2004, Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1445.

77. Zougagh, M., Valcarcel, M., Rios, A., 2004, Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23, 399.
78. Mira, B., Blasco, M., Berna, A., Subirats, S., 1999, Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel, Effect of operation conditions on the extract composition, *Journal of Supercritical Fluids*, 14, 95.
79. Stashenko, E.E., Puertas, M.A., Combariza, M.Y., 1996, Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation solvent extraction and supercritical fluid extraction, *Journal of Chromatography A*, 752, 223.
80. Reindl, S., Hofler, F., 1994, Optimization of the Parameters in Supercritical-Fluid Extraction of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons from Soil Samples, *Analytical Chemistry*, 66, 1808.
81. Lee, H.B., Peart, T.E., Hongyou, R.L., Gere, D.R., 1993, Supercritical Carbon-Dioxide Extraction of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons from Sediments, *Journal of Chromatography A*, 653, 83.
82. Schantz, M.M., Bowadt, S., Benner, B.A., Wise, S.A., Hawthorne, S.B., 1998, 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, 213.
83. Eisenmenger, M., Dunford, N.T., 2008, Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85, 55.
84. de Azevedo, A.B.A., Kieckbush, T.G., Tashima, A.K., Mohamed, R.S., Mazzafera, P., de Melo, S.A.B.V., 2008, Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 44, 186.
85. Davarnejad, R., Kassim, K.M., Zainal, A., Sata, S.A., 2008, Supercritical fluid extraction of beta-carotene from crude palm oil using CO₂, *Journal of Food Engineering*, 89, 472.
86. Kim, W.J., Kim, J.D., Kim, J., Oh, S.G., Lee, Y.W., 2008, Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction, *Journal of Food Engineering*, 89, 303.
87. Mitra, P., Ramaswamy, H.S., Chang, K.S., 2009, Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil, *Journal of Food Engineering*, 95, 208.
88. Shi, J., Yi, C., Ye, X.Q., Xue, S., Jiang, Y.M., Ma, Y., Liu, D.H., 2010, Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin, *Lwt-Food Science and Technology*, 43, 39.

89. Yu, J., Liu, Y.F., Qiu, A.Y., Wang, X.G., 2007, Preparation of isoflavones enriched soy protein isolate from defatted soy hypocotyls by supercritical CO₂, *Lwt-Food Science and Technology*, 40, 800.
90. Bernal, J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Diego, C., Mayo, R., Maestre, R., 2008, 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, 266.
91. Miyawaki, T., Kawashima, A., Honda, K., 2008, Development of supercritical carbon dioxide extraction with a solid phase trap for dioxins in soils and sediments, *Chemosphere*, 70, 648.
92. Poole, C.P., Poole, S.W., 1997, *Chromatography Today*, Fifth impression, Elsevier Science, B.V., Amsterdam.
93. Millipore Corporation, 1992, *Waters Sourcebook of chromatography*, Milipore Corporation Milford.
94. Dolan, J.R., Synyder, R., 1979, Gradient elution in high performance liquid Chromatography, II: Practical application to reversed-phase systems, *Journal of chromatography*, 165, 31-58.
95. Barwick, V.J., 1997, Strategies for solvent selection- a literature review, *Trends in Analytical Chemistry*, 16-6, 293-308.
96. Schoenmakers, P.J., Van Molle, S., Hayes, C.M.G., Unk, L.G.M., 1991, Effects of pH in reversed Phase Liquid Chromatography, *Analitica Chimica Acta*, 250, 1-19.
97. Roses, M. and Bosch, E., 1993, Linear Solvation Energy Relationships in Reversed Phase Liquid Chromatography, Prediction of Retention From a Single Solvent and a Single Solute Parameter, *Analitica Chimica Acta*, 274, 147- 162.
98. Bosch, E., Bou, P., Roses, M., 1994, Linear Description of Solute Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography By a New Mobile Phase Polarity Parameter, *Analitica Chimica Acta*, 299, 219-229.
99. Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Katrin, S., Bosch, E., 1996, Retention of Ionizable Compounds on HPLC, 2. Effect of pH, Ionic Strength and Mobile Phase Composition on Retention of Weak Acids, *Analytical Chemistry*, 68, 4094-4100.
100. Augiar de P.F., Bourguignon B., Massart, D.L., 1997, Comparison of models and designs for optimisation of the pH and the solvent strenght in HPLC, *Analitica Chimica Acta*, 356, 7-18.
101. Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., Toro, I., 1999, Chromatographic behaviour of ionizable compounds in liquid cgromatography, Part 2. Standardization of potantiometric sensors and effect of pH and ionic strenght on the retention of analytes using acetoneitril-water mobile phases, *Analytica Chimica Acta*, 389, 43-52.

102. Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., 1995, Assignment of reference pH-values to primary Standard buffer solutions for standardization of potentiometric sensors in acetonitril-water mixtures, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 353, 148-155.
103. Covington, A. K., Bates R. G., Durst, R. A., 1985, Definition of pH scales, Standard reference values, measurements of pH and related terminology, *Pure and Applied Chemistry*, 57, 531.
104. Rondinini, S., Nese, A., 1987, Standart pH Values for Potasium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions in Acetonitrile-Water Mixtures up to 70wt % at Various Temperatures, *Electerochimicia Acta*, 274, 147-167.
105. Barbosa, J., and Sanz-Nebot, V., 1993, Standard pH-Values in Non-Aqueous Mobile Phases Used in Reversed- Phase Liquid Chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 283, 320-325.
106. Mussini, P.R., Mussini, T., Rondinini, S., 1997, Reference value standards and primary standards for pH Measurements in D₂O and aqueous- organic solvent mixtures: New accessions and assessments, *Pure & Applied Chemistry*, 69, 1007-1014.
107. Robards, K., Haddad, P.R., Jackson, P.E., 1990, Principles and Practice of modern Chromatographic Methods, 329.
108. Synder, L.R., Kirkland, J.J., 1979, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd. Edn. John Wiley and Sons, Inc., New York.
109. Poope, H., Kraak, J.C., 1983, *J. Chromatography*, 282, 399.
110. Agrafiotou, P., Rafols, C., Castells, C., Bosch, E., Roses, M., 2011, Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds, *Journal of chromatography A*, 1238, 4995-5000.
111. Torres, P.S., Lapasio, T.R.J., Baeza, B.J.J., Garcia, M.C., Coque, A.G., 2007, *Journal of Chromatography A*, 1163, 49-62.
112. Riley, C.M., Rosanske, T.W., 1996, Development and Validation of Analytical Methods, *Elsevier Science Ltd.*, New York.
113. Swartz, M.E., Krull, I.S., 1997, Analytical Method Development and Validation, *Marcel Dekker*, New York
114. International Conference on Harmonization (ICH 1994), Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures for Pharmaceuticals, *Availability*, Fed.Reg., 59, 9750.
115. The United States Pharmacopoeia, 24th Ed, 2000 [CD-ROM].
116. Adamovics, J.A., 1997, Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, *Marcel Dekker*, New York.

117. Kutucu, T., 2008, Telmisartan Ve Hidroklorotiazit'in YPSK Yöntemleri İle Aynı Anda Analizi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 125..
118. British Pharmacopoeia Volume IV, Herbal Drugs, Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products, Bearberry Leaf, (Ph Eur monograph 1054).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZTÜRK, Esra
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 09.12.1990, Bilecik
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (531) 696 74 18
e-mail : e.ozturkk@windowslive.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Uşak Üniversitesi/Kimya Bölümü	
Lisans	Fırat Üniversitesi/Kimya Bölümü	2012
Lise	Necati Özen Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2014	Birlik Yün İplik Men.	Laboratuar Sorumlusu

Yabancı Dil

İngilizce (orta)

Hobiler

Sinema, Kitap, Spor, Puzzle, Tiyatro.