

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAŞHAŞ KAPSÜLÜNDEN MORFİNİN EKSTRAKSİYONU
İÇİN ÇEVRE DOSTU PRATİK BİR YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Bahdişen GEZER

**Danışman
Prof.Dr. Mustafa CENGİZ**

**II.Danışman
Yrd.Doç.Dr. İbrahim BULDUK**

**DOKTORA TEZİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ - KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA-2015**

© 2015 [Bahdişen GEZER]

TEZ ONAYI

Bahdişen GEZER tarafından hazırlanan "**Haşhaş Kapsülünden Morfinin Ekstraksiyonu için Çevre Dostu Pratik Bir Yöntem Geliştirilmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Prof. Dr. Mustafa CENGİZ	
	Süleyman Demirel Üniversitesi	
II. Danışman	Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK	
	Uşak Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Bülent DEDE	
	Süleyman Demirel Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Ahmet HELVACI	
	Afyon Kocatepe Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Yavuz ERGÜN	
	Uşak Üniversitesi	

Enstitü Müdürü **Prof. Dr. Ahmet ŞAHİNER**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Bahdişen GEZER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
2.1. Genel Bilgiler	8
2.1.1 Haşhaş bitkisinin özellikleri ve sınıflandırılması.	8
2.1.2. Afyon tanımı, elde edilmesi ve kullanım alanları.....	10
2.1.3. Haşhaş ve Afyonun tarihçesi ve ekonomimize katkıları	12
2.2. Alkaloid Hakkında Genel Bilgiler.....	20
2.2.1. Alkaloidlerin kimyasal sınıflandırılması.	22
2.2.2. Başlıca alkaloidler ve özellikleri	24
2.2.2.1. Morfin	24
2.2.2.2. Kodein.....	26
2.2.2.3. Tebain	30
2.2.2.4. Noskapin	31
2.2.2.5. Papaverin	32
2.3. Ekstraksiyon	34
2.3.1. Çözeltilerden yapılan ekstraksiyon.....	34
2.3.2. Kimyasal etkileşmeye dayanan ekstraksiyon	36
2.3.3. Sürekli çekmeye dayanan sıvı-sıvı ekstraksiyonları	37
2.3.4. Katılardan (droglardan) yapılan ekstraksiyonlar	38
2.4. Ekstraksiyon Teknikleri	40
2.4.1. Soxhlet ekstraksiyonu	41
2.4.2. Ultrasonik ekstraksiyon	43
2.4.3. Mikrodalga ekstraksiyonu	45
2.4.4. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon	47
2.4.5. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu.....	48
2.4.6. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu.....	49
2.5. Kromatografi	50
2.5.1. Kromatografik metodların sınıflandırılması.	52
2.5.1.1. Ayırma mekanizmasına göre sınıflandırma.....	52
2.5.1.2. Hareketli faza göre sınıflandırma	52
2.5.1.3. Uygulanan tekniğe göre sınıflandırma.....	52
2.5.1.4. Kullanım amacına göre sınıflandırma	52
2.5.2. Sabit faz tipleri.....	52
2.5.3. Doğrusal kromatografi.....	55
2.5.4. Kromatografinin kullanım alanları	55
2.5.4.1. Nitel analiz.....	55
2.5.4.2. Nicel analiz	56
2.5.5. Adsorbsion kromatografisi	59
2.5.6. Dağılma kromatografisi	60
2.5.7. İyon değiştirici kromatografisi	61

2.5.8. Jel geçirgenlik (Moleküler eleme) kromatografisi	64
2.5.9. Kaynaşma (Affinite) kromatografisi.....	65
2.5.10. Faz tipine göre sınıflandırma.....	66
2.6. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi(HPLC).....	67
2.6.1. Pompalar.....	72
2.6.2. Enjektörler	73
2.6.2.1. Valf enjektörler	73
2.6.2.2. Şırınga enjektörler	74
2.6.3. Kolonlar.....	74
2.6.4. Dedektörler	77
2.6.4.1. Flouresans dedektörleri.....	78
2.6.4.2. Elektrokimyasal dedektörleri.....	80
2.6.4.3. Ultraviole ve görünür ışık dedektörü.....	80
2.6.4.4. Refraktif indeks dedektörleri	82
2.7. HPLC'nin kullanım alanı	84
2.8. Box-Behnken Desing Expert Programı	85
3. MATERYAL VE METOD	89
3.1. Materyal.....	89
3.2. Metod.....	93
3.2.1. Solvent türünün belirlenmesi çalışması.....	93
3.2.2. Ultrasonik ekstraksiyonu	95
3.2.2.1. Morfin tayini	96
3.2.3. Soxhlet ekstraksiyonu.....	98
3.2.4. Maceration ekstraksiyon	100
3.2.5. Mikrodalga ekstraksiyonu	101
3.2.6. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon	102
3.2.7. Deneyisel tasarım.....	105
3.2.8. İstatistik analizi	106
4. BULGULAR VE TARTIŞMA (ARAŞTIRMA BULGULARI).....	107
4.1. Solvent türünün belirlenmesi.....	107
4.2. Ultrasonik ekstraksiyonu ile morfin verimi.....	110
4.2.1. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine katı/solvent oranı'nın etkisi	113
4.2.2. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine pH'ın etkisi	114
4.2.3. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon sıcaklığının etkisi	114
4.2.4. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi	115
4.2.5. RSM ile ultrasonik ekstraksiyonla morfin verim optimizasyonu	116
4.2.6. Model uygunluğu.....	122
4.3. Soxhlet ekstraksiyonu.....	131
4.4. Maceration ekstraksiyonu	132
4.5. Mikrodalga ekstraksiyon	134
4.6. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon	135
4.7. Ultrasonik ekstraksiyon ile tebain verimi	137
4.7.1. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine katı/solvent oranı'nın etkisi	139
4.7.2. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine pH'ın etkisi	140
4.7.3. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine sıcaklığının etkisi	141
4.7.4. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi	142
4.7.5. RSM ile ultrasonik ekstraksiyonda tebain verim optimizasyonu	143
4.7.6. Model uygunluğu.....	149

4.8. Ultrasonik ekstraksiyon ile kodein verimi	153
4.8.1. RSM ile ultrasonik ekstraksiyonda kodein verim optimizasyonu ...	156
4.8.2. Model uygunluğu	161
5. SONUÇ VE ÖNERİLER (TARTIŞMA VE SONUÇLAR)	166
KAYNAKLAR	172
ÖZGEÇMİŞ	178
YAYINLAR.....	179

ÖZET

Doktora Tezi

Haşhaş Kapsülünden Morfinin Ekstraksiyonu İçin Çevre Dostu Pratik Bir Yöntem Geliştirilmesi

Bahdişen GEZER

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Mustafa CENGİZ

II. Danışman: Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK

Bu çalışmada, haşhaş kapsülündeki morfin miktarı ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) kullanılarak araştırılmıştır. Haşhaş kapsülünün ekstraksiyon içeriği üzerine etkin deneysel koşulları belirlemek için response surface metodolojisi kullanılmıştır. Bunun için, çözücü/katı oranı (10-20 mL/500 mg örnek), pH (1-13), zaman (30-60 dak) ve sıcaklık (30-50°C) deney değişkenleri olarak seçilmiştir.

Etkilenmiş yanıt haşhaş kapsülündeki morfin için ekstraksiyon geri kazanımıdır. Deneysel faktörler ve yanıt arasındaki ilişkiyi yorumlamak için yirmi dokuz deneyde bu bileşiğin üç farklı konsantrasyon düzeyinin kombinasyonları ile bir dizayn tablosu oluşturulmuştur. İkinci dereceden kuadratik model deneysel verilerin tatmin edici bir açıklamasını yapmıştır.

Bu çalışmada, R² (0,9591); EY Adj-R² (0,9182) ve Pred-R² (0,7750) değerlerini iyi türetilen modeli doğruluğunu görüntülemektedir. Üst düzeyde morfin için öngörülen optimal koşullar (6,16018 mg morfin/500 mg örnekli) 20 mL çözücü/500 mg katı oranı, 60 dk çıkarma zamanı, 1 pH ve 38,75 ° C sıcaklık bulundu.

En uygun koşullarda, deneysel değerleri çok tahmini değerleri vardı. Böylece, kullanılan ekstraksiyon metodlarının en etkili olanı Ultrasonik ekxtraksiyon yöntemi ile beraber Response surface methodology kullanılarak haşhaş kapsül tozundan yeterli düzeyde morfin verimi tahmini başarılı olarak elde edilebilmiştir.

Anahtar kelimeler: Gelincik somniferum, Morfin, Ekstraksiyon, Optimizasyon, RSM.

2015, 196 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Development of A Eco-Friendly Pratical Method for Morphine Extraction Morphine from Poppy Straw

Bahdişen GEZER

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa CENGİZ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İbrahim BULDUK

In this study, amount of morphine from poppy capsules (*Papaver somniferum*) was investigated using ultrasonic assisted extraction (UAE). Response surface methodology was used to estimate effective experimental conditions on the content extraction of poppy capsules. For this purpose, solvent/solid ratio(10-20 ml/500 mg sample), pH (1-13), time (30-60 min) and temperature (30-50°C) were chosen as experimental variables.

The effected response is extraction recovery values for morphine from poppy straw. For interpreting the relationship between experimental factors and response, a design table was established with combinations of three different concentrations levels of this compound in 29 trials. The second order quadratic model gave a satisfactory description of the experimental data.

In our study, For extraction efficiency R^2 (0,9591); Adj- R^2 (0,9182) and Pred- R^2 (0,7750) values indicate the accuracy of the derived model. The highest level of morphine (morphine 6.16018 mg / 500 mg-sample) conditions of 20 ml solvent / 500 mg solid ratio, extraction time 60 min, pH was found to be 1 and 38.75 ° C. These optimal conditions are reached very close to the value estimated experimental values.

Thus, response surface modeling can be achieved enough to determine the efficiency of extraction from the poppy capsules ultrasonic assisted extraction.

Keywords: Papaver somniferum; Morphine; Extraction; Optimization; RSM.

2015, 196 sayfa

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, araştırmanın yürütülmesinde maddi ve manevi yardımlarını gördüğüm değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Mustafa CENGİZ ve Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan, destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bahdişen GEZER

ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Mavi haşhaş tohumu	1
Şekil 1.2. Sarı haşhaş tohumu	1
Şekil 1.3. Haşhaş kapsülünde bulunan tohum örnekleri	2
Şekil 1.4. Türkiye’de haşhaş yetiştirilen yerler	4
Şekil 1.5. Dünyada haşhaş yetiştirilen yerler	5
Şekil 2.1. Papaver somniferumum yapısal gösterimi.....	8
Şekil 2.2. Papaver somniferumum yapısı.....	9
Şekil 2.3. Afyon sakızı.....	10
Şekil 2.4. Afyon sakızının çizilmesi	11
Şekil 2.5. Haşhaş bitkisinin çizik hali	13
Şekil 2.6. Morfinin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.7. Eroinin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.8. Toz eroin	27
Şekil 2.9. Kodeinin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.10. Kodein örnekleri	29
Şekil 2.11. Tebainin kimyasal yapısı	30
Şekil 2.12. Noskapinin kimyasal yapısı	31
Şekil 2.13. Noskapin örnekleri.....	32
Şekil 2.14. Papaverinin kimyasal yapısı	32
Şekil 2.15. Papaverin örnekleri	33
Şekil 2.16. Soxhlet düzeneği.....	42
Şekil 2.17. Ultrasonik banyo cihazı	44
Şekil 2.18. Manyetik karıştırıcı.....	47
Şekil 2.19. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyonda numune işlemi	48
Şekil 2.20. Michael Tswett’in kromatografi düzeneği.....	51
Şekil 2.21. Kromatografide elde edilen standartların kalibrasyon grafiği	57
Şekil 2.22. Tsvett’in kolon dolgu maddesi olarak kullandığı kireç	58
Şekil 2.23. Silika jel ve alumina örneği	59
Şekil 2.24. İyon değiştirme	63
Şekil 2.25. Jel boncukları	65
Şekil 2.26. HPLC cihazının şeması.....	68
Şekil 2.27. Polar örneklerin sabit fazda polar bileşenlerinden ayrılması.....	69
Şekil 2.28. Bir pistonlu pompanın şematik görünümü.....	72
Şekil 2.29. HPLC ön ve ana kolunun şematik görünümmleri.....	74
Şekil 2.30. HPLC’de kullanılan farklı çaplarda kolon örnekleri	75
Şekil 2.31. Farklı malzemelerden yapılmış kolon örnekleri	76
Şekil 2.32. HPLC’de kullanılan dedektör	78
Şekil 2.33. Flouresans dedektörler	79
Şekil 2.34. HPLC ultraviyole dedektörler.....	81
Şekil 2.35. Reaktif indeks dedektörler	83
Şekil 2.36. Faktör için Box-Behnken design geometresi	85
Şekil 2.37. Response surface design	86
Şekil 3.1. Öğütülmüş haşhaş kapsülleri	90
Şekil 3.2. Haşhaş tozlarının ölçümünde kullanılan hassas terazi.....	93
Şekil 3.3. Deneyde kullanılan kimyasal maddeler	94

Şekil 3.4. Soxhlet ekstraksiyon düzeneği.....	99
Şekil 3.5. Fitrasyon işlemi.....	99
Şekil 3.6. Ekstraktın distilasyonu.....	100
Şekil 3.7. Distile edilen metanol	101
Şekil 4.1. Eetanol ile yapılan ekstraktın kromatogramı	107
Şekil 4.2. Kloroform ile yapılan ekstraktın kromatogramı	108
Şekil 4.3. Metanol ile yapılan ekstraktın kromatogramı	108
Şekil 4.4. Deiyonize su ile yapılan ekstraktın kromatogramı	109
Şekil 4.5. Asetonitril ile yapılan ekstraktın kromatogramı	109
Şekil 4.6. Katı/Solvent oranı ile morfin verimi grafiği	113
Şekil 4.7. pH oranı ile morfin verimi grafiği	114
Şekil 4.8. Ekstraksiyon sıcaklığı ile morfin verimi grafiği	115
Şekil 4.9. Ekstraksiyon süresi ile morfin verimi grafiği	116
Şekil 4.10. Katı/solvent oranını ve çözücü pH'ın morfin verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	118
Şekil 4.11. Katı/solvent oranını ve ekstraksiyon sıcaklığının morfin verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	119
Şekil 4.12. Ekstraksiyon süresi ve çözücü pH'ın morfin verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	120
Şekil 4.13. Ekstraksiyon sıcaklığı ile çözücü pH fonksiyonu olarak haşhaş tozlarının morfin verimi için yüzey grafiği.....	121
Şekil 4.14. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin morfin verimi arasında ilişkisini gösteren yüzey grafiği.....	122
Şekil 4.15. Model denklem kullanılarak hesaplanan değerler karşı deneysel olarak elde edilen değer arasındaki ilişki	126
Şekil 4.16. Morfin standartı ve çalışma kromatogramı.....	127
Şekil 4.17. Soxhlet ekstraksiyon kromatogramı	131
Şekil 4.18. Maceration ekstraksiyon kromatogramı	133
Şekil 4.19. Mikrodalga ekstraksiyon kromatogramı	134
Şekil 4.20. Katı/Solvent oranı ile tebain verimi grafiği	140
Şekil 4.21. pH oranı ile tebain verimi grafiği.....	141
Şekil 4.22. Ekstraksiyon sıcaklığı ile tebain verimi grafiği	142
Şekil 4.23. Ekstraksiyon süresi ile tebain verimi grafiği	143
Şekil 4.24. Katı/Solvent oranı ve çözücü pH tebain verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	145
Şekil 4.25. Ekstraksiyon sıcaklığı ve katı/solvent miktarının tebain verimi ilişkisini gösteren yüzey grafiği	146
Şekil 4.26. Ekstraksiyon süresi ve çözücü pH'nın tebain verimi ilişkisini gösteren yüzey grafiği.....	147
Şekil 4.27. Ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü pH'nın tebain verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	148
Şekil 4.28. Ekstraksiyon süre ve ekstraksiyon sıcaklığının tebain verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	149
Şekil 4.29. Model denklem kullanılarak hesaplanan değerler karşı deneysel olarak elde edilen değer arasındaki ilişki	152
Şekil 4.30. Katı/Solvent oranı ve çözücü pH'nın kodein verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	157
Şekil 4.31. Ekstraksiyon sıcaklığı ve katı/solvent miktarının kodein verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	158

Şekil 4.32. Ekstraksiyon süresi ve çözücü pH'nın kodein verimi arasındas ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	159
Şekil 4.33. Ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü pH'nın kodein verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	160
Şekil 4.34. Ekstraksiyon süre ve ekstraksiyon sıcaklığının kodein verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği.....	161
Şekil 4.35. Model denklem kullanılarak hesaplanan değerler karşı deneysel olarak elde edilen değer arasındaki ilişki	165

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Haşhaşa bulunan en önemli alkaloidler	16
Çizelge 2.2. Afyon alkaloid fabrikasında üretilen türevler	17
Çizelge 2.3. Kromatografik ayırmaların sınıflandırılması	54
Çizelge 2.4. HPLC’de kullanılan bazı çözücüler ve özellikleri	70
Çizelge 2.5. HPLC’nin kullanım alanları.....	84
Çizelge 3.1. Ultrasonik ekstraksiyon için hazırlanan numune koşulları.....	95
Çizelge 3.2. Morfin analiz metodu.....	97
Çizelge 3.3. Deneyde kullanılan mikrodalga koşulu	102
Çizelge 3.4. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon için hazırlanan numune koşulları.....	102
Çizelge 3.5. Morfin analiz metodu.....	104
Çizelge 3.6. Ultrasonik ekstraksiyon ile morfin optimizasyonu için RSM’de kullanılan sembolleri ile bağımsız değişkenler ve onlara ait kod değerleri.....	106
Çizelge 4.1. Box-Behnken design’ında kullanılan bağımsız değişkenlere ait veriler ve elde edilen morfin verim değerleri	110
Çizelge 4.2. Morfin optimizasyonu RSM’nin bağımsız değişkenlerinin kod seviyeleri	112
Çizelge 4.3. Morfin verimi için design expert 8.0.1.7’in kuadratik denkleminin varyans (ANOVA) analizi	124
Çizelge 4.4. RSM kullanılarak en iyi ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi..	128
Çizelge 4.5. Morfin analiz metodu.....	132
Çizelge 4.6. Mikrodalga ekstraksiyonunda morfin verim değerleri	135
Çizelge 4.7. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyonunda morfin verim değerleri	136
Çizelge 4.8. Box-Behnken design’ında kullanılan bağımsız değişkenler ve elde edilen tebain verim değerleri	137
Çizelge 4.9. Tebain optimizasyonu RSM’de kullanılan bağımsız verilere ait değişkenler ve kod seviyeleri.....	139
Çizelge 4.10. Tebain verimi için design expert 8.0.1.7’in kuadratik denkleminin varyans (ANOVA) analizi.....	151
Çizelge 4.11. Box-Behnken design’ında kullanılan bağımsız değişkenler ve elde edilen kodein verim değerleri	153
Çizelge 4.12. Kodein optimizasyonu RSM’nin bağımsız değişkenleri ve kod seviyeleri	155
Çizelge 4.13. Kodein verimi için design expert 8.0.1.7’in kuadratik denkleminin varyans (ANOVA) analizi.....	163
Çizelge 5.1. Farklı ekstraksiyon metoduna göre en yüksek morfin verim değerleri	166

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cor	Ortalama için düzeltilmiş tüm bilgilerin toplamı
df	Serbestlik derecesi
dk	Dakika
GK	Gaz Kromatografisi
HPLC	High-performance liquid chromatography
IR	İnfrared
K	Kodein
M	Morfin
MAE	Microwave-Assisted Extraction
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCB	Printed Circuit Board (Baskı Devre Kimyasalları)
RSM	Response Surface Methodology
t	Zaman
T	Tebain
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Haşhaş, Hititler döneminden beri (1.Ö . 2000 yılları) Orta Anadolu'da yetiştirilen, ilaç ve gıda hammaddesi olarak kullanılan, ülkemizin en önemli tarımı yapılan endüstriyel bitkilerden olduğu bilinmektedir. Latince "fructus papaveris immaturi", Almancada "mohn koepfe", Fransızcada "tete de pavot", İngilizcede "poppy head" olarak geçtiği belirtilmektedir. Haşhaşın Latince ismi ise *papaver somniferum*dur. *Somniferum*'a uyku getiren, uyutucu, uyku verici anlamı verilmiştir. Haşhaşın başı ise Latince "papaveris immaturi fructus" olarak da bilinmektedir. *Papaver somniferum L.* şeklindeki yazılışta L. harfi tasnif eden bilim adamının adının ilk harfi verilmiştir. Haşhaş bitkisi tohum ve kapsül olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Haşhaş tohumlarının uyuşturucu özelliği yoktur yani alkaloid içermemektedirler. Sarı, beyaz, mor, kahverengi renkte olabilirler. Çok iyi enerji kaynağıdır. Şekil 1.1 ve Şekil 1.2'de görüldüğü gibi Anadolu'da eski tarihlerden beri bilinen en çok rastlanan, mavi ve sarı renkli haşhaş türlerinin olduğu tespit edilmiştir (T.M.O., 2013).



Şekil 1.1. Mavi haşhaş tohumu



Şekil 1.2. Sarı haşhaş bitkisi

Kurumuş haşhaş kapsülünün, ağırlığı kadar tohum içerdiği bilinmektedir (Şekil 1.3). Haşhaş tohumlarının soğukta sıkılmasıyla haşhaş yağı elde edilmiştir. Tohumlarının % 40-45 oranında yağ içerdiği belirtilmiştir (Küçük, 1996). Haşhaş yağının başlıca bileşenleri linoleik asit ve oleik asit olarak belirlenmiştir.

Ayçiçeği yağı ve pamuk yağı gibi bitkisel yağların kullanılmasına kadar haşhaş yağı ve tohumundan yemeklik yağ olarak faydalanılmıştır. Halen haşhaş yetiştirilen yörelerde bu amaçla kullanım devam etmektedir (Şekil 1.5). Tohum yağının kurutucu özelliği olduğu bulunmuştur. İnce boyaların üretiminde, radyolojide iyotlu bir bileşiğin yapımında, salata soslarında, verniklerde kullanılmaya devam etmiştir (Küçük, 1996), ve doğal boyamada haşhaş çiçeğinin eflatun rengi günümüzde halen kullanılmakta olduğu görülmektedir.



Şekil 1.3. Haşhaş kapsülünde bulunan tohum örnekleri

Haşhaş tohumlarının yağı alındıktan sonra kalan küspesi % 30-35 oranında protein içerdiği bulunmuştur. Haşhaş tarımı yapılan bölgelerde, bu küsbeler hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Önceden, bileşiminde çok az da olsa afyon alkaloidi bulundurduğu için yalnız besi hayvanlarına verilmiştir. Özellikle olgunluğunu tamamlamamış üründen elde edilen haşhaş küspeleri daha çok morfinli olduğundan hayvanlara zararlı olduğu görülmüştür (Vikipedia, 2014).

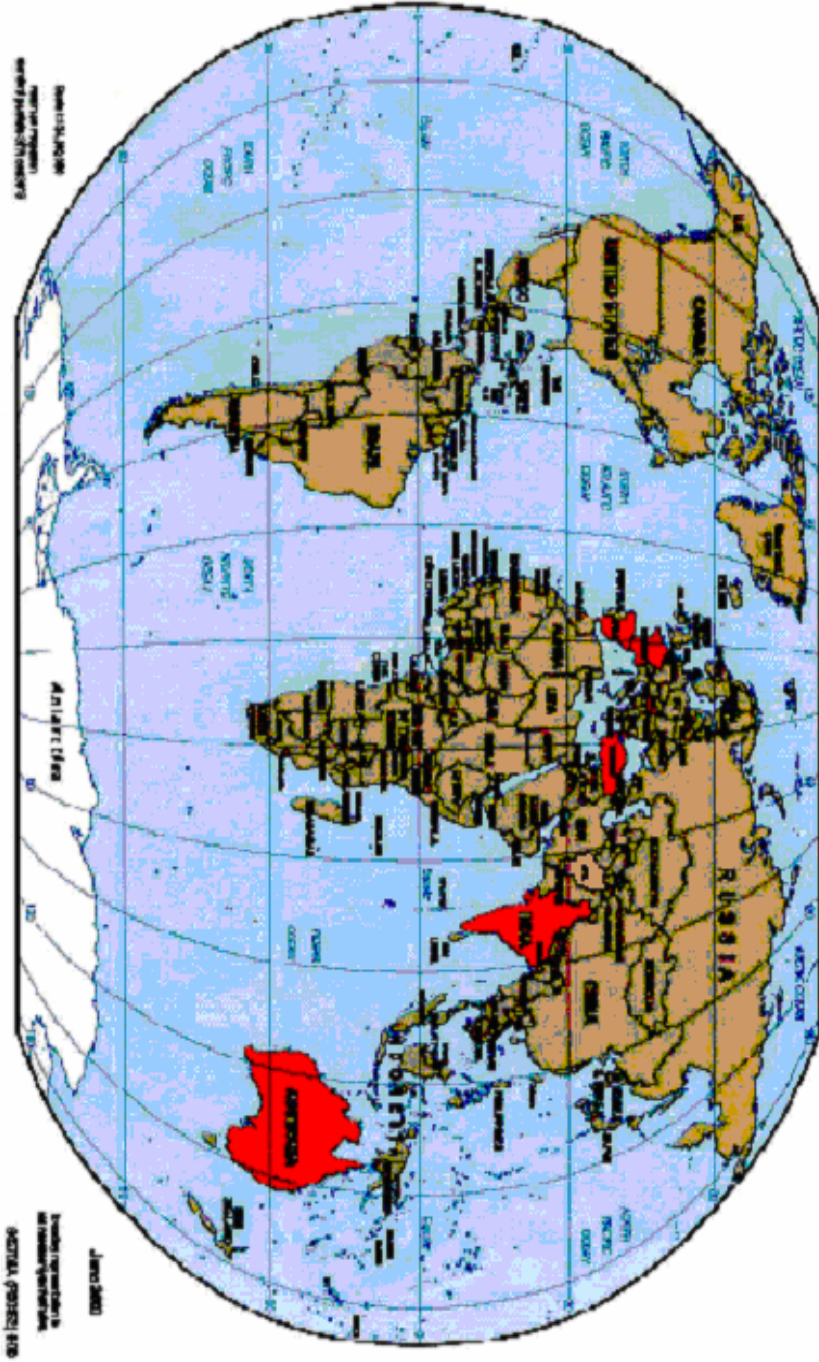
Haşhaş türlerinden adam haşhaşı (*p. macrostomum*)‘nın Van yöresinde kapsüllerin yenildiği bilinmektedir. Doğu haşhaşı (*p. orientale*)‘nin ise, Ağrı, Erzurum, Kars yöresinde genç meyvelerin yenmekte olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.4) (Vikipedia, 2014) .

Haşhaş sapları ise, hasır yapımında kullanılmaktadır. Kurutulmuş haşhaş kapsüllerinin içerdiği alkaloidler haşhaş bitkisinin en önemli kullanım alanı olmuştur. Haşhaş kapsülü üzerinde yapılan araştırmalarda, 40’a yakın değişik alkaloid ihtiva ettiği bulunmuştur. Ancak tıpta genellikle kullanılan ve izolasyonu yapılan morfin, kodein, tebain, noskapin ve papaverin olduğu tespit edilmiştir (T.M.O, 2013).

Kapsül, halk hekimliğinde gargara yapılarak diş ağrılarına karşı ya da bazı yörelerde çocukları uyutmak için de kullanılmaktadır (T.M.O, 2013). Ayrıca uyuşturucu özellikteki afyon sakızı haşhaştan elde edildiği bilinmektedir. Mezopotamyalılardan bu yana ağrı kesici olarak ve başka amaçlarda tedavide kullanılan bu ürün nedeniyle haşhaş çok uzun dönemlerden beri yetiştirilmeye devam edilmiştir (T.M.O, 2013). Tohumların içeriğinde; nem % 4,3 - 5,2; protein % 22,3 - 24,4; ham lif % 4,8 -5,8; kül % 5,6 – 6,0; kalsiyum % 1,03 – 1,45; fosforöz % 0,79 – 0,89; demir % 8,5 - 11,1 oranlarında bulunmaktadır.



Şekil 1.4. Türkiye’ de haşhaş yetiştirilen yerler



Şekil 1.5. Dünya’da haşhaş yetiştirilen yerler

Morfin ve kodeinin genelde narkotik analjezikler olarak kullanılan en önemli doğal bileşikler arasında yer aldığı belirtilmektedir (Carins, 2003). Tebain güçlü analjezik, oksikodon ve buprenorfin sentezi için bir ön madde olarak kabul edilmiştir (Theuns, 1986). Ayrıca morphinans benzilizokinolin alkaloidler olarak sınıflandırılmıştır. 2500 den fazla benzilizokinolin alkaloidler Papaveraceae dâhil olmak üzere beş bitki ailelerinde bulunmuştur (Facchini, 2001). Bununla birlikte, yakın ilişkili Papaver türlerin sadece küçük bir morfinan alkaloidler üretme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Ute, 1986). Morfin, kodein ve tebain gibi büyük afyon alkaloidleri tıbbi ve adli öneme sahip alkaloidler sınıfında yer aldıkları belirtilmektedir (Pichini, 1999). Buna ek olarak, güçlü bağımlılık ve yasadışı narkotik üretimi için bir hammadde haline geldiği bilinmektedir (Yoshimatsu, 2005). Bu yüzden, morfin, kodein ve tebain varlığı için farklı Papaver türlerinin tarımı her dönemde büyük önem taşımıştır.

Bitki malzemesinin solvent ekstraksiyon geleneksel teknikleri çoğunlukla çözücü ve ısı ve ajitasyon kullanımı bileşiklerin çözünürlüğünü ve kütle transfer oranını artırmak için doğru seçim için büyük önem taşımıştır. Geleneksel teknikler genellikle uzun ekstraksiyon süreleri, yüksek sıcaklık ve bazen düşük verimliliğe sahip olmasına neden olmuştur. Buna ek olarak, bir doğal ürünün termal olarak kararsız ve çıkarma işlemini düşürdüğü belirtilmektedir (Jianyong, 2001). Ultrason (ses dalgaları) kullanılması ile, parça çıkarma veriminin daha kısa sürede ve daha düşük sıcaklıklarda artış gösterdiği görülmüştür. Ultrasoniye mekanik etkisi, hücre duvarlarının bozulması ve hücre içeriğinin daha iyi kütle transferi için, bitkilerin gövde içinde bulunan aktif bitki bileşiklerini çıkarma işlemini hızlandırmak için gerekli olduğu söylenmiştir (Hromadkova, 1999). Günümüzde, sonikasyon farklı matrislerden polisiklik aromatik hidrokarbonlar, farmasötik olarak aktif bileşikler ve flavonoidler elde etmek için kullanılan yöntemlerden biri olmuştur (Navarro, 2009 - Huang, 2009).

Haşhaş kapsülü, afyon olarak bilinmekle beraber, binlerce yıldan beri sedatif, anestezi, analjezik ve antidiyaretik olarak da tıpta kullanılmaya devam etmiştir. Milattan önce 65. yıllarında antik belgelerde De Materia Medica olarak bilindiği belirtilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, haşhaş kapsülünün yüksek konsantrasyonda alkaloid içerdiği bulunmuştur.

Tıpta; morfin, kodein, tebain, papaverin ve noskapin kullanımı çok olmuştur. Tıbbi özelliklerinin yanında bu alkaloidler, insan vücudunda oluşturduğu bağımlılık nedeniyle de önem taşımıştır. Örneğin, morfinin hammadde olarak kullanımının yasal olmadığı bilinmektedir. Morfin iki kapalı halkadan oluşan benzilizokinolin alkaloidtir. Bu nedenle, uygun analizi bulmak ve içerdiği afyon alkaloid ekstraksiyonu için büyük önem taşıdığı belirlenmiştir.

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri, daha fazla çözücü, yüksek sıcaklık ve uzun süren zamanlarda yüksek verim elde edilmesine neden olmuştur. Günümüzde, ekstraksiyon teknikleri daha az miktarda çözücü kullanarak düşük sıcaklıklar için çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Ultrasonik ekstraksiyon tekniği kullanılarak ultrasonik ses dalgalarıyla bitkinin hücre duvarı yıkılır ve kütle transferi gerçekleştirilmektedir. Diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslandığında kullanımı basit ve ucuz bir yöntem olduğu görülmüştür. Son yıllarda araştırmacılar arasında da popüler kullanıma sahip olduğu belinmektedir. Madde parçacık boyutu, çözücü türü, çözücü konsantrasyonu, çözücü/katı oranı, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon basıncı ve çözücü pH parametreleri ultrasonik ekstraksiyon yöntemi için önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Literatürde, iki optimizasyon yönteminin olduğu belirtilmektedir. Bunlardan biri tek faktör zaman yaklaşımı ve diğeri tepki yüzey metodolojisidir. Bir faktörlü klasik yöntemde zaman uzun sürmekte ve pahalı olan bir yöntem olduğu saptanmıştır. Ayrıca, diğer parametreler arasındaki olası etkileşim göz ardı edilmiştir. Bundan dolayı sonuçların yanıltıcı olduğu tespit edilmiştir. Fakat Tepki Yüzey metodolojisi (RSM) parametreler arasında muhtemel ilişkileri göz önünde tuttuğu için önemli bir yöntem olmuştur. Deney verilerinin kullanımı açısından en üst düzeyde deney tasarımı olarak kullanılmış ve daha sonra deney sonuçları arasındaki ilişkilerin gücünü verdiği tespit edilmiştir. RSM gerekli olan deney sayısını bize vermekte ve doğru deney verilerden en uygun deney koşullarını tahmin etmemiz açısından iyi bir istatistiksel çalışma yönteminin olduğu görülmüştür.

2. Kaynak Özetleri

2.1. Genel Bilgiler

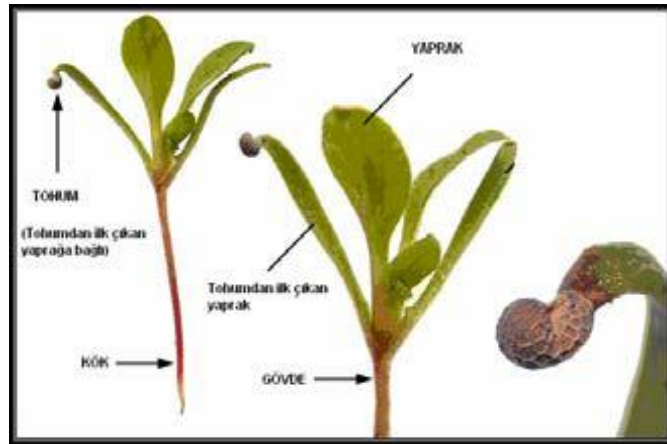
2.1.1. Haşhaş bitkisinin özellikleri ve sınıflandırılması

Haşhaş (*papaver somniferum*) gelincikler familyasından (*papavercae*) bir, iki ya da çok yıllık otsu bitki olduğu tespit edilmiştir. Yaprakları çıkışlı ve değişik biçimde parçalıdır, uca doğru sivri, tabanı ise gövdeyi sarmış, kenarları mavimsi, yeşil ya da grimsi yeşil renkte olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1). Çiçekleri uzun sap ve dalların ucundadır. Genellikle 4 adettir. Mavimsi– mor, beyaz, pembe-kırmızı renkte olabilmektedir. Çiçek açılır açılmaz iki çanak yaprak olarak dökülürler. Çiçek açılmadan önce de içinde dört taç yaprak ve döllenme tozlarının bulunduğu görülmüştür. Çiçeklerin solup dökülmesinden sonra ortadaki göbek büyür, kapsül ve küre şeklini aldığı görülmüştür. Kapsülleri 4-5 cm çapında olup tohumları ise meyvenin (kapsül) içindedir. Boyu 50-150 cm uzunluğundadır, bazı bölgelerde 1,2 m'ye kadar uzandığı bilinmektedir. İlk yeşerdiği dönemlerde süt boruları yoktur, bundan dolayı bitki salatalarında kullanılmıştır. Çimlenmeden 17 gün sonra süt borularının oluştuğu ve bitkinin acılaştığı belirtilmektedir (Küçük, 1996).



Şekil 2.1. *Papaver Somniferumun*

Papaveraceae familyası *papaverales* takımından çoğunluğu otsu ya da küçük ağaç, çalimsı yapıda 26 bitki cinsini içeren familya türünden olduğu bulunmuştur. Yaklaşık 250 türü olduğu bilinmektedir. Ülkemizde bu familyaya ait 5 cinsi bulunmuştur. Bu familyanın üyeleri arasında çiçekçilik ve eczacılık açısından değerli bazı türleri bulunmuştur. *Papaver* cinsi kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde yetiştiği ve bir, iki ya da çok senelik olduğu bilinmektedir (Şekil 1.5). *Papaver* cinsinin dünyada 110 kadar türünün varlığı tesbit edilmiştir (Şenol,1988). Fakat Türkiye de 40 kadar türünün yetiştiği bulunmuştur. Bu cinsteki bitkilerin yaprakları tüysü, loplu veya parçalı olduğu bilinmektedir. Şekil 2.2’de görüldüğü üzere toprak üstü bölümlerinde sütlü bir öz su taşırlar, kalıcı olmayan iki çanak yapraklarının olduğu ve 4-6 adet çiçeklerinin bulunduğu görülmüştür (T.M.O., 2013). Kimyasal sınıflandırmada kimyasal özellikleri, alkaloidler, bazı pigmentler, lateks dikkate alınmıştır. *Papaver* cinsinden *papaver somniferum* L. İse bizim geleneksel kültür bitkimiz olmuştur. Haşhaş cinsinin yaklaşık 50 türünden 30 kadarı Türkiye’de yetişmekle birlikte bunların en önemlisi *Papaver somniferum* olduğu tespit edilmiştir. *Papaver* türleri arasından en çok araştırılan tür olduğu bilinmektedir. Dünya çapında eski bir yetiştirilme geçmişine sahip bitki türünden olmuştur. Çeşitli renkleri, çiçek şekilleri, kapsül şekilleri ve alkaloid bileşenleri içeriği bulunmuştur. Bitkinin yetiştirilmesi ve işlenmesi çok sıkı kontrol edilmesine rağmen tohumları ithal edilmiş ve süs bitkisi olarak da satılmıştır (Şenol, 1988).



Şekil 2.2. *Papaver somniferum*un yapısal gösterimi

2.1.2. Afyonun tanımı, elde edilmesi ve kullanım alanları

Afyon kelimesi, Almanca, İngilizce ve Fransızca da “opium “olarak, Çincede “a fu yung” olarak geçmektedir. Farsça da ise “efyun” kökünden gelmiştir. Latince de “*succus papaveris*” olarak geçtiği bilinmektedir. Yunanlılar haşhaşın sıvısına “mekanion“ demişlerdir. Yunanca da opium kelimesi opos (özsuyu) kökünden türetilmiştir. Farsçada ise afiyumun uyku kelimesinden geldiği tespit edilmiştir (Küçük,1996).



Şekil 2.3. Afyon Sakızı

Haşhaş bitkisinin olgunlaşmamış kapsüllerinin özel bir bıçakla çizilmesiyle kapsülden çıkan sütün havayla temas edip katılaştığı tespit edilmiştir. Kapsülden çıkan süt (lateks) önce beyaz, sonradan koyu kahverengi, bazı çeşitlerinde siyah renk aldığı belirlenmiştir. Tahriş edici bir zift görünümünü almıştır. Taze iken yumuşaktır. Keskin, hoş olmayan kokulu ve acı bir tadı olduğu bilinmektedir. Bu katılaşmış süt “afyon sakızı“ olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.3). Bunlar özel bıçaklarla toplanmıştır (Şekil 2.4). Ticari ürünleri, Türkiye afyonu, Hindistan afyonu, İran afyonu, Çin afyonudur ve görünüşleri, kaliteleri farklılık göstermiştir.



Şekil 2.4. Afyon sakızının çizilmesi

Afyonun etkin maddesi bileşiminde bulunan alkaloidlerden olduğu bulunmuştur. Yaklaşık olarak, yapılan araştırmalarda içerisinde % 10 morfin, % 5 kodein, % 6 narkotin (noskabin) bulunduğu tespit edilmiştir. Bunlardan başka reçine, kauçuk, yağ, mum, organik asitler (laktik asit), şeker, protein, su, tuzlar (sülfat ve amonyum tuzları) bulunmuştur. Türk afyonun morfin bakımından dünyada en zengin afyon olduğu tespit edilmiştir. Türk afyonunda, farklı 25 çeşit alkaloid bulunmuştur (Türkçebilgi, 2014). Bir kapsülde 20-50 mg afyon bulunmuştur. 1 kg afyon elde edebilmek için 20000 kapsül gerektirdiği belirlenmiştir. Afyonun fizyolojik etkileri morfine benzemekle beraber daha zayıf olduğu bilinmektedir. Ağrı kesici, sancıları dindirici, ishali önleyici, uyutucu, uyuşturucu, öksürük kesici ve bağımlılık yapıcı özelliklere sahip olduğu görülmüştür. İshal, kanlı ishal, bağırsakların yapışması sonucu kabızlık, hischsprang hastalığı (kalın bağırsağın şişmesi nedeni ile kabızlık), uyuyamama, iç kanama ve korkuya karşı olarakta kullanılmıştır (Suh J.H., 2013).

Mecbur kalınmadıkça kullanılmamıştır. Çünkü tedavi edici dozajla, zehirleyici dozaj birbirine çok yakın olduğu için kullanımında doktor denetimi şart olmuştur. İki tür kullanım şekli vardır:

a-Afyonun tentür ve toz şeklinde kullanımı,

b-Afyonun bileşimindeki alkaloidlerin çeşitli şekillerde ilaçları yapılarak.

Afyon tozu ise 0,02-0,05 gramı ağrı kesici, 0,05-0,08 g' ı uyuşturucu, 0,08-0,1 g'ı ise öldürücü etki oluşturmaktadır. İshal tedavisinde ise afyonun alkol içindeki çözeltisi (afyon ruhu) ve kâfurlu seyreltik çözeltisi ağız yoluyla kullanılmıştır (Lili, 2010).

Afyonun yasal kullanımı, saf alkaloidlerin ya da türevlerin elde edilmesi ve bu ürünlerin tıp, eczacılık alanında kullanıldığı belirlenmiştir. Afyonun içindeki morfine karşı bağımlılık yapması önemli bir sosyal olay olmuştur. Morfinman annelerin çocukları anne karnında bu maddeye alışmakta, doğunca morfin açlığı hissetmişlerdir. Yüksek dozda, afyon kullanımından ileri gelen ağır zehirlenmeler genellikle ölümle sonuçlanmıştır. Alkaloidlerin elde edilmesiyle ve formüllerinde bazı değişiklikler yapılarak tedavide kullanılması ile afyonun alışkanlık yapıcı etkisi azaltılmış, ağrı kesici, öksürük dindirici özellikleri artırılmıştır. Sentetik olarak üretilmesiyle afyonun kullanımı azaltılmaya çalışılmıştır (Lili, 2010).

2.1.3. Haşhaş ve afyonun tarihçesi ve ekonomimize katkıları

Haşhaş bitkisinin çok eski zamanlardan beri M.Ö.5000 yıllarından beri kullanıldığı bilinmektedir. Sümerlilerin dillerinde haşhaşın varlığına dair deliller bulunmuştur. Asuri kabartmalarında haşhaş resimleri (Şekil 2.5) görülmüştür. Dr. R. Campbell Thompson'ın "Asurian Helval" adlı eserinde, Asuri lisanında manası afyon ve haşhaş anlamına gelen kelimeler olduğu ve Asurluların afyonu tıp alanında uyku verici bir ilaç hammaddesi olarak kullandıkları kaynaklarında yazılmıştır (Afyonkarahisar, 2014). Bazı iddialara göre, haşhaşın anavatanın Orta Asya yani Türkistan olduğu bulunmuştur. Ancak Anadolu'da ve özellikle Afyon dolaylarında bulunan, Etiler döneminden kaldığı iddia edilen taş kabartma ve paralarda haşhaş resimleri bulunmuştur.

Hititler, haşhaş M.Ö 2000 yılından beri kullanmıştır (Afyonkarahisar, 2014). Başkenti Hattutaş'ta bulunan incelemede tabletlerde ilaç tanımlarına rastlanmıştır. Tabletlerde haşhaşın “gış haşşikka” olarak geçtiği bulunmuştur. Hititler haşhaşı kutsallaştırmışlar ve dışmanlarına satışını cezalandırmak amacıyla yasaklamışlardır (Afyonkarahisar, 2014).



şekil 2.5. Haşhaş bitkisinin çiçek hali

Haşhaş bitkisinin nasıl yetiştirildiğini ilk tarif eden The Ophrastus olmuştur. M.Ö.287-372'de haşhaş ziraatının ilk defa nerede başladığı kesin bilinmemektedir (Afyonkarahisar, 2014). Tşrklerin eski anayurtları olan Orta Asya'da haşhaş ziraatı yapmakta oldukları ve gōçler ile bu kşltşrş yaydıkları dışşnşlmektedir. Afyon sakızı da çok eski zamanlardan beri ilaç ve keyif verici olarak kullanılmıştır. Hindistan'da, Çin'de, Eski Mısır'da haşhaş başları çizilerek afyon elde edilmiştir. Afyonu ilk kez tanımlayan 1. yy'da yaşamış olan Perihyles İatrikes, ilaç bilgisi şzerine Latince baskısı De Materiamedica adlı kitabı farmakopinin temeli sayılan Dioskorides olduğu belirtilmiştir. Tşrk İşlam hekimlerinden Razi, İbn-i Sinave İbn-i Zşbeyr afyonu öksřrřęe karşı kullanmışlardır. Tıpta kullanımı, M.Ö. 123-63 senelerinde yaşamış Pontus hşkşmdarı Bşyşk Midrat'ın afyondan yaptığı ilaçla tedavi yōntemi olduğu bilinmektedir.

Bu ilaç, 130 yıl sonra Pontus hükümdarı Neros'un hekimi Andramak tarafından geliştirilerek adına "tiryak" denilmiştir. Çubukla afyon içme alışkanlığı Amerika'nın keşfinden sonra başlamıştır. Günümüzde yasal ve yasadışı afyon üretiminin merkezi Asya olduğu bulunmuştur (Yoshimatsu, 2005).

Hindistan ve Türkiye'nin dünya afyon üretiminde ve dış satımında ilk sırayı aldığı belirtilmiştir. Afyon ve haşhaş hakkındaki ilk sistemli ve bilimsel veriler Fransız hekim Pierre Belon tarafından verilmiştir (T.M.O., 2013). Afyon'un elde edilişi ve cinsleri hakkında bilgiler vermiştir. Anadolu'da yetiştirilen ilk haşhaşların analizleri Faik Paşa tarafından yapılmıştır. İlk afyon fabrikası 1613 yılında Hindistan'ın Surat şehrinde Fransız – Hint işbirliği ile kurulmuştur. Cumhuriyet döneminde de İstanbul da üç adet afyon alkaloidleri üreten tesisin bulunduğu tespit edilmiştir. 1931 yılında hükümet kararıyla kapatılmıştır (T.M.O., 2013).

Osmanlı döneminde de haşhaş ekimi çok yaygın olduğu ve elde edilen afyonun önemli bir dış satım ürünü olduğu belirtilmiştir. 1858 yılında İzmir limanından İngiltere'ye 41130 kg ABD'ye 40800 kg afyon ihraç edilmiştir. Cumhuriyet döneminde de haşhaş üretimi sürmüştür, ancak ekimi 1933 yılından sonra devlet iznine bağlanmıştır. 1933 yılında 2253 sayılı kanunla uyuşturucu maddeler inhisar idaresi kurulmuş ve 1938 yılında çıkarılan 3491 sayılı T.M.O teşekkül kanunu ile bu görev T.M.O' ne verilmiştir. 1933 yılında bakanlar kurulu kararıyla 17 ilde yapılan haşhaş ekimi, üretilen afyonun tamamının ihraç edilmesi ve taleplerin karşılanamaması nedeniyle 1950-60 arasında 42 ile çıkarılmış ve dünyada uyuşturucu kaynaklarından birinin Türkiye olduğu hususundaki propagandaların yoğunlaşması üzerine, aksinin ispat edilmesinin gerekliliği nedeniyle ekim alanları 9'a düşürülmüştür. 1971'de afyon elde edilmesi yasaklanarak sadece haşhaş ve tohumunun üretimine izin verilmiştir. 1971 -74 yılları arasında Avrupa ve Amerika ya yasadışı yollardan sokulan uyuşturucu madde miktarında değişiklik olmamış, diğer afyon üreten ülkeler Türkiye'nin pazarda çekilmesiyle doğan boşluğu doldurmak amacıyla üretimlerini artırmışlar ve yeni üretici ülkeler ortaya çıkmıştır. 1954'de 35 ilde, 1974'de 7 ilde üretime müsaade edilmiştir.

Afyon, Burdur, Denizli, Isparta, Kütahya, Uşak illeri ile birlikte Konya'nın Akşehir, Beyşehir, Doğanhisar, Ilgın ilçeleri 1974 yılından itibaren kapsülde çizim yasağı konulmuş ve afyon üretimi durdurulmuştur. Çizilmemiş haşhaş kapsülleri ofis tarafından satın alınmıştır. 1977 yılında 72000 hektara ulaşan ekim alanı 10000 hektara düştüğü görülmüştür (T.M.O., 2013).

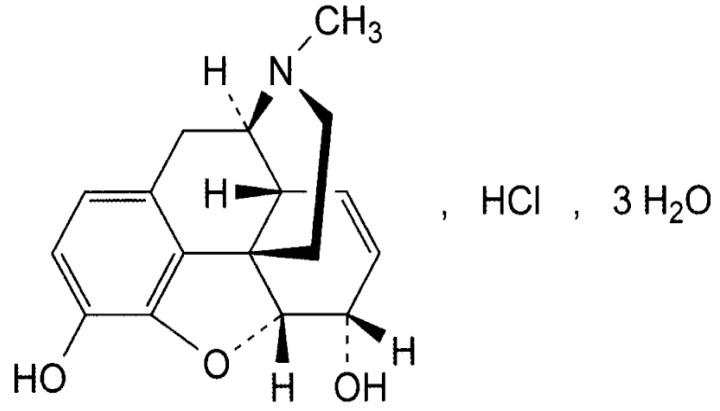
3.6.1986 tarih 3298 kanun ve yönetmeliklere, lisansa bağlı ve kontrollü ekimi yapılan haşhaş tarımı düzenlenmiştir. 13.4.1987 tarih 87 – 11703 sayılı kararla T.M.O bakanlar kurulu tarafından tespit edilen yerlerde lisansa bağlı ekimleri yaptırma, uygulama ve pazarlama işleri için görevlendirilmiştir. Çizilmemiş haşhaş kapsüllerinin işlenebileceği bir tesis kurmak için 16.9.1974 , 7 \ 9887 sayılı bakanlar kurulu kararıyla 1974 yılında Alman Knoll A.G. firmasına ihale edilmiş, 1976 yılında Afyon Alkaloidleri Fabrikası'nın temelleri Bolvadin'de atılmıştır (Küçük, 1996). Deneme üretimine 1981 tarihinde başlamış 1987 tarihinde fabrika türk mühendis ve teknisyenlerine teslim edilmiştir.

Halen Toprak Mahsulleri Ofisi'ne bağlı olarak çalıştığı görülmüştür. Fabrika yılda 20 bin ton haşhaş işleme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir Baz morfin ünitesinde kuru ham morfin üretimi yapılmakta olup, türevler fabrikasında ham morfenden yola çıkılarak morfin, morfin hidroklorür, kodein, kodein fosfat, morfin sülfat, etil morfin hidroklorür, kodein sülfat, kodein hidroklorür üretimi yapılmakta ve farmakopilere uygun hale getirilip satışa sunulmuştur (T.M.O yayınları, 2013) (Tablo 2.1). Ürünlerin % 90'ı aşan kısmı yurt dışına ithal edilir. 1927'de 112 ton afyon üretimi, 1950'de 57 ton afyon üretimi, 1986'da haşhaş ekim alanı 5.404 hektar, üretilen haşhaş kapsülü 3.538 ton olduğu tespit edilmiştir. 1984'de ABD'ye 2.484 kg afyon ihraç edilmiş, 566.800 dolar döviz sağlanmıştır (T.M.O., 2013). 1986'da haşhaş ekim alanı 5.404 hektar, üretilen haşhaş kapsülü 3.538 ton olmuştur. 1991'de afyon üretimi 22.578 ton olmuştur (T.M.O yayınları, 2013). Afyon kapsül üretiminin yarısını karşılamakta, onu Konya, Denizli, Uşak, Isparta, Burdur, Kütahya takip ettiği belirtilmiştir (T.M.O., 2013). 1974 yılında 20000 hektar haşhaş ekim alanı, 1995 yılında 70000 hektar haşhaş ekim alanına yükseltilmiştir.

Çizelge 2.1. Haşhaşta bulunan en önemli alkaloidler

Adı	Formülü	Bulan	Tarih
Morfin	$C_{17}H_{19}O_3N$	Sertümer	1816
Noskapin	$C_{22}H_{23}O_7N$	Robiquet	1817
Kodein	$C_{18}H_{21}O_3N$	Robiquet	1832
Narsein	$C_{23}H_{27}O_8N$	Pelletier	1832
Tebain	$C_{19}H_{21}O_3N$	Merck	1835
Psedomorfin	$(C_{17}H_{18}O_3N)_2$	Smiles	1835
Papaverin	$C_{20}H_{21}O_4N$	Hesse	1848
Kriptopin	$C_{21}H_{25}O_5N$	Hesse	1864
Roadin	$C_{21}H_{21}O_6N$	Hesse	1867
Lantopin	$C_{23}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Mekonidin	$C_{21}H_{23}O_4N$	Hesse	1870
Kodamin	$C_{20}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Lavdanin	$C_{20}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Lavdonasin	$C_{21}H_{27}O_4N$	Hesse	1871
Hidrokotarnin	$C_{12}H_{15}O_3N$	Hesse	1871
Oksinarkotin	$C_{22}H_{23}O_8N$	Becket and Wright	1876
Protepin	$C_{20}H_{19}O_5N$	Hesse	1878
Ksantalin	$C_{20}H_{19}O_5N$	T&Smith	1893
Papaveramin	$C_{21}H_{25}O_6N$	Hesse	1903
Aporein	$C_{18}H_{16}O_2N$	Pavesi	1905
Neopine	$C_{18}H_{21}O_4N$	T&Smith	1911
Porfidroksin	$C_{19}H_{23}O_4N$	Rakshit	1919
Narkotolin	$C_{21}H_{21}O_7N$	Wrede	1937

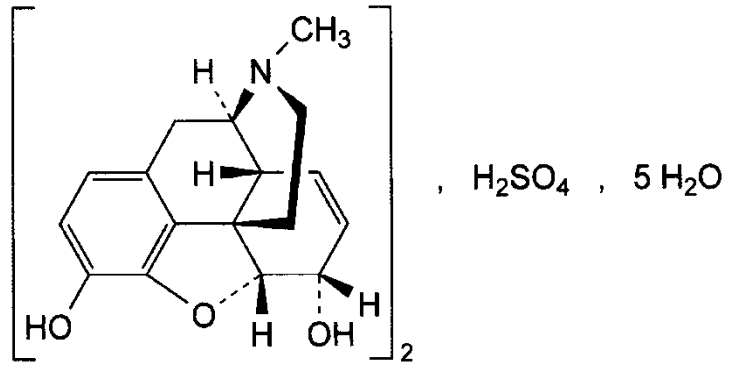
Çizelge 2.2. Afyon alkaloidleri fabrikasının'da üretilen türevler



Morfin Hidroklorür

Kimyasal formülü: C₁₇H₂₀ClNO₃H₂O

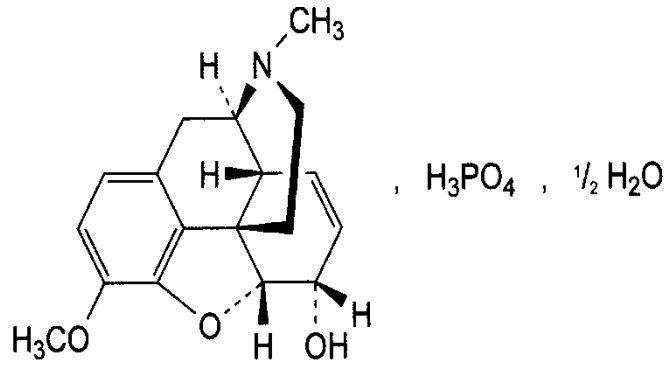
Görünüm: Beyaz kristalli toz



Morfin Sülfat

Kimyasal formülü: C₃₄H₄₀N₂O₁₀S,5H₂O

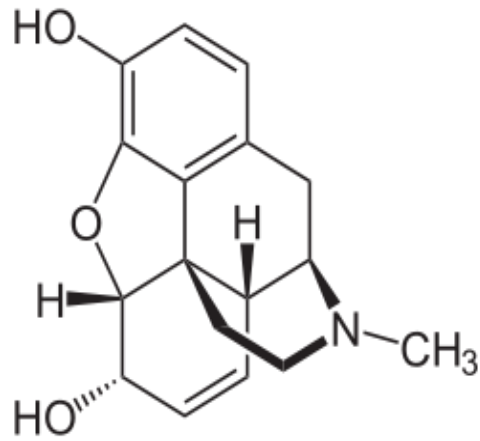
Görünüm: Beyaz kristalli toz



Kodein Fosfat

Kimyasal formülü: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$

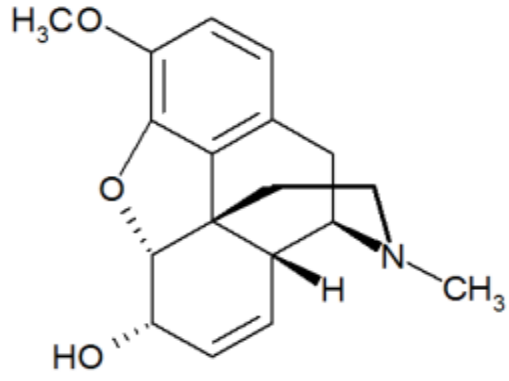
Görünüm: Beyaz kristalli toz



Morfin

Kimyasal Formülü: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$

Görünüm: Açık kahverengi veya sarı kristalli toz



Kodein

Kimyasal Formülü: $C_{18}H_{21}NO_3$

Görünüm: Beyaz kristalli toz

2.2. Alkaloid Hakkında Genel Bilgiler

Almancada alkaloide, Fransızcada alcaloide, İngilizcede alkaloid olarak tanımlanmıştır. Alkaloit ismi ilk kez 1805 yılında morfinin baz karakterinde olduğunu gösteren Saturner'den sonra Meissner tarafından teklif edilmiştir. Alkaloit kelimesi alkali benzeri (alkalimsi) anlamına geldiği belirtilmektedir. Kimyasal adlandırılması sonunda bulunan amin grubundan dolayı -in kullanılarak yapılmıştır (T.M.O., 2013). Doğal olarak birçok bitki türünde ve yalnızca birçok hayvanda bulunan yapısındaki karbon, hidrojen ve azot atomlarının varlığıyla nitelenen organik maddeler sınıfında yer aldığı belirtilmiştir.

Alkaloitler genellikle şu özelliklere sahiptir:

- 1-Bitkisel kaynaklıdır. Çok azı hayvani kaynaklıdır.
- 2-Zayıf baz özelliğindedirler. Bundan dolayı amonyak benzeri bir karakter göstererek asidlerle tuz yaparlar.
- 3-Azot ihtiva ederler.
- 4-Çok küçük miktarları bile insan ve hayvanlar üzerinde güçlü fizyolojik etkileri vardır .

Alkaloidler genelde katı ve renksiz olup, zatk şeklinde ve renkli olanlarıda bulunmuştur. Hakiki alkaloitlerin zehirli oldukları tespit edilmiştir. Molekül yapıları oldukça karmaşık olan alkaloitlerde genellikle amin yapısı içinde en az bir azot atomu bulunduğu yapılardan oluşmaktadır (/kto, 2014).

Azota karbon ve hidrojenden oluşan hidrokarbon grupları bağlanmıştır ve amin yapısı çoğu kez azot ya da hidrokarbon grupları üzerindeki halkalı bir yapının içinde bulunmakta olduğu görölmüştür. Bugün bin dolayında alkaloit çeşidinin olduğu bulunmuştur. Daha çok bitkilerin patlıcangiller (*soeleneceae*), gelincikgiller (*papaveraceae*), kökboyalarıgiller (*leguminoceae*) familyalarında, gülgiller, buğdaygiller (*graminaceae*), nanegiller (*labitae*), topluçiçekgiller (*compositae*) familyalarındaki cinslerininde bulunduğu belirlenmiştir.

İhtiva ettikleri kimyasal halkalara göre kinolin, izokinolin, piridin alkaloidleri olarakta adlandırılmışlardır. Alkaloid ihtiva eden bitkiler denilince % 0,01 oranından fazla alkaloid içeren bitkiler olduğu anlaşılmıştır (kto, 2014).

İnsanlar alkaloidleri çok uzun yıllardan beri iksir, ilaç, sıcak içkiler, yara lapası, zehir olarak kullanmışlardır. Bazı alkaloidlerin fizyolojik etkileri günümüzde açıkça bilinmektedir. Kinin, sıtma hastalığının tedavisinde, morfin ise şiddetli ağrıların giderilmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Alkaloidlerin çoğu, büyük ve küçükbaş hayvanlar ile insanda zehirlenmelere yol açtığı belirlenmiştir. Örneğin, Crotalaria ve Heliaoropium türlerinde bulunan bir alkaloid sürekli alındığında karaciğer sirozuna neden olduğu tespit edilmiştir.

Alkaloidlerin fizyolojik etkileri tıpta büyük önem taşımıştır. Ağrı kesici olarak kullanılan alkaloidler, haşhaştan üretilen morfin ve türevlerinin olduğu da tespit edilmiştir. Bunlardan, kodein genellikle alışkanlık yapmaz, ancak diasetil morfin veya eroin bağımlılık yaptığı belirlenmiştir. Kinidin alkaloidlerinden kinkona kalp atışlarını düzenleyen bir kalp uyarıcısı olduğu bulunmuştur. Nikotin, sitisin ve konin ise solunum uyarıcı olarak kullanılmıştır. Ancak baldırandan elde edilen ve zehirli olan konin fazla kullanıldığında solunum yollarını felç ederek ölüme yol açtığı tespit edilmiştir. Efedrin özellikle nezle, soğuk algınlığı, saman nezlesi ve bronşiyal astım gibi hastalıklarda çok sık kullanılan ilaçların bileşiminde bulunduğu belirtilmiştir. Yerel uyuşturucu etkisi olan kokainin istenmeyen yan etkileri olduğu için, genellikle molekül yapısında değişiklik yapılarak elde edilen türevleri daha güvenli ve etkin biçimde kullanılmaya devam edilmiştir. Kas gevşetici alkaloidlerin en iyi bilinen örneklerinden biri, Güney Amerika yerlilerinin ok zehri olarak kullandıkları belirlenmiştir (T.M.O., 2013).

Alkaloidlerin alınma miktarları da önem taşımıştır. Az miktarı ilaç olarak fayda sağlayan alkaloidlerin, çoğunun aşırı miktarı öldürücü olmuştur. Mesela, striknin in az miktarı solunum ve dolaşım sistemleri üzerinde uyarıcı etki gösterip kişiye ferahlık sağlarken, çok miktarı solunum felci ve dolayısıyla ölüme neden olduğu tespit edilmiştir. Striknin günümüzde köpek zehri olarak kullanılmaya devam ettiği görülmüştür.

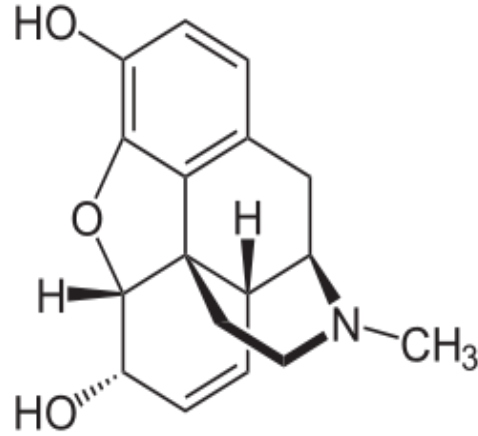
2.2.1 Alkaloidlerin kimyasal sınıflandırılması

1. Protopine alkaloidleri
 - 1.1 Allocryptopine
 - 1.2 13-oxycryptopine
 - 1.3 Protopine
 - 1.4 Dihidroprotopine
2. Narceine tip alkaloidler
 - 2.1 Naeceine
 - 2.2 Narceinane
 - 2.3 Narceine imide
3. Phthalideisokinolin alkaloidleri
 - 3.1 Narhotin
 - 3.2 Narkotolin
4. Benzol phenonthrindin alkaloidleri
 - 4.1 Sanguinarin
 - 4.2 Norsanguinarin
 - 4.3 Dihidrosanguinarin
 - 4.4 Oksisanguinarin
5. Morfin alkaloidleri
 - 5.1 Morfin
 - 5.2 Kodein
 - 5.3 Tebain
 - 5.4 Oripavin
 - 5.5 Neopin
 - 5.6 Pseudomorfin
 - 5.7 Salutaridin
 - 5.8 Somniferin
 - 5.9 Morfin N –oksid
 - 5.10 Kodein N – oksid
6. Benzilzokinolin alkaloidleri
 - 6.1 Papaverin
 - 6.2 Laudanosin
 - 6.3 Kodamin

- 6.4 Palaudin
- 6.5 Laudanin
- 6.6 Retikulin
- 7. Aporfin alkaloidleri
 - 7.1 İzoboldin
 - 7.2 Corytuberin
 - 7.3 Magnoflorin
- 8. Protoberberin alkaloidleri
 - 8.1 Berberin
 - 8.2 Canadine
 - 8.3 İsocorypalmine
 - 8.4 Coptisine
 - 8.5 Scoulerine
 - 8.6 Stephalidine
- 9. Papaverrubin alkaloidleri
 - 9.1 Porphyroxine –papaverrubin
 - 9.2 Papaverrubin C
 - 9.3 Papaverrubin B
 - 9.4 Glaudin

2.2.2 Başlıca alkaloidler ve özellikleri

2.2.2.1. Morfin



Şekil 2.6. Morfin'in kimyasal yapısı

1804'te Seguin tarafından keşfedilmiş, 1806 da Alman kimyacı F.W.A Sertürner tarafından afyondan elde edilmiştir. Amonyaklı bir eriyik yardımıyla afyondan morfini ayırmış, hayvan deneyleri sonucu bu maddenin uyku verdiğini bulmuş, yunan mitolojisinde uyku tanrısının adından esinlenerek morfin adını vermiştir. Sertürner 1812 yılında morfinle yaptığı araştırmalarında afyonun analizi adı altında yayınlamıştır (narkotik, 2014).

Morfinin afyondan çözelti halinde elde edilmesi, buharlaştırma ve kalsiyum klorür çözeltisi ile yeniden çözme işlemlerini yapmayı gerektirmiştir. Bu çözeltinin ayrılmasından sonra sıvı kısım birkaç kez buharlaştırılır ve geride kalan morfin ve kodein kristalleri toplanmıştır. Bunlar amonyak yardımıyla çözdürüldükten sonra yeniden kristalleştirme işlemi yapılmıştır. Böylece morfinin çözeltide kalan kodeinden ayrıldığı görülmüştür. Elde edilen morfin kristallerinin renksiz ve kokusuz olduğu görülmüştür. Morfinden eroïn, pentazoin ve oksikodon gibi birçok yarı sentetik madde elde edilebileceğide görülmüştür.

Morfinin 1 molekül su ile iğnemsı kristaller halinde kristalleştiği görülmüştür. Molekül suyunu 120° C de kaybetmektedir. Birisi fenolik, diğeri alkol grubu olmak üzere 2 tane hidroksil grubu olduğu tespit edilmiştir. Bu özelliği morfini diğer alkaloidlerden ayırmıştır. Fenolik grup metillenerek kodein elde edilmiştir. Bilimsel adlandırılması 7,8 didehidro -4,5 -epoksi - 17-metilmorfinan 3,6-diol'dür. Kapalı formülü $C_{17}H_{19}O_3N$ (Şekil 2.6) dir. Molekül ağırlığı 285,33 dür. Erime noktası 254 ° C' de bozunarak erimektedir. C % 71,56; O % 16,82; N % 4,91; H % 6,71 içerdiği bulunmuştur (Merck Index, 1976).

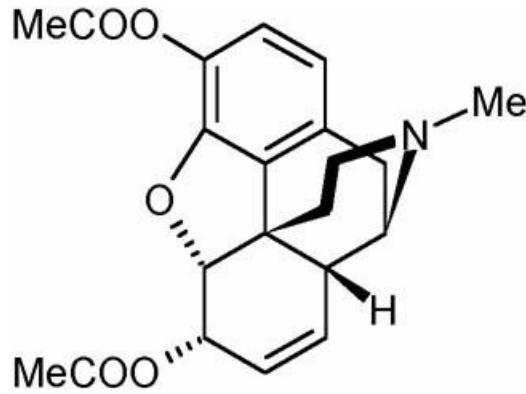
Tıpta hidroklorür, sülfat, asetat, tartarat tuzları olarak kullanılmıştır. Morfin hidroklorür, beyaz, ince, uzun kristaller şeklinde olduğu belirlenmiştir. Suda % 25 oranında, alkol ve gliserinde kolay eridiği görülmüştür. Morfinin türevleri, apomorfin, dihidromorfin ve normorfin olduğu bulunmuştur. Windholz ve arkadaşları (1983) tarafından verilen bilgiye göre apomorfinin kapalı formülü $C_{17}H_{17}NO_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 267,31'dir. Dihidromorfinin kapalı formülü $C_{17}H_{21}NO_3$ tür. Molekül ağırlığı 287, 35'tir. Manske (1977) tarafından bildirildiğine göre Santavy normorfinin kapalı formülünü $C_{16}H_{17}NO_3$ olarak, molekül formülünü de 271,3 olarak belirtilmiştir. Ayrıca etilmorfin, dihidrokodein de tıpta kullanılan türevleri olarak ta bilinmektedir. Apomorfin zehirlenmeler de kusturucu olarak verilmiştir. Günümüzde yapay organik morfin bileşikleri (meperdin, metadon, pentazosin) tümüyle morfinin yerini almıştır.

Morfin, genellikle narkotik ve ağrıkesici olarak kullanılmıştır. Ağrı kesici özelliği yönünden en etkili doğal bileşik olduğu tespit edilmiştir. Özellikle böbrek taşları, kanser metastazlarının neden olduğu ağrılarda, yani başka ağrı kesicilerin etkisiz kaldığı durumlarda kullanıldığında büyük yarar sağladığı görülmüştür. Travmaya bağlı şok, iç kanama, kalp yetmezliği ve tifo gibi vücudun aşırı derecede yıpranmasına neden olan hastalıklarda hastayı sakinleştirmek için verilmiştir. Hızlı etki sağlamak amacıyla kas içine şırınga edilerek uygulanırsa da, mukozalarda çok çabuk kana geçtiğinden ağız yoluyla alınımı sağlanmıştır (Lee S., 2010).

Morfin öföri adı verilen nedensiz taşkınlık ve neşe haline neden olur, solunum, dolaşım ve sindirim sistemlerinde birçok istenmeyen etkisi varlığı tespit edilmiştir. Merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisiyle kusmaya ve belli bir dozun üstünde alındığında depresyona neden olduğu görülmüştür.

Çok kolay bağımlılık yapmış. Sakinleştirme gibi aranan etkiler ortadan kalkar, son şırıngadan 12 saat sonra esnemeler, iç daralması, bedensel çırpınmalar, burun, gözyaşı ve terde aşırı artma, uykusuzluk, kas krampları ve ishal görülmüştür. Kalp ve damar bozuklukları ortaya çıkar ve ölüme neden olduğu tespit edilmiş. Katlanması çok zor olan bu etkiler morfinman tedavi olmaya karar vermedikçe morfin ya da benzerlerde birini yeniden almaya yöneltmiştir. Bu bağımlılık morfinin tedavide yalnız akut sancılı durumlarda, kanser ağrılarında ve akciğer ödemlerinde kullanılmasına neden olmuştur (Lee S., 2010).

Eroin; morfinin yarı sentetik bir türevi olduğu belirlenmiştir. Kimyasal yapısı, diasetilmorfin Hidroklorürdür (Şekil 2.7) (narkotik.iem).



Şekil 2.7. Eroin'in kimyasal yapısı

İlk olarak Almanya'da Bayer firmasında çalışan kimyacı Dresser tarafından elde edilmiştir (narkotik, 2014).



Şekil 2.8. Toz eroin

Baz morfinin, asetik asit ile birlikte ısıtılması ve diğer kimyasal işlemlerden sonra oluştuğu ve bileşiminde asetik asit olduğu için sirke gibi koktuğu görülmüştür. Saf halde iken beyaz, suda eriyen bir toz olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.8) (Kırklareli.iem, 2014). Katkı maddeleri ilave edilince gri, koyu gri, kahverengimsi gri, fildişi, kahverengi renklerde, tozşeker gibi küçük kristaller halinde veya un gibi toz halinde olduğu görülmüştür. Bir doz eroinde (100 mg) % 10 eroin, % 90 şeker, nişasta, süttozu, kinin gibi katlı maddeleri bulunmuştur. Uyuşturucu maddelerin en tehlikelisi olduğu belirtilmiştir. Morfinden 2 - 10 kat daha kuvvetli ve daha güçlü analjezik etkilerine rastlanılmıştır (narkotik, 2014).

Morfinin türevleri:

Diamorfin (diacetylmorfin, eroin) $C_{17}H_{17}NO_3(COCH_3)_2HCL$

Etil morfin ($C_{19}H_{23}O_2N$)

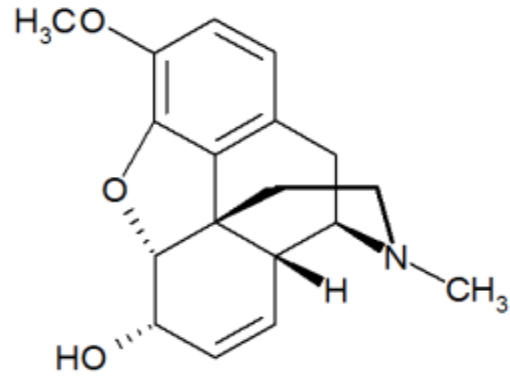
Apomorfin ($C_{17}H_{17}O_2N$)

Dihydromorfin ($C_{17}H_{19}O_3N$)

Dihidrokodeinon

Metilddihidromorfinon
Nalorfin
Kodein
Neopin
Tebain
Narkotin
Narcein
Papaverin
Kodamin
Laudanosin
Laudanin
Pseudolaudanin
Kryptopinme ve protopin

2.2.2.2. Kodein



Şekil 2.9. Kodein'in kimyasal yapısı

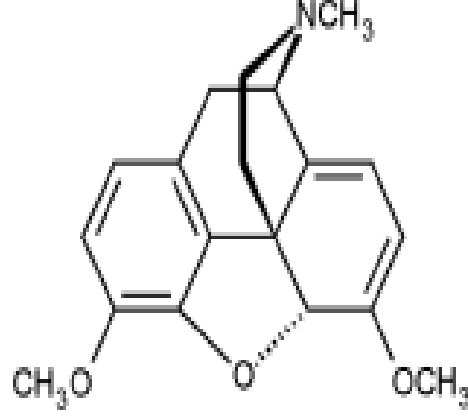
Fransızcada codeine, Yunancada kodeia olarak geçtiği bilinmektedir. Renksiz beyaz kristaller ya da toz şeklinde olduğu bulunmuştur. 1832 tarihinde Fransız kimyager Pierre –Jean Robiquet tarafından izole edilmiştir (narkotik, 2014).



Şekil 2.10. Kodein örnekleri

Bilimsel adlandırılması 7,8 –didehidro -4,5 α –epoksi-3 –metoksi-17 metil morfinan-6 α -ol ‘dür. Morfinin bir metil eteri olarak belirlenmiştir (Şekil 2.9). Kapalı formülü $C_{18}H_{21}NO_3$ tür. Molekül ağırlığı 299,36’dır. Erime noktası 154 °C’dir. % C 72,22 ; % H 7,07; % N 4,68; % O 16,03 içerdiği bulunmuştur. Kodein, morfin metilleşerek sentetik olarak ta elde edilmiştir. Metil morfin olarak da adlandırılmıştır. Haşhaşın olgunlaşmamış kapsüllerinden çıkan sıvıdan elde edilebilirse de ilaç olarak kullanılan kodein genellikle morfinden elde edilmiştir. Tıpta, sülfat ve fosfat tuzları halinde kullanılmaya devam etmiştir (Şekil 2.10). Kimyasal yapı bakımından fenantren grubundan olduğu tespit edilmiştir. Uyuşturucu etkisi nedeniyle ilaç olarak dağıtımı resmi kuruluşlar tarafından yapılmaya devam etmiştir. Öksürük yatıştırıcı olarak da kullanıldığı belirtilmiştir. Bağımlılık yapma özelliği morfine göre az olduğu görülmüştür. Solunum yollarında kuruluğa neden olduğu belirlenmiştir. Morfine göre daha az zehirliliği belirtilmiştir. Analjezik tesiri azdır ama diğer ilaçlara katılınca analjezik etkiyi arttırmıştır. Uyuşturucu olmayan ağrı kesici olarak ağızdan verilebileceği gibi deri altına şırınga edilerek de yatıştırıcı etkisinden yararlanılmaya çalışılmıştır (Küçük,1996) .

2.2.2.3. Tebain



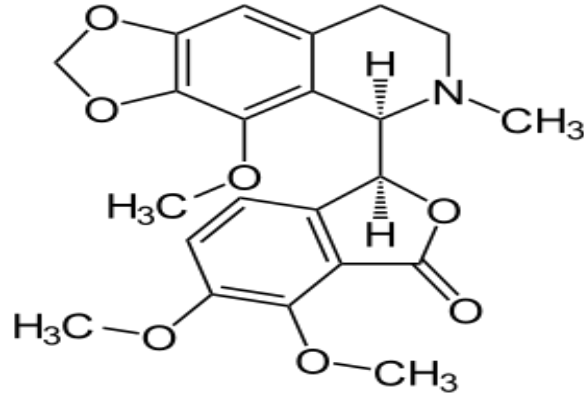
Şekil 2.11. Tebain'in kimyasal yapısı

Fransızca da thébaine olarak geçmekte olduğu bilinmektedir. Thiboumery tarafından 1835 tarihinde bulunmuştur. İsmi eskiden afyon ihraç eden Mısır şehri Teb'den gelmiştir. Önceden morfinin bir izomeri zannedilmiştir ve adına paramorfin denilmiştir.

Bilimsel adlandırılması 6,7,8,14 - tetrahidro – 4,5 α -epoksi -3,6 –dimetoksi –izometil morfinandır (Şekil 2.11). En zehirli afyon alkaloididir, medikal amaçlı kullanılmazlardır. Apaver Somniferumdaki en az fenantren alkaloid olduğu tespit edilmiştir. Medikal amaçlı kullanılan; hidrokodon (dihidrokodon), asetildihidrokodein ve oksikodon (dihidrohidroksi kodeinon)'a dönüştürülebilmiştir. Afyona göre, daha çözünabilir olan afyon alkaloidleri karışımı hazırlanmasında kullanılmıştır. Ağrı kesici etkisi azdır, sara nöbetine benzer bir etki yaptığı görülmüştür. Son yıllarda, analjezik, antitussif ve yatıştırıcı özelliklere sahip yarı sentetik ilaçların üretiminde tebaine olan ilgi artmıştır. Kodein üretimindeki artıştan dolayı endüstride hammadde olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Kapalı formülü $C_{19}H_{21}NO_3$ 'tür. Molekül ağırlığı 311,37 g/mol'dür. Erime noktası 193 °C'dir. C % 73,29; H % 6,80; O % 15,42; N % 4,50 içerdiği bulunmuştur. Tebain oranı en fazla % 5 olarak Indochina'daki bazı örneklerde bulunmuştur. İran örneklerinde tebain oranı yüksek olduğu tespit edilmiştir (Lee S., 2010).

2.2.2.4. Noskapin



Şekil 2.12. Noskapin'in kimyasal yapısı

1816 tarihinde Robiquet tarafından izole edilmiştir. Afyonda % 2-9 oranında bulunmuştur. Eskiden narkotin olarak bilinirdi, günümüzdeki ismi naskopin olarak bilinmektedir.

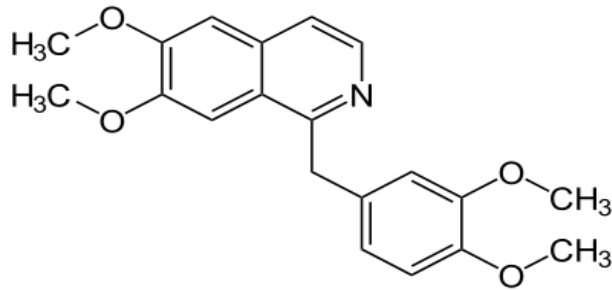
Bilimsel adlandırılması 1- α -2 -metil - 8-metoksi -6,7 -metilendioksi -1- (6,7 - dimetoksi -3-ftalidil) -1,2,3,4 -tetrahidroizoquinolin'dir. Kapalı formülü $C_{22}H_{23}NO_7$ ' dir (Şekil 2.12). Molekül ağırlığı 413,43 g/mol'dür. Erime noktası 176 °C'dir. C % 63,91 ; H % 5,61 ; N % 3,39 ; O % 27,09 oranında içerdiği bulunmuştur.



Şekil 2.13. Noskapin örnekleri

Önceleri morfin gibi narkotik sanılmış bu yüzden ismi narkotin konulmuştur. Antitussif özellikleri keşfedilince ismi naskopin olarak değiştirilmiştir. Antitussif özellikleri kodeine eşdeğer olduğu görülmüştür. Öksürük kesici olduğu belirtilmiştir. Bağımlılık yapmaz, ağrı kesici ve uyuşturucu olmadığı görülmüştür. Toksik özelliği olmadığı belirlenmiştir. Öksürük yatıştırıcı etkisinden dolayı baz ya da tuz halinde (kromsülfonat) olarak kullanıldığı görülmüştür. Benzilizokinolinlerin bir üyesi olmuştur (Şekil 2.13). Antitussif özellikleri nedeniyle ilaç olarak kullanılmıştır. Yüksek dozlarda histamin salınmasına yol açabilir, bu nedenle bronşiyal astım olan hastalarda mümkün olduğunca kullanılmamıştır (wikipedia, 2014).

2.2.2.5. Papaverin



Şekil 2.14. Papaverin'in kimyasal yapısı

Papaverin kelimesi Fransızca papaverineden gelmiştir. Merck tarafından 1848 tarihinde bulunmuştur. Morfin ekstraksiyonun ana çözeltisinden izole edilmiştir. Bilimsel adlandırılması: 6,7 –dimetoksi -1 veratril izokinolin şeklindedir (Şekil 2.14). Medikal amaçlı kullanımlarıda bilinmektedir. Sentetik olarak da üretilmiştir (Şekil 2.15). İlaçlarda kullanımı izolasyonunun çok zor olmaması ve afyondaki miktarı yüzünden benzilizokinolin grubunda önemli bir yeri olduğu görülmüştür.

Klor hidratı düz kaslarda spazm giderici, teofilin ve teobramin gibi kardioremal idrar söktürücülerle birlikte tansiyon düşürücü ve damar genişletici olarak kullanılmaya devam etmiştir. Uyuşturucu ve ağrı kesici özelliği yavaş olduğu görülmüştür. Haşhaş kapsülünün tüm kısımlarında, özellikle ham kapsüllerinde bulunmuştur. Kapsülde papaverin miktarı % 0,5–1 oranında olup uyuşturucu etkisinin fazla olmadığı görülmüştür (wikipedia, 2014).



Şekil 2.15. Papaverin örnekleri

Kapalı formülü $C_{20}H_{21}NO_4$ 'dür. Molekül ağırlığı 339,38 g/mol dür. Erime noktası 147 °C'dir. C % 70,78; H % 6,24; N % 4,13; O % 8,86 (Merck Index, 1976) oranları bulunmuştur. İran numunelerinde bu oranların çok olduğu görülmüştür. Hindistan ve Afganistan numunelerinde ise bu oranlara az rastlanılmıştır.

2.3. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, çözeltilerden, katı karışımlardan bir maddeyi ayırmak ve çözünen, istenmeyen safsızlıkları karışımlardan uzaklaştırmak için yapılan bir işlem olarak tanımlanmıştır (Yalçın, 2004). Kimyada bilinenin aksine bir saflaştırma değil ayırma yöntemi olarak kullanılmaktadır. Kelime anlamı, *çekip çıkarma, çekip almadır*. Dört şekli vardır:

1. Çözeltilerden yapılan ekstraksiyonlar
2. Kimyasal etkileşmeye dayanan ekstraksiyonlar
3. Sürekli çekmeye dayanan sıvı-sıvı ekstraksiyonları
4. Katılardan yapılan ekstraksiyonlar

2.3.1. Çözeltilerden yapılan ekstraksiyonlar

Birbiriyle karışmayan iki sıvının çalkalanarak bir sıvıda bulunan maddelerin diğer sıvıya geçirilmesiyle yapılan ekstraksiyon işlemi olarak belirtilmiştir. Çözeltilerden yapılan ekstraksiyonların esasını Nerst'in dağılma kanununa dayandırılmaktadır. Buna göre, bir madde birbiriyle karışmayan iki sıvının bulunduğu ortama konup çalkalandıktan sonra dengeye gelmesi beklenildiğinde, maddenin iki çözücü arasındaki dağılma oranının sabit bir değer olduğu bulunmuştur. Örneğin, bir tüpe eter, su ve her ikisinde de çözünen bir madde konulduğunda, belli bir süre sonra bu iki maddenin, her iki çözücüde de çözünen miktarlarının oranının sabit olduğu belirtilmiştir (Yalçın, 2004). Bu sabiteye K dağılma sabitesi denilmektedir.

$$K = \frac{C_{\text{ÜST}}}{C_{\text{ALT}}} \quad (2.1)$$

$C_{\text{üst}}$ = Üst fazdaki madde

C_{alt} = Alt fazdaki madde

Nerst'in dağılma kanunu, bir limit değerini bildirmektedir. Ancak çok seyreltik çözeltilerde bu değer geçerli olabilmektedir. Ortamda disosiyasyon, assosiyasyon, kompleksleşme gibi durumlar varsa aradaki orantı bu kadar basit değildir, daha detaylı inceleme ihtiyacını göstermiştir.

Organik maddelerin genellikle organik çözücülerde sudakinden daha çok çözüldükleri gözlenmiştir. Bundan yararlanarak organik maddeler, sulu çözeltilerden bir organik çözücüyü çekebilir. Sulu çözeltiye elektrolit maddeler (CaCl_2 , NaCl) ilave edilirse organik maddenin sulu fazdaki çözünürlüğü daha da az olduğu görülmüştür. Genellikle eter, kloroform, benzen, karbontetraklorür, petrol eteri gibi organik çözücüler kullanılmıştır. Hangi çözücünün kullanılması gerektiği ise ekstraksiyonu yapılacak maddenin çözücüdeki çözünürlüğü ve sonradan yapılacak olan kristalizasyon ya da distilasyona uygun olup olmadığına göre saptanması gerekmektedir (Yalçın, 2004).

Ekstraksiyonda, hem organik maddeyi ayırabilmek hem de fazla çözücü harcamamak amaçlanmıştır. Belli miktar çözücünün hepsini bir defa bir ekstraksiyonda mı yoksa aynı miktarı birkaç defa mı kullanmak gerektiğini şu şekilde açıklayabiliriz:

M_0 g madde içeren V mL sulu çözeltiden X mL organik çözücü ile yapılan ekstraksiyonda sulu fazda M_1 g madde kalsın. Dağılma kanununa göre aşağıdaki eşitlikler yazılabilir:

$$\frac{M_1/V}{M_0 M_1/X} = K \quad \text{veya} \quad M_1 = M_0 \frac{KV}{KV+X} \quad (2.2)$$

Aynı miktar, X mL organik çözücü kullanarak ikinci bir ekstraksiyon yapılırsa sulu fazda kalan M_2 g madde için aşağıdaki eşitlikler yazılabilir:

$$\frac{M_2/V}{(M_1M_2)/X} = K \text{ veya } M_2 = M_1 \frac{KV}{KV+X} = M_0 \left(\frac{KV}{KV+X} \right)^2 \quad (2.3)$$

Aynı işlem n defa yapılırsa su fazında kalan madde miktarı M_n :

$$M_n = M_0 \left(\frac{KV}{KV+X} \right)^n \quad (2.4)$$

2.3.2. Kimyasal etkileşmeye dayanan ekstraksiyonlar

Bu tür ekstraksiyonda ayrılacak madde, ekstraksiyon çözeltisi ile kimyasal bir reaksiyon vermektedir. Bu tür bir işlem, karışımlardan bileşenleri ayırmak veya organik madde içindeki safsızlıktan uzaklaştırmak için uygulanmıştır. Örneğin, organik bir çözücü içinde çözünmüş bulunan birkaç madde içindeki organik bir asidin, inorganik bir bazın sulu çözeltisi ile organik bir reaksiyon sonunda tuzunu oluşturarak sulu faza geçmesi sağlanmıştır. Aynı işlemler tersi için de söz konusu olabilmektedir. Seyreltik asit çözeltileri de aynı özelliğe dayanarak organik bazların ve bazik safsızlıkların ekstraksiyon ile uzaklaştırılması için kullanılabilir. Seyreltik sodyum hidroksit, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat çözeltileri organik asitleri ve asidik safsızlıktan; seyreltik hidroklorik asit veya sülfürik asit çözeltileri de organik bazları ve bazik safsızlıktan organik çözücülerdeki çözeltilerinden ekstraksiyon ile ayırma işlemi için kullanılmaktadır.

Ekstraksiyon işleminin esası, asit ve baz'dan oluşan tuzun organik fazda çözünmemesine ve suda çözünmesine dayandırılmıştır. Sulu fazdaki tuz yapısındaki madde, asit ise seyreltik asit ile; baz ise seyreltik baz ile muamele edilerek tuz yapısından kurtarılmıştır. Derişik soğuk sülfürik asit, doymamış hidrokarbonları doymuş hidrokarbonlardan, alkol ve eterleri alkil halojenürlerden ekstraksiyon ile ayırmaya yarayan bir metod olarak belirtilmiştir (Yalçın, 2004).

2.3.3. Sürekli çekmeye dayanan sıvı-sıvı ekstraksiyonları

Organik maddeler için suda organik çözücülerden daha fazla çözündüklerinde veya bir katı fazda bulunup organik çözücülerde az çözündüklerinde sürekli ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu yolla daha az çözücü kullanarak, çözünürlük organik çözücünün aleyhine olduğu halde fazla miktarda madde kazanıldığı gözlenmiştir.

Ekstraksiyon sıvı-sıvı arasında söz konusu olacaksa yani madde sudan ekstre edilecek ise kullanılacak organik çözücünün sudan hafif veya ağır oluşuna göre farklı ekstraksiyon düzenekleri kullanımını ihtiyacını gerektirmiştir. Her iki düzenek de,

- soğutucu,
- organik maddeyi içeren sulu fazın ve sudan hafif veya sudan ağır ekstraksiyon çözücüsünün bulunduğu balon ve
- ekstre edilen organik madde çözeltisinin toplandığı balondan oluşturulmuştur.

Organik maddeyi içeren çözücü sudan farklı bir çözücü de olabilmektedir. Unutulmaması gereken önemli nokta, iki çözücünün birbiri ile karışmaması olmalıdır. Her iki düzenekte de balonda kaynayan ekstraksiyon çözeltisi soğutucuda yoğunlaşarak organik maddeyi içeren faz, içinden damlalar halinde geçer ve tekrar balona dönmektedir. Böylece devam eden ekstraksiyon işleminde, süre geçtikçe balonda kaynayan organik çözücü içine geçen organik madde miktarının arttığı gözlenmiştir (Yalçın, 2004).

2.3.4. Katılardan (Droglardan) yapılan ekstraksiyonlar

Ham drogun, uygun çözücü içinde belirli şartlarda muamele edilmesi ile yapılan ayırma işlemi olduğu belirtilmiştir. Burada, droglardan bir sıvı yardımıyla etken madde veya maddelerin çekilip alınması kastedilmiştir. Ekstraksiyonun ilk kullanılışı maserasyon şeklinde olmuştur.

Katı droglarda etken maddeler hücre içinde bulunmaktadır. Drog, çözücü içine atıldığında çözücü difüzyon olayı ile hücre içine girer ve içindeki etken maddeyi çözer, hücre gerilir ve çeperi patlatmaktadır. Sıvının hücre içine girmesi çeper parçalanmadan önce yavaştır, olayın hızlanması için çeperi parçalamıştır.

Uygulama biçimlerine göre droglardan yapılan ekstraksiyon; maserasyon, dijestiyon, infüzyon, dekoksion, perkolasyon, soxhelet apareyi ile yapılan sürekli ekstraksiyon olarak belirtilen yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

Maserasyon: Drogun çözücü sıvı ile 2-14 gün arasında değişen periyodlarla temasta bırakılması ile yapılan ekstraksiyon yöntemi olarak oluşturulmuştur. Genellikle işlem 15-20°C de gerçekleştirilmiştir. Çözünmeyen katı kısım süzülerek ayrılmıştır. Süzme işlemi sırasında çözücünün buharlaşmasının önlenmesi sağlanmıştır.

Dijestiyon: Ekstraksiyon süresince drogun 30-40°C de ısıtılması ile yapılan bir maserasyon işlemi olmuştur. Ortam ısısının daha fazla artırılması çözücü etkinliğini artırmadığı gibi yapılan ekstraksiyon işlemi için de uygun olmadığı görülmüştür.

İnfüzyon: Drogun üzerine kaynar su döküp karıştırarak yapılan bir ekstraksiyon olmuştur. Her ne kadar, drogun üzerine kaynar su konması ile yapılır olarak bilinse de gerçekte işlem kaynatılmaya bağlı olmamıştır. İnfüzyonda drogun çok ince partiküller halinde olması, süzme sırasında sorun yaratacağından istenmemiştir. Genel olarak infüzyon, bitki çaylarının hazırlanmasında kullanılan bir ekstraksiyon yöntemi olduğu görülmüştür.

Dekoksiyon: İnfüzyondan farklı olarak, ufalanmış droglar üzerine soğuk su döküp bunları genellikle V1 saat 90-100°C de kaynatıp sıcakken süzmek suretiyle yapılan bir ekstraksiyondur. İşlem sırasında drog, su içinde iyice dağıtılmalıdır. Ayrıca kesin resmi kayıt olmamakla birlikte dekoksiyonda ne kadar ham drog için ne kadar su konması gerektiği belirtilmiştir. Buna göre 50 gram drog için 1000 mL su kullanılması, kaynatıldıktan sonra 40°C'ye soğutulup sonra süzme işleminin yapılması gerektiği ifade edilmiştir.

Perkolasyon: Drogun ilerleyen bir şekilde tüketilmesi işlemi olarak kullanılmıştır. Maserasyon yöntemi ile etken maddenin tümünü tüketmek mümkün olmamıştır. Bu amaçla perkolasyon yöntemi kullanılabilmiştir. İşlem, perkolatörde gerçekleştirilebilmiştir. Drog, çözücü ile ısıtılmaktadır. Çözücü, drogdaki hücrelere nüfuz etmektedir. Islak drog perkolatöre yerleştirilmektedir. Üzerine çözücü konup belli bir süre maserasyona bırakılmıştır (süre etken maddeye göre değişebilir). Bu süre sonunda perkolatörün altındaki musluktan ekstre alınmıştır. Etken maddenin tümü tükeninceye kadar perkolasyona devam edilmiştir.

Soxhlet apareyi ile yapılan sürekli ekstraksiyon: Katı maddelerin ekstraksiyonunda etkin bir şekilde soxhelet apareyi kullanılarak yapılan bir işlem olarak bilinmektedir. Aparey;

- Balon
- Gövde
- Soğutucu

olmak üzere 3 kısımdan oluşturulmuştur.

Katı madde soxhelet apareyi kartuşuna (kalın süzgeç kâğıdından yapılmış geniş bir tüp) konarak apareyin gövdesine yerleştirilmiştir. Balonda kaynayan çözücü soğutucuda yoğunlaşarak kartuşun içine damlar ve sonra sifon yaparak balonun içine aktığı görülmektedir. İşlem, bu şekilde istenildiği kadar tekrarlanabilmektedir (Yalçın, 2004).

2.4. Ekstraksiyon Teknikleri

Bitkilerin belirli oranlarda bioaktif bileşikler içerdiği tespit edilmiştir. Bitki ekstraktları gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde geniş çapta kullanılmaktadır. Bununla bağlantılı olarak elde edilen doğal bileşiklerin ticarileştirilmesi amacıyla ekstraksiyon metotları geniş çapta araştırılmıştır. İdeal bir ekstraksiyon sürecinin her zaman hızlı, basit ve ucuz olması istenmiştir. Ekstrakte edilen maddeler için kayıp ve bozunmaya uğramadan elde edilmeli, ilaveten bir saflaştırma gerektirmemeli ve atık çözücü içermemesi amaçlanmıştır. Genelde çözücü ekstraksiyonu bu koşulları sağlamakta yetersiz kalmıştır. Çözücü ekstraksiyonu basit, ucuz ve kuramsal olarak yerleşmiş bir yöntem olmakla birlikte birtakım dezavantajlarının da bulunduğu görülmüştür. Bunların en başında, yüksek ısı ve çözücü tüketimi geldiği tespit edilmiştir.

Genelde; çevre, sağlık ve güvenlik açısından zararlı çözücülerin kullanılması tercih edilmemiştir. Kullanılan ısı ve çözücüler ürün kalitesini etkiler, dolayısıyla ısı bozunmaya uğrayan hassas maddelerin ekstraksiyonu için geleneksel çözücü ekstraksiyonun uygun bir yöntem olmadığı görülmüştür. Ayrıca ekstraksiyon işleminden elde edilen alt akım seyreltilerek işlem yapılmıştır. Hedef ürünün çözücülerden ayrılıp derişiklendirilmesi için ek bir ayırma işlemine ihtiyaç duyulmuştur. İşlem süresinin uzun ve işletme maliyeti çok yüksek olmuştur. Tüm bunlardan dolayı alternatif ekstraksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu görülmüştür (Wang, 2006; Kılıç, 2008). Soxhlet ekstraksiyonu ile birlikte bu yeni ekstraksiyon teknikleri;

1. Soxhlet Ekstraksiyonu
2. Ultrasonik ekstraksiyon
3. Mikrodalga ekstraksiyon
4. Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu
5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

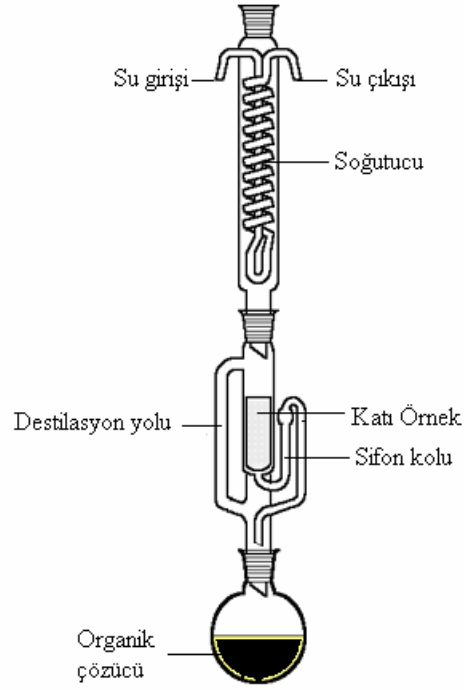
olarak belirtilmiştir. Bu teknikler ile yüksek sıcaklık ve basınçta çalışmak mümkün olmakta ve ekstraksiyon zamanının dikkat çekici bir şekilde azaltılmaya çalışılmıştır.

2.4.1. Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraktörü; 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından katı bir deney numunesinden yağ ekstrakte edilmesi amacıyla icat edilen bir laboratuvar cihazı günümüzde hala kullanılmaya devam etmektedir. Yağ ekstrakte etmek için tasarlanmış olmasına rağmen, bir bileşiği bir katıdan ekstrakte etmenin zor olduğu her şartlarda kullanılabilmiştir. Genellikle, kuru deney numunesi Soxhlet ekstraktörüne yerleştirilen, filtre kâğıdından yapılmış yüksük şeklinde bir ekstraksiyon tüpüne konmaktadır (Şekil 2.16). Ekstraktöre, çözücüyü içeren şilifli bir cam balon ve yoğunlaştırıcı takma işlemi yapılmıştır. Çözücü ısıtılır ve böylece buharlaştırılma başlatılır. Sıcak çözücü buharı yoğunlaştırıcıya ilerler, yoğunlaşarak katı numunenin üzerine tekrarlı bir şekilde düşmektedir. Numuneyi içeren ekstraksiyon tübünün bulunduğu yüksük yoğunlaşan çözücü ile tam dolduğunda, bypass kolunun seviyesine ulaşır ve sifon oluşarak çözücü tekrardan cam balona boşalmaktadır. Bu yoğunlaşma, yükselme ve sifon döngüsü, ‘reflux’ olarak adlandırılır ve sürekli tekrar edilmesi sağlanmıştır.

Her döngü sırasında, katının içerdiği bir miktar yağın çözücü içinde çözündüğü görülmüştür. Ama çözücünün ısıtılan cam balonuna ulaştığında orada kalır, döngüye tekrar katılmamaktadır. Bu durum, bu ekstraksiyon metodunun en önemli avantajı olmakla birlikte sadece saf çözücü, katıyı ekstrakte etmek için buharlaşır ve yoğunlaşarak döngüye tekrardan katılımı sağlanmıştır.

Bu nedenle, bir cam balonda katıyı çözücü içerisinde ısıtarak ekstrakte etme yöntemiyle karşılaştırıldığında Soxhlet ekstraktörü ile uygulanan bu yöntemin veriminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bir ekstraksiyonun sonunda arta kalan çözücü, ekstrakte edilen yağı bırakarak rotary buharlaştırıcısı ile uzaklaştırılması sağlanmıştır (Yalçın, 2004).



Şekil 2.16. Soxhlet düzeneği

Soxhlet ekstraksiyonun matriksin karakterine ve tanecik boyutuna (iç difüzyonun sınırlandırılması ile ilgili) önemli ölçüde bağılı olduğu belirlenmiştir. Bu ekstraksiyon tekniğinin avantajları arasında, çözücünün transfer dengesinin katı matriksle tekrarlanan bir şekilde etkileşmesinden dolayı sürekli değişmesi, ekstraksiyondan sonra filtreleme işlemine gerek duyulmaması, metodun basit ve ucuz olması gösterilmiştir.

Tipik ekstraksiyon zamanları 6 saatten 24 saate kadardır ve oldukça büyük solvent hacimlerine (100 mL – 500 mL) ihtiyaç duyulmuştur. Soxhlet ekstraksiyonunda, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonunda kullanımı amaçlanmıştır.

Eş zamanlı ekstraksiyona izin veren Soxhlet cihazı çok düşük maliyetle temin edilebilmektedir. Ayrıca az uğraş gerektiren çok basit bir metodoloji yöntemi olmuştur.

En son kullanılan alternatiflerinin çoğundan (mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu gibi) daha fazla miktarda örnek kütlesinin ekstrakte edildiği görülmüştür (Luque-Garcia, 2004; de Castro, 2010). Bununla birlikte ekstraksiyon zamanının çok uzun olması, çok miktarda çözücü kullanılması, prosesi hızlandırmak için balonun çalkalanamaması ve termal olarak bozulmaya duyarlı bileşiklerin yüksek sıcaklıkta ekstrakte edilememesi önemli dezavantaj arasında yer aldığı görülmüştür.

Genel olarak bakıldığında, iyi uygulanan bir metottur ve endüstriyel proseslerde daha etkili ve iyi bir tekrarlanabilirlik göstermesi, ekstraktın daha az manipulasyon olması nedeniyle diğer metotlara kıyasla üstün özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Wang, 2006).

2.4.2. Ultrasonik ekstraksiyon

Ses dalgaları, farklı ortamlar içinde yayılan ve frekansları 20 kHz üstünde olan boyuna dalgalardan oluşmaktadır. Bu dalgalar bulundukları ortama bağlı olarak (katı, sıvı ve gaz) farklı titreşimde ve hızda yayılmaktadırlar. Ses dalgası bir ortamda yayılırken; ortamın parçacıkları, dalganın hareket doğrultusu boyunca yoğunluk ve hacim değişiklikleri oluşturarak titreşirler. Bu parçacık hareketi, dalga hareketinin yönüne dik olan enine dalga hareketindeki durumun tersine olduğu görülmüştür.

Ses dalgaları şeklinde ortaya çıkan yer değiştirmeler, denge konumundan itibaren her bir molekülün boyuna yer değiştirmesi gerektirmektedir. Bu sıkışma ve genişleme, yüksek ve alçak basınç düşmelerine yol açmaktadır. Bir mikrofonun diyaframındaki gibi, ses dalgası kaynağı sinüsel olarak titreşirse, basınç değişimleri de sinüsel olarak yayılırlar (Holiday,1992; Erte, 2007). Ses ötesi dalgaların diğer yararlı uygulaması da hala tam olarak anlaşılamayan ancak kesinlikle çok etkili olan kavitasyon işlemidir. Şöyle ki; bir ses dalgası art arda meydana gelen sıkışma ve genişlemelerden oluşmaktadır. Bir sıvı sıkışmalara kolaylıkla dayanabilir ancak genişleme yani basıncın şiddetli bir biçimde düşmesi sıvının içinde bir boşluk meydana gelmesine neden olurlar. Boşluk buharla veya sıvıdaki çözünmüş gazın ortaya çıkışıyla hemen doldurularak küçük bir kabarcığa dönüştüğü görülmüştür.

Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana getirir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufak kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopması sağlanmaktadır. Bu kabarcık dağıldığında şiddetli bir şok dalgası meydana gelir ve açık etkilere yol açabilir. İster büyük, isterse küçük olsun mühendislikte kullanılan parçalar içinden ultrasonik bir ses dalgasının geçtiği bir sıvı banyosuna batırılarak çok iyi temizlenebildiğinde gözlenmiştir (Erte, 2007). Ultrasonik indüklemenin mekanik etkisi olarak, kütle transferinin arttırılarak çözücülerin hücrelere etki etmesi olarak gösterilebilir. Ekstraksiyon esnasında ultrasonik (ses dalgaları) hücre duvarına etki etmekte ve bileşenlerin bırakılmasına olanak sağladığı görülmüştür (Şekil 2.17). Bitkideki hücre duvarını parçalayarak etken maddenin ekstraksiyonunu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan çalışmalarda ultrasoniğin mekaniksel etkisi sonucu hücre duvarının yıkıldığı ve bundan kaynaklı olarak bileşenlerin serbest kaldığı kanıtlanmıştır. Bitkiye özgü nem oranı, tanecik büyüklüğü ve kullanılan çözücü gibi faktörler yanında, frekans, sıcaklık ve zaman gibi faktörlerde ultrasonik ekstraksiyon verimini etkilediği görülmüştür. Pahalı olmaması, basit olması, ekstraksiyon kinetiğinin hızlı olması ve ısıya duyarlı bileşiklerin ekstrakte edilebilir olması bu metodun avantajları olarakda belirtilmiştir (Wang, 2006).



Şekil 2.17 Ultrasonik banyo cihazı

2.4.3. Mikrodalga ekstraksiyonu (Microwave-Assisted Extraction, MAE)

İkinci dünya savaşından beri kullanılan mikrodalga teknolojinin, analitik laboratuvarında kullanımı 1970'lerin sonunda olmuştur. Mikrodalgalar 300-300000 MHz aralığında değişen elektromanyetik dalgalardır ve genellikle doğal ürünlerde 2500-75000 MHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olmuştur. Polar moleküller ve iyonik türlerin bulunduğu durumlarda daha hızlı bir enerji yayılması gerçekleştirilmiştir (Kılıç, 2008).

Mikrodalga ısıtmasının avantajı moleküllerin kutuplarındaki yükseltgenen zayıf hidrojen bağlarının bozundurulması olayı olduğu tespit edilmiştir. Klasik temas yoluyla ısı iletimi yöntemlerinin aksine, mikrodalgalar ile örneğin tamamı aynı anda ısıtılmaktadır. Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon iki farklı sistemle gerçekleştirilmiştir. En yaygın sistem, sıcaklık ve basınç kontrol edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyon yöntemi olmuştur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresinin ve kullanılan çözücü miktarının büyük oranda az olması çok büyük önem taşımıştır. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir (Kılıç, 2008; Beejmohun, 2007).

Mikrodalga, çözücü ve matrikslerin dielektrik duyarlılığına bağlı olmaktadır. Yüksek dielektrik sabiti ile bağlantılı olarak nemli örneklerde daha iyi geri dönüşüm elde edilmiştir. Kuru örneğin ekstraksiyondan önce nemlendirilmesi sonucunda, matriks kendiliğinden mikrodalga ile etkileşebilmekte ve ısınma işleminin kolay olmasına olanak sağlamıştır. Mikrodalga ekstraksiyonda çözücü ve bitki matriksleri arasındaki ilişkiden yararlanılarak ve ekstraktın çözünürlüğü göz önüne alınarak çözücü seçimi gerçekleştirilmiş ve sonuç itibarıyla çözücünün dielektrik sabitine bağlı olarak mikrodalga tarafından absorbe edilmiştir. Çözücünün dielektrik sabiti ile mikrodalga ekstraksiyonu arasında bir ilişki var olup, genellikle yüksek dielektrik sabitine sahip çözücüler mikrodalga enerji tarafından daha iyi absorbe edildikleri için çok tercih edilen bir yöntem olmuştur. Etanol, metanol ve su gibi etkin polar çözücülerin mikrodalga ile daha iyi ısıtılabilirlikleri belirtilmiştir (Wang, 2006).

Hekzan ve toluen gibi polar olmayan ve düşük dielektrik sabitine sahip çözücüler mikrodalga ekstraksiyonu için çok uygun olmamıştır. Ayrıca klasik çözücü ekstraksiyonunda ürün miktarını arttırmak için katı matrisler çözücü içerisine tamamen batırılırken, mikrodalga ekstraksiyonda çözücü miktarının artırılması ekstraksiyon verimini, mikrodalga ile çözücünün yeterince etkileşememesine bağlı olarak azaltılmıştır. Sıcaklığın artırılması ile ekstraksiyon veriminin arttığı fakat ısıya duyarlı bileşiklerin yıkımında da etkili olduğu belirtilmiştir. Ekstraksiyon zamanının ve kullanılan çözücü miktarının azaltılması, ekstraksiyon veriminin iyileştirilebilmesi, basit ve ucuz bir proses olması bu metodun avantajları arasında olmuştur. Bununla birlikte katı atıkların giderilmesi için filtreleme ve santifürj gerekmesi, apolar ve uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili bir yöntem olmaması dezavantaj olarak belirtilmiştir (Wang, 2006).

Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kapta gerçekleştirilmektedir. Bu durumda basınç artar ve solvent kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ısıtılabilir. Çoğu solvent için (aseton, aseton-hekzan, diklormetan-aseton gibi) kabın içindeki sıcaklık, solventin kaynama noktasının 2-3 katı olmuştur. Temel olarak iki tip MAE sistemi kullanılabilir: Kapalı kap sistemi (kontrollü sıcaklık ve basınç altında) ve açık kap sistemi (atmosfer sıcaklığında). Kapalı kap sisteminde hücreler eş zamanlı olarak ısıtılırken, açık sistemde kaplar sıralı olarak ısıtılmıştır. Açık kaplarda sıcaklık solventin atmosferik basınçta kaynama noktasıyla sınırlıyken, kapalı kaplarda sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilmiştir (Renoe, 1994). Kapalı kap sistemi, uçucu bileşikler olması durumunda en uygun bir yöntem olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, kapalı kaplarda, ekstraksiyon sonrasında kap açılmadan önce sıcaklığın düşmesini beklemek gerekmektedir. Bu ekstraksiyon süresini arttırdığı görülmüştür (yaklaşık 20 dakika) (Saim, 1997).

2.4.4. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyonu

1999 yılında Baltussen ve arkadaşları tarafından yeni bir ekstraksiyon tekniği olarak tanıtılmıştır (Baltussen, 1999). Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon olarak isimlendirilen bu ekstraksiyon tekniği, cam veya metal üzerine 50–300 μL (0,5–1,0 mm kalınlık) kaplanmış mekanik karıştırıcının ekstraksiyon ortamına konulması ile kullanılmıştır (Baltussen, 1999; Mac Namaraa, 2009). Manyetik yüzey yaklaşık 1,5 cm uzunluğunda, 0,5 cm çapındadır (Şekil 2.18).

Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon maddelerin termal desorpsiyon cihazında buharlaştırma işlemi tayin edilebilmiştir (Baltussen, 2002; Kawaguchi, 2006).



Şekil 2.18. Manyetik karıştırıcı

Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon mekanizmasının avantajları belirtilmiştir. Ancak zenginleştirme faktörü ekstraksiyon fazının miktarı ile doğru orantılı olduğundan ekstraksiyonda elde edilen ürün miktarlarının çok daha fazla olduğu görülmüştür. Genel olarak daha karmaşık matrislerde eser miktarda madde tayinlerinde kesinlik ve duyarlılık açısından manyetik karıştırıcının daha iyi olduğu düşünülmüştür (Dietz, 2006). Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon çevresel, gıda ve biyolojik örneklerdeki uçucu ve yarı uçucu maddelerin tayininde iyi bir yöntem olarak kullanılmıştır (Şekil 2.19).

Sıvılarda ve yarı katı matriks ortamlarda da kullanılabilir (Olariu, 2010). Sulu örneklerin analizlerinde (Barco, 2011; Zuin, 2005), sebze ve meyvelerdeki pestisit kalıntılarının belirlenmesinde en fazla kullanıldığı belirlenmiştir (Kende, 2006).



Şekil 2.19. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyonda işlemi

Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon, çoğunlukla sulu ortamlarda apolar ve yarı polar bileşiklerin analizi için uygun olduğu görülmüştür. Uygun türev işlemleri ile polar bileşiklerin analizinde de kullanılmıştır (Dieza, 2004). Yöntemde manyetik doğrudan desorbe edilemeyip özel olarak dizayn edilmiş termal desorpsiyon cihazı gerektirmesi, tam otomasyona uygun olmaması dezavantaj olarak belirlenmiştir (Barco, 2011).

2.4.5. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, 50-200 °C sıcaklık ve 10-15 MPa basınç aralıklarında gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyon tekniği olmuştur. Bu yönüyle hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu basınçlı çözücü ekstraksiyonunun bir türü olmakla birlikte süperkritik akışkan ekstraksiyonuna da oldukça benzetilmiştir (Kaufmann, 2002; Richter, 1996). Ekstraksiyon, yüksek sıcaklıklarda ve basınç altında çözücünün sıvı fazda olduğu şartlarda gerçekleşmiş ve ekstraksiyon esnasında çözücü kritik şartlarının altında olduğu gözlenmiştir.

Ekstraksiyon sıcaklığının arttırılması ile ekstraksiyon kinetiği arttırılmakta ve yüksek basınç ile çözücü sıvı fazda tutularak güvenli ve hızlı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Basınç, sıvı ile ekstraksiyon hücresindeki katı matriks ile sıvının güçlü bir şekilde etkileşmesine olanak vermiştir. Sıcaklığın arttırılması çözücünün difüzyonunu arttırmakta ve bunun sonucunda ekstraksiyon kinetiğini arttırmıştır. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, yüksek sıcaklıkta kararlı organik kirleticilerin ekstraksiyonunda kullanılmaya hala devam edilmektedir.

Karbondioksit ve su gibi toksik olmayan, ekonomik ve çevresel çözücülerin bu teknikte kullanılması, polar bileşiklerin ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi ve klasik çözücü ekstraksiyonu ile kıyaslandığında çözücü kullanımının oldukça düşük olması bu tekniğin avantajları olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen prosesden dolayı ısıya duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun bir ekstraksiyon tekniği olmadığı çok net olarak görülmüştür (Wang, 2006).

2.4.6. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, bileşenlerin ana yapıdan ayrılması esnasında çözücü olarak süperkritik akışkanın kullanıldığı metot olmuştur. Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında, gaz-sıvı denge eğrisi ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artmaktadır. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken; basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlamıştır.

Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelmiştir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılmıştır. Böylece, maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_c), basıncı ise kritik basıncının (P_c) üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan (SC)” olarak tanımlanmıştır.

İlk kez 1879'da Royal Society seminerlerinde (Londra) Hannay ve Hogart tarafından, bir katının yüksek basınçtaki gazda çözüldüğü, basınç düşürülünce katının çökme işlemi olarak açıklanmıştır. Bir kaç yıl sonra Eduard Buchner (1907'de biyokimya alanında Nobel ödülü almıştır), uzun süren bir çalışmanın ardından bir model bileşik olarak naftalinin SC-CO₂ içindeki çözünürlüğü ölçülmüştür (Froning, 1990).

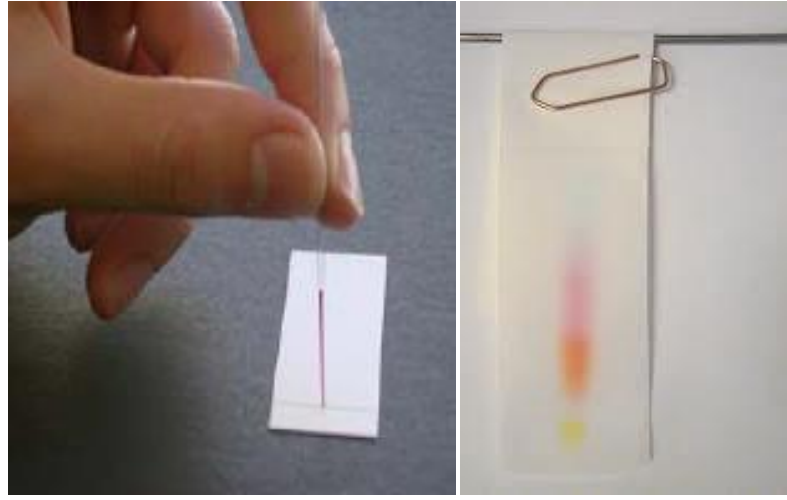
Süperkritik akışkanların, fizikokimyasal özellikleri sıvılarla gazların özellikleri arasındadır. Bu özellik, süperkritik akışkanların daha etkin bir çözücü olmasını sağlamıştır.

Son yıllarda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu gitgide artan ilgi ile bilinen ekstraksiyon metotlarına karşı ilginç alternatif bir metot olarak dikkatleri çekmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, su buharı destilasyonu, Soxhlet, sıvı ekstraksiyon ve sıvı kromatografisi gibi diğer ekstraksiyon yöntemleri ile gerçekleştirilemeyen pek çok uygulamayı olanak sağlayan yeni bir yöntem olarak sunulmuştur (Çalimli, 2003; Erte,2007).

2.5. Kromatografi

Kromatografi, Yunanca chroma (renk) ve graphein (yazmak) sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuş olup, ilk kez 1900' lerin başında Rus botanikçi Michael Tswett tarafından geliştirildiği ve kullanıldığı bilinmektedir. Tswett, cam bir kolonda, CaCO₃ adsorbanı üzerinden bitki ekstresinin petroleterli çözeltisini geçirmiş ve kolonda sarı, yeşil bantlarla bir ayırma işleminin olduğunu gözlemlemiştir. Tsvett bu yöntemi bitki pigmentlerinin (klorofil A, klorofil B ve ksantofil) renkli bileşenlerini ayırma işlemi olarak kullanmıştır (Şekil 2.20). Kullandığı kolonda renkli bandlar oluştuğundan, bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermiştir.

Bu alandaki ilk yayınların Rusça olması nedeni ile diğer araştırmacıların ilgisini çekerek gelişme sağlaması 1930'lu yıllarını bulmuştur. Daha sonraları, çeşitli çok bileşenli numunelerdeki bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde, kromatografik analiz yöntemleri, bir karışımı oluşturan türlerin ayrı ayrı belirlenmesi (nitel analiz) ve karışımı oluşturan bileşenlerin miktar tayini (nicel analiz) işlemlerini hayata geçiren ve en çok kullanılan aletli analiz yöntemlerinden biri olmuştur.



Şekil 2.20. Michael Tswett'in kromatografi örneği

Kromatografi, bir karışımı oluşturan farklı kimyasal maddelerin, birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine veya farklı etkileşmelerine dayanarak birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan bir yöntem olmuştur. Diğer bir tanım ile kromatografi, bir karışımdaki farklı kimyasal maddelerin, iki ayrı faz arasında adsorbsiyon, çözünürlük, kapillarite, iyon değişimi veya moleküler eleme gibi esaslara dayanarak ayırma ve ayrı ayrı elde edebilme işlemlerine verilen genel isim adını almıştır.

Kromatografi uygulamaları ve yeni yöntemler geliştirilmesi son 50 yılda büyük aşamalar göstermiştir. Bu alandaki çalışmaları ile, A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge 1952 yılında Nobel ödülünü kazanmışlardır.

Kromatografi, kompleks karışımlardaki çeşitli maddeleri bir birinden ayırmaya ve tanımlamaya olanak veren ve bilim adamlarının çalışmalarını kolaylaştıran bir seri ayırma yöntemleri tekniği olmuştur. Tüm kromatografik uygulamalarda bir "sabit faz" ve bir "hareketli faz" bulunmaktadır. Bir karışımdaki maddeler hareketli faz ile sürüklenerek sabit faz üzerinden taşınır; Örnekteki maddelerin göç etme hızlarının farklı olması, her bir maddenin sabit faz üzerinde gruplaşarak ilerlemesine yol açar, böylece karışım içindeki maddelerin birbirinden ayrılması kolay olmuştur.

2.5.1. Kromatografik metotların sınıflandırılması

2.5.1.1. Ayırma mekanizmasına göre sınıflandırma

1. Adsorbsiyon Kromatografi
2. Dağılma (Partition) Kromatografi
3. İyon değiştirme kromatografi (veya iyon kromatografi)
4. Jel geçirgenlik veya Jel süzme (Moleküler-Exclusion veya Size-Exclusion) kromatografi)
5. Zone Elektroforez
6. Afinite (veya Bioafinite) Kromatografi
7. Chiral Kromatografi

2.5.1.2. Hareketli faza göre sınıflandırma

1. Sıvı Kromatografisi (LC)
2. Gaz Kromatografisi (GC)

2.5.1.3. Uygulanan tekniğe göre sınıflandırma

1. Kolon Kromatografi
2. Düzlem Kromatografi (İnce Tabaka Kromatografi, TLC; Kağıt Kromatografi, PC)

2.5.1.4. Kullanım amacına göre sınıflandırma

1. Analitik Kromatografi (Kalitatif Kromatografi; Kantitatif Kromatografi)
2. Preparatif Uygulamalar (Karışımlardan Saf madde Elde Etme)

2.5.2. Sabit faz tipleri

Kromatografide, ayrılacak maddeler hareketli fazda çözünebilmeli ve sabit faz ile de bazı etkileşimlerde bulunabilmelidirler. Örneğin, sabit fazda çözünme, adsorblanma veya kimyasal reaksiyona girme gibi olması gerekmiştir. Ayırma işlemi süresince maddeler iki faz arasında dağıtılmışlardır.

Bazı uygulamalarda sabit faz, ince bir cam veya metal çubuk içine doldurulmuş toz halinde katı bir madde olmuştur. Gaz veya sıvı haldeki hareketli faz basınç altında (veya kendi ağırlığı ile) katı içinden geçirilmektedir. Bu yönteme "kolon kromatografisi" adı verilmiştir. Bir de "düzlemsel kromatografisi" vardır; bunda sabit faz poröz bir kâğıt veya bir cam levha üzerine yayılmış ince toz halinde katı bir madde içerdiği tespit edilmiştir. Düzlem kromatografisinde hareketli faz kapiler etkisi veya kendi ağırlığı ile sabit faz üzerinde ilerlediği görülmüştür.

Sabit faz, hareketli fazla karışmayan ve akıcı olmayan bir sıvı da olabilmektedir. Bu durumda sabit sıvı fazı bir yerde tutabilmek için çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Örneğin, toz halindeki bir katının üzerine bir sabit faz sıvısından ince bir tabaka kaplanır ve kaplanmış katı madde bir cam veya metal tüpe doldurulmuştur.

Hareketli faz bu tüpten geçirilmektedir. Burada katı maddenin ayırma işleminde herhangi bir rolü yoktur, sadece faz sıvısını tutma (adsorblayarak) görevi yaptığı görülmüştür. Başka bir yöntemde, sabit sıvı faz bir kapiler tüpün cidarlarına kaplanarak tutulur, gaz hareketli faz bu tüpten geçirilmiştir. Bir diğer yöntemde ise sabit sıvı fazı tutmak için kâğıt lifleri veya üzerinde çok ince öğütülmüş katı tanecikler bulunan bir cam levha kullanılmıştır (Yalçın, 2004). Çizelge 2.3'de, sabit ve hareketli fazların yapılarına göre uygulanan çeşitli kromatografik yöntemler verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kromatografik ayırmaların sınıflandırılması

Adı	Hareketli faz tipi	Sabit faz tipi	Sabit fazı tutma yöntemi
Gaz-sıvı	Gaz	Sıvı	Bir tüp içindeki poröz katı üzerinde veya kapiler bir tüpün iç cidarı üzerinde adsorblanır
Gaz-katı	Gaz	Katı	Bir kolon (tüp) içinde tutulur
Dağıtma	Sıvı	Sıvı	Bir kolon (tüp) içindeki poröz bir katı üzerinde adsorblanır
Adsorbsiyon	Sıvı	Katı	Bir kolon (tüp) içinde tutulur
Kâğıt	Sıvı	Sıvı	Kalın bir kâğıdın gözenekleri içinde tutulur
İnce tabaka	Sıvı	Sıvı-katı	Bir cam levhadaki ince toz halindeki katı üzerinde tutulur
Jel	Sıvı	Sıvı	Polimerik bir katının lifleri arasında tutulur
İyon değiştirme	Sıvı	Katı	Bir kolondaki (tüp) iyon değiştirici reçine üzerinde tutulur

2.5.3. Doğrusal kromatografi

Tüm kromatografik ayırmalar hareketli ve sabit fazlar arasında dağılan maddelerin değişik yayılma (hareket) özelliklerine dayandırılmıştır. "Dağıtma katsayısı, K" denilen ve sıcaklığa bağımlı bir sabit ile kantitatif bir denklem verildiği belirlenmiştir (Yalçın, 2004).

$$K = C_s / C_M \quad (2.5)$$

Burada C_s maddenin sabit fazdaki analitik konsantrasyonu, C_M aynı maddenin hareketli fazdaki konsantrasyonudur. İdeal halde, geniş bir madde konsantrasyonu aralığında dağılma kat sayısı sabittir; yani C_s , C_M ile doğru orantılı olduğu görülmüştür (Yalçın, 2004).

2.5.4. Kromatografinin kullanım alanları

Kromatografinin geliştirilme amacı ve başlıca kullanım alanı birbirine benzer kimyasal türlerin birbirlerinden ayrılması yöntemi olmuştur. Ancak, gelişen teknolojilerle kromatografisi basit bir ayırma işlemi olmaktan çıkmış, gelişmiş dedektör sistemleri ve bilgisayarlara birleştirilerek önemli bir enstrümantal (aletli) analiz türü olmuştur. Bu cihazlarla hem nitel hem de nicel analiz yapılabilmesi açısından önem taşımıştır. Ayrıca, fraksiyon toplayıcı adı verilen özel parçalar ve büyük kolonların kullanımıyla preparatif ayırım olarak adlandırılan makro boyutlu ayırımlar da gerçekleştirilebilmiştir.

2.5.4.1. Nitel analiz

Kromatografik yöntemlerle nitel analiz alıkonma zamanlarının karşılaştırılması ile yapılır. Ancak kromatografi tekniği ile nitel analiz, yani bir bileşenin ne olduğunun tespiti, tek başına hiçbir zaman yeterli olmamıştır.

Çünkü akış hızındaki, ya da hareketli faz bileşimindeki en ufak bir değişiklik alıkonma zamanı etkilemiştir. Yine de aranılan türün standardı ve numune, aynı elüsyon koşullarında analiz edilerek bir karşılaştırma yapılabilir ve nitel analiz için bir fikir sahibi olunmuştur. Eğer tam bir nitel analiz yapılacaksa mutlaka NMR ve IR gibi diğer spektroskopik tekniklerden faydalanmakta gerektirmiştir. Kromatografi işlemi daha ziyade bir numunenin kaç bileşenden oluştuğunu anlamaya faydalı olduğu bilinmiştir.

Ancak şu da unutulmamalıdır ki, özellikle karmaşık yapılı numunelerin spektroskopik incelemelerinden önce kromatografik bir ön işleme tabi tutulmaları çoğu analiz için zorunlu olduğu belirtilmiştir (Yalçın,2004).

2.5.4.2. Nicel analiz

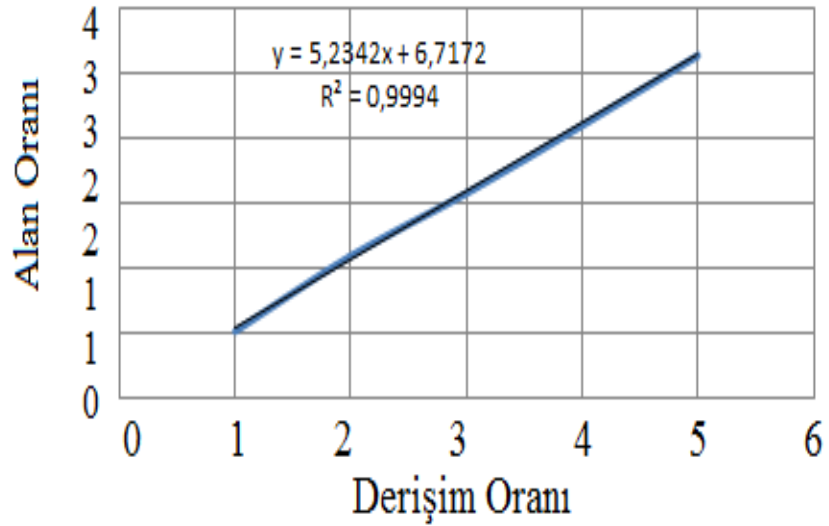
Nicel analiz, kromatografinin en çok tercih edilen uygulama alanlarından birisi olmuştur. Elde edilen kromatogramlardaki piklerin yüksekliklerinden ve daha ziyade alanlarından faydalanılmıştır. Çünkü bu veriler, maddelerin miktarlarıyla doğru orantılı olmuştur. Piklere ait bu veriler, modern kromatografi cihazlarında, bilgisayar veri sistemleri veya elektronik integratörler ile kolaylıkla ve yüksek doğrulukla elde edilebilmiştir. Kolay çözülebilmesi nedeniyle özellikle dar ve keskin piklerin analizi pik yüksekliğine dayalı olarak yapılabilir, ancak küçük bant genişlemeleri pik yükseklikleri ile ters orantılı olarak sonuçları etkilemiştir. Piklerin alanına dayalı analizler ise bant genişleme etkilerinden bağımsızdır ve bu nedenle daha güvenilir sonuçlar verdiği görülmüştür.

Bundan hareketle genelde bir nicel analizde, derişimi bilinen standart maddelere ait piklerin alanları belirlenir ve derişime karşı pik alanları grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Daha sonra numunede tayini yapılacak olan analize ait pikin alanı kullanılarak kalibrasyon grafiğinden analitin derişimine geçilmiştir (Şekil 2.21). Kalibrasyon yöntemiyle analizlerde en önemli sorun enjeksiyon hacmi ve hızındaki belirsizlikler olduğu görülmüştür.

Özellikle gaz kromatografisinde sıcak bir bölgeye enjeksiyon yapılmakta ve enjektör ucundaki buharlaşma, enjekte edilen numune hacminde büyük değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Çok daha güvenilir sonuçlar elde edebilmek için iç standart ekleme yöntemi adı verilen yöntem kullanılmıştır.

Bu yöntem ile tayin edilecek analiti içeren numuneye ve standartlara seçilen uygun bir iç standart'dan eşit miktarlarda ilave edilir ve aynı yolla elde edilen verilerden bir grafik oluşturulmuştur. Bu yöntemde, numune enjeksiyonun'dan kaynaklanan belirsizlikleri en aza indirgenebilmesi en önemli avantajları arasında yer almıştır.

Ancak iç standart maddesi seçilirken dikkat edilmesi gereken bir nokta vardır o da; iç standart maddeye ait pikin analitik pikiyle yakın, numunedeki diğer bileşenlerin piklerinden ise iyi ayrılmış olması gerekmektedir. Özellikle gaz kromatografisiyle nicel analiz yapılırken bu yöntemin kullanılmasında büyük fayda sağladığı görülmüştür. İç standart yöntemine alternatif bir diğer yöntem ise daha kompleks karışımların analizinde kullanılan alan normalizasyon yöntemi olmuştur.



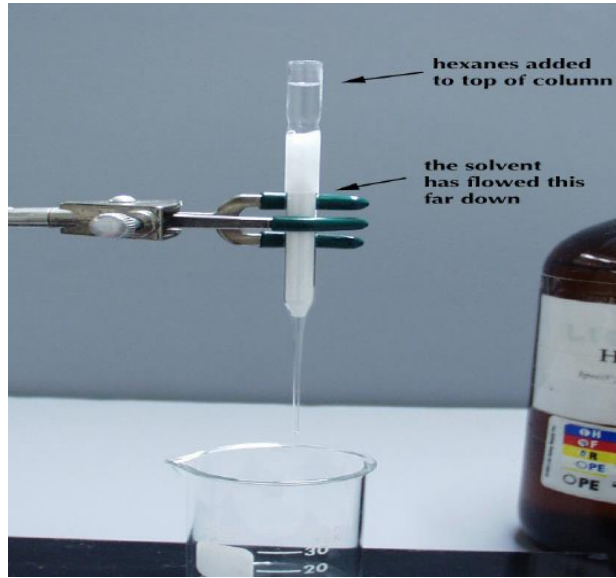
Şekil 2.21. Kromatografide elde edilen standartların kalibrasyon grafiği

Başlıca katı dolgu maddeleri (hareketsiz faz) şunlardır:

- Silika Jel: Genellikle nötr ve asidik yapıdaki bileşikler için uygundur.
- Alumina: Genellikle nötr ve bazik yapıdaki bileşikler için uygundur.
- Sellüloz: Genellikle biyokimyasal maddeler için uygundur.

Hareketli faz görevini üstlenecek çözücüler; Sikloheksan, kloroform (kanserojen), Metanol, Petrol eter, Metilen klorür, Etanol, Benzen (kanserojen), Etil asetat, Aseton, Toluen, Dietilen eter, Karbon tetraklorür(kanserojen), n-Butanol İzopropanol olması gerektiği bulunmuştur.

1903 yılında Tsvet bitki pigmentleriyle çalışma yaparken kolon dolgu maddesi olarak kireci kullanmıştır (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. Tsvet'in kolon dolgu maddesi olarak kullandığı kireç

Günümüzde ise çoğunlukla kolon dolgu maddesi olarak silika jel ve alumina maddeleri kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Silika jel ve alumina örneği

Gaz kromatografisi (GC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Süperkritik akışkan kromatografisi

2.5.5 Adsorbsiyon kromatografisi

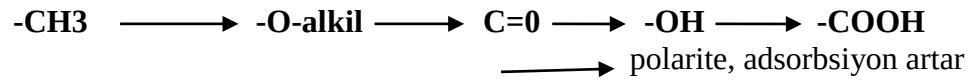
Adsorbsiyon, katı bir madde ile sıvıda çözünen bir bileşik arasındaki bir yüzeysel etkileşmesi olayı olarak adlandırılmaktadır. Burada stasyonier faz adsorbsiyon kapasitesi yüksek bir katı (A1203, Silicagel), mobil faz ise gaz veya çoğunlukla olduğu gibi sıvıdır. Adsorbsiyon olayında rol oynayan bağlar;

- Van-der-Waals bağları
- Dipol-dipol etkileşim gücü
- Hidrojen bağı
- İyonik bağlar
- Kelat bağları
- Nadiren de irreversible (geri dönüşümsüz) kovalent bağlardır.

Bu tür kromatografinin temel ilkeleri şunlardır:

a- Doymuş hidrokarbonlar hemen hemen hiç adsorblanmazlar. Bu nedenle çok hızlı göç ederler. Doymamış hidrokarbonların adsorbsiyonu çifte bağ sayısı ve ayrıca bunların konjugasyon sayılarının artması ile artar. Sonuç olarak ayırma için aktif bir adsorban ile non-polar bir solvana gerek duyulmuştur.

b- Genel olarak bir hidrokarbonda fonksiyonlu grup oluşturulması ile adsorbsiyon affinitesi artmıştır. Fonksiyonlu gruplar arasında şöyle bir sıralama yapılmıştır.



c- Eğer bir molekülde bir çok süstitüent varsa adsorbsiyon affinitelerinin kabaca birbirlerini etkilediği söylenmiştir. Özellikle sterik etkinin aromatik halkalardaki fonksiyonlu gruplar yönünden önemli olduğu görülmüştür.

2.5.6. Dağılma kromatografisi

Dağılma kromatografisinde genellikle her iki faz da sıvıdan oluşmaktadır. Bu nedenle sıvı-sıvı kromatografisi olarak adlandırılmıştır. Stasyoner faz çoğunlukla mobil fazdan daha polardır (çoğunlukla su) ve katı bir destek (kieselguhr, selüloz vb.) üzerine ince bir film tabakası halinde adsorbe ettirilmiştir. Mobil faz ise stasyoner fazdan daha az polar ve onunla karışmayan bir başka sıvıdan oluşmuştur. Sıvı-sıvı kromatografisinde bazen stasyoner fazın daha az polar olması istenmiştir. Bu kromatografi şekline "ters faz sıvı-sıvı kromatografisi" denilmiştir. Bu yöntem homolog seri maddeleri birbirinden ayırmak için oldukça sık kullanılmıştır. Dağılma kromatografisinde mobil faz bazen gaz olmuştur.

Bu durumda stasyoner faz, adsorban özelliği olmayan inert bir katıya emdirilmiş sıvı olmuştur. Bu yöntem ile kolay uçucu özellikteki veya gaz olan maddenin kromatografik ayrımı sağlanmıştır.

Dağılma kromatografisinde Nerst'in dağılma katsayısı geçerli kanun olmuştur. Nernst'e göre; "bir biri ile karışmayan iki sıvı madde karışımında çözünen üçüncü bir maddenin iki ayrı sıvı fazdaki konsantrasyonunun birbirine oranı sabittir." denilmiştir

$$K = C_s / C_m \quad (2.6)$$

K : Dağılma (partisyon) katsayısı

C_s : Stasyoner fazdaki konsantrasyon

C_m : Mobil fazdaki konsantrasyon

K değeri büyük ise stasyoner fazdaki konsantrasyon, mobil fazdakinden daha fazla olmuştur. Molekül stasyoner fazda daha uzun süre kalıyor anlamına gelmiştir (Yalçın, 2004).

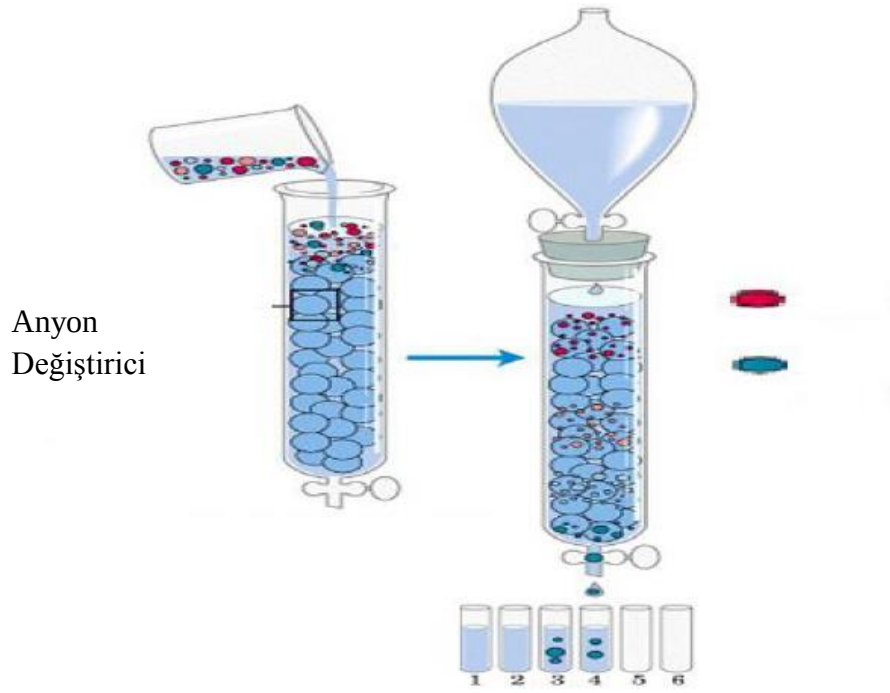
2.5.7. İyon değiştirici kromatografi

Maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricideki iyonik grupların eşdeğer miktarlarının karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanmıştır. Bazı katı maddeler, iyonize olabilen madde çözeltileri ile temasa geldiklerinde solut (bileşenlerine ayrılacak karışım) ile katı madde arasında bir iyon değişimi söz konusu olabilmiştir. İşte bu katı maddelere; iyon değiştiriciler denir. İyon değiştiriciler inorganik veya organik olabilirler, inorganik olanlara örnek olarak kil ve zeolit verilmiştir. Organikler ise analiz işlemlerinde sık kullanılırlar ve "iyon değiştirici reçineler" olarak adlandırılırlar.

İyon değiştirici reçineler, iyonlaşabilen gruplar içeren polimer bileşiklerdir ve çoğunlukla küçük kürecikler veya granüller şeklinde bulunurlar. Katyon değiştirici reçineler ve anyon değiştirici reçineler olmak üzere ikiye ayrılmıştır.

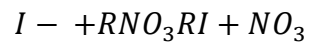
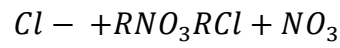
Katyon değiştirici reçinede, polimerin reçine bölümü anyonik karakterdedir ve polimere ait katyon çözeltideki başka bir katyon ile yer değişirmiştir. Anyon değiştirici reçinede ise reçine bölümü katyonik karakterde olmuştur. İyon değiştirici reçineler genellikle stiren ve divinil benzen kopolimerler olduğu görülmüştür. İyon değiştirici kromatografide stasyoner fazı reçine oluştururlar. Mobil faz ise sadece sıvıdan oluşmuştur. Bu yöntemde; analizlenen çözelti, mobil ve stasyoner faz arasında iyonik denge kurallarına göre dağılım göstermişlerdir.

İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılmıştır. Anyon değiştirme kromatografisinde, kolon içindeki sabit tabaka olan matrice kovalent bağlı iyonlar pozitif yüklüdür, bu iyonlar kolondan geçirilen çözeltideki anyonları kendine eker, çözeltideki anyonlar ayrılır, sadece katyonların ortamdaki çıktığı görülmüştür. Katyon değiştirme kromatografisinde ise, sistemle çözeltideki katyonların ayrıldığı, anyonların ortamdaki çıktığı belirlenmiştir (şekil 2.24).



Şekil 2.24. İyon değiştirme

Cl⁻ ve I⁻ karışımının nitrat bağlanmış anyon değiştirici RNO_3 ile bileşenlerine ayrılmasında geçerli dengeler aşağıdaki biçimdedir:



R: Çözünmeyen Matriks RNO_3 : Anyon Değiştirici

İyon değiştirmeyi etkileyen faktörler:

- Hareketli faz derişimi
- Hareketli faz pH'sı
- Kompleks oluşturuocu etki
- İyon değiştirme kromatografisinin uygulanması
- Ayrılması güç olan bazı iyonları ve asitlerin Aminoasitler

- Seyreltik iyon çözeltileri derişmede
- Asit ve baz elde edilmesinde



2.5.8. Jel geçirgenlik (Molekölere) kromatografisi

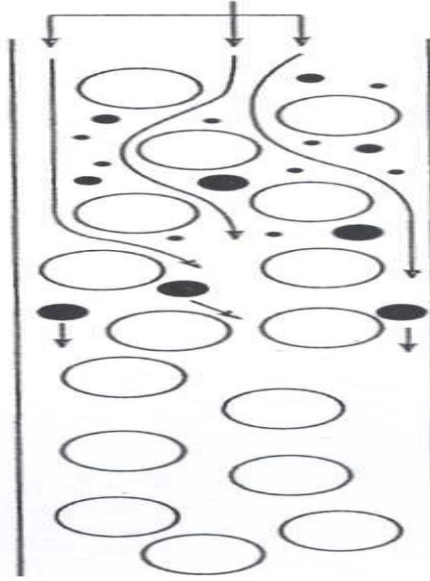
Bu yöntem, makro moleküllerin ayrılması yani karışımındaki moleküllerin molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayandırılmıştır. Stasyoner faz ile mobil faz aynı yapı ve bileşimdedir. Bu yöntemde stasyoner faz için destek görevi yapan poröz bir yapıya ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla hidrofilik veya hidrofobik jeller kullanılmıştır.

Hidrofilik jeller; Sulu solvan ile kullanılırlar ve sulu ortamda şişerler. Bu tür moleküler elemeye "Jel filtrasyon kromatografisi" denilmiştir. Özellikle protein çözeltilisinin tuzunu gidermek için biyokimya uygulamalarında sıkça kullanılmıştır.

Hidrofobik jeller; Organik solvan ile kullanılırlar. Bu kromatografik uygulamaya "Jel permeasyon kromatografisi" denilmiştir.

Kolon, jel boncuklar (belli büyüklüğe sahip ve karışımındaki bileşenlerle etkileşmeyen bir madde) ile doldurulmuştur (katı matriks).

Küçük moleküller, jel boncuklar arasındaki boşluklara girer, kolondan geç çıkarlar. Büyük moleküller, jel boncuklar arasındaki boşluklara giremez ve kolondan hızlı bir biçimde sürüklenerek önce çıktığı görülmüştür (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Jel Boncuklar

Kromatografik ayırma sırasında bozunması veya değişikliğe uğraması istenmeyen protein ya da enzim gibi biyolojik moleküllerin birbirinden ayrılması için kullanılan bir yöntem olmuştur. Bu yöntem ile polimerlerin molekül ağırlığı dağılımı da tayin edilmede kolaylık sağlamıştır. En büyük avantajı, biyomolekül karışımı saflaştırılabilmesidir. Bunun yanında yavaş ayrımı nedeniyle dezavantajıda bulunmuştur.

2.5.9. Kaynaşma (Affinite) kromatografisi

Enzim, hormon vb spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Kolonun dolgu maddesine, (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb) spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanmaktadır.

Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken; serbest proteinler kolonu terk ederler. Bağlı protein, daha sonra pH değişikliği/tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilirler. Seçiciliği fazla olan bu yöntem kromatografi tekniklerinin en yenisi olması açısından önem taşımaktadır .

gibi oldukça spesifik etkileşimlere dayandırılmıştır. Kaynaşma (affinite) kromatografisinde stasyonier faz olarak poliamid kullanılmıştır.

Analizi yapılacak karışımında bulunan fenoller veya nitro bileşikleri ile poliamid stasyonier faz arasında hidrojen bağlan oluşur ve böylece adsorbsiyon gerçekleşmiştir. Burada mobil faz çoğu kez sıvı, nadir olarak da gaz kullanılmıştır.

2.5.10. Faz tipine göre sınıflandırma

- Sıvı kromatografisi
 - Sıvı-Katı kromatografisi
 - Sıvı-Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
 - Gaz-Katı kromatografisi
 - Gaz-Sıvı kromatografisi

2.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure/Performance Liquid Chromatography) (HPLC)

Kromatografinin, bir karışım içindeki bileşenlerin biri sabit, diğeri hareketli iki faz arasındaki dağılım dengelerinin farklı oluşu esasına dayanan bir ayırma yöntemi olduğu belirtilmiştir.

HPLC esas olarak Gaz Kromatografisine (GK) benzetilmektedir. Ancak GK'de kullanılan gazın ayırmayı etkileyici bir özelliğinin bulunmamasına karşın HPLC'de mobil faz olarak kullanılan çözücülerin ayırmayı etkileyici özelliklerinin bulunması, GK'de sadece uçucu ya da uçucu hale gelebilen maddelerin analizi sağlanabilirken, HPLC'nin daha geniş bir kullanım alanına sahip olmasına çok iyi olanak sağlamıştır.

Sıvı kromatografi bir ayırma tekniği olmuştur. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerledikleri gözlenmiştir. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma, daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmiştir.

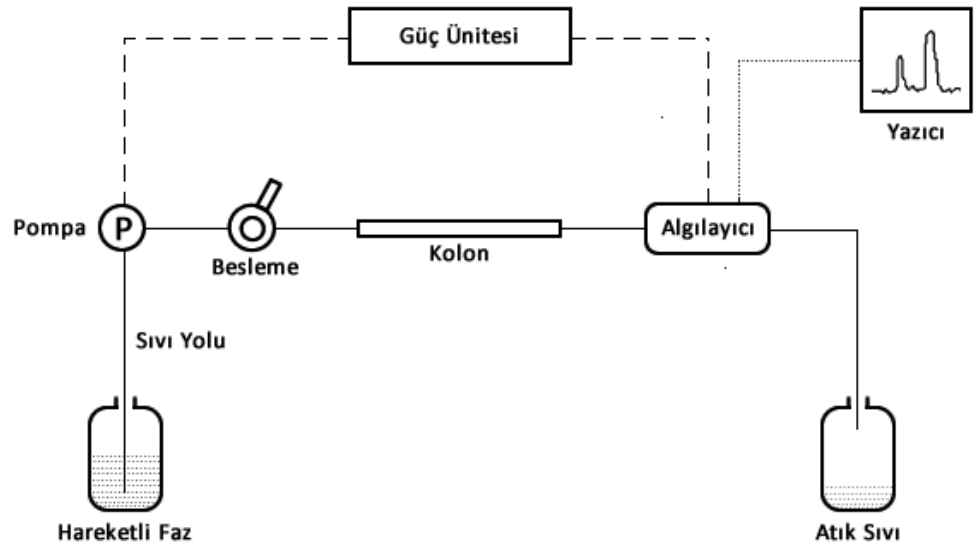
Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilmektedir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Sıvı kromatografi (HPLC) denilmiştir. HPLC günümüzde analitik kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için kullanılmıştır.

Diğer kromatografik tekniklerle karektarizasyonu zor olan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygun olmuştur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız olan bileşiklerle, yüksek polariteye sahip bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayrılabilirdikleri gözlenmiştir (Kimyasal. Net, 2014).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi Şekil 2.26'de görüldüğü gibi;

- 1-Hareketli/ Taşıyıcı Faz Deposu
- 2-Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa
- 3-Enjeksiyon Birimi
- 4-Ayırma Birimi ; Kolon
- 5-Ölçüm Birimi; Dedektör
- 6-Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör
- 7-Atık Deposu

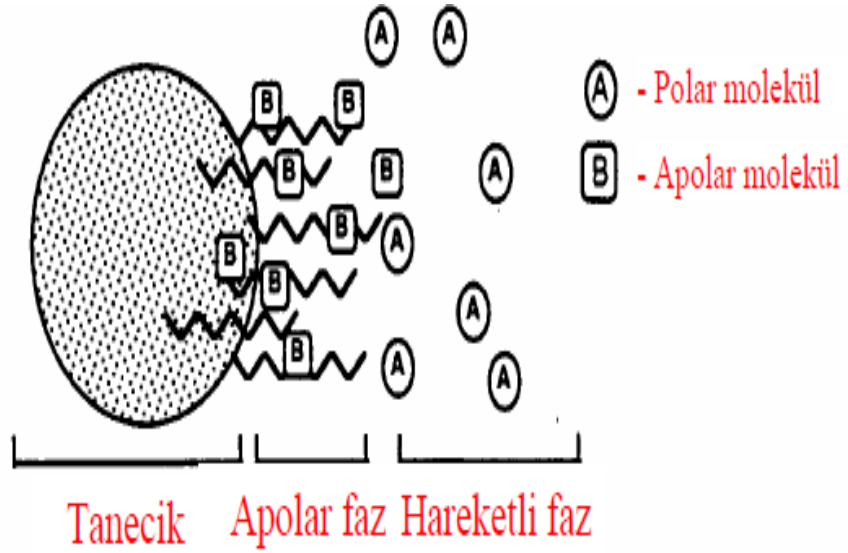
birimlerden oluştuğu belirtilmiştir.



Şekil 2.26. HPLC cihazının şeması

Normal faz HPLC’de sabit faz olarak silikajel gibi polar dolgu maddesi, hareketli faz olarak ise n-hekzan veya tetrahidrofuran gibi apolar çözücüler kullanılmıştır. Böylece polar örnekler sabit fazda daha çok tutunarak apolar bileşenlerin kolay ayrılmaları sağlanmıştır (Şekil 2.27).

Ters faz HPLC’de sabit faz olarak hidrofobik apolar bir dolgu maddesi, hareketli faz olarak ise su ve metanol veya asetonitril gibi çözücü karışımları kullanılmıştır. HPLC’ nin tüm tiplerinde çözücü polaritesi olarak en büyük olan rolü oynamıştır.



Şekil 2.27. Polar örneklerin sabit fazda polar bileşenlerinden ayrılması

İki elüent tipi bulunmaktadır: izokratik ve gradient. Birinci tipte aynı çözücü karışımı tüm analiz boyunca kolona pompalanırlar. İkinci tipte ise analiz boyunca çözücü bileşimi değiştirilmektedir.

HPLC, analitik, yarıpreparatif ya da preparatif amaçlı olarak kullanılmıştır. Analitik amaçlı HPLC çok küçük miktardaki örneklerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Ayırma işleminin, örneğin bileşimi hakkında bilgi verdiği görülmüştür.

Yarı preparatif amaçlı olarak HPLC genellikle 1 – 100 mg’lık örneklerin son saflaştırılmasında kullanılırlar. Preparatif amaçlı HPLC 5 – 200 cm çaplı kolonlarda yüksek miktardaki karışımların birbirinden ayrılması için kullanılmıştır (Erdemoğlu,1999; Yılmaz,2002).

Bir HPLC analizinin başarısı, büyük oranda doğru çözücü sisteminin belirlenmesine bağlanmıştır . HPLC’de kullanılan bazı çözücüler çizelge 2.4’de verilmiştir.

HPLC’de kullanılacak çözücünün sahip olması gereken fiziksel özellikler şunlardır:

1. Kaynama noktaları fazla yüksek olmamalıdır ki çözücü daha sonra kolay uzaklaştırılabilsin.
2. Kolonda yüksek basınç oluşmaması için viskoziteleri düşük olmalıdır.
3. Kullanılan dedektörle uyumlu olmalıdır, analiz yapılacak numunenin sinyalini engellememelidir.
4. Mümkün olduğunca güvenli bir kimyasal olmalı, toksitesi düşük olmalıdır.

Çizelge 2.4. HPLC’de kullanılan bazı çözücüler ve özellikleri

Çözücü	Kaynama Noktası (°C)	Viskozite (cp)	Polarite (p)	Kırılma indisi
Hekzan	69	0,31	0,1	1,376
Diklorometan	40	0,44	3,1	1,424
Etil asetat	77	0,43	4,4	1,372
Kloroform	61	0,57	4,1	1,446
Tetrahidrofur	66	0,55	4,0	1,407
Asetonitril	82	0,38	5,8	1,344
Metanol	65	0,55	5,1	1,328
Su	100	1,00	10,2	1,333

HPLC’de elüent olarak genellikle iki ya da daha fazla çözücünden oluşan bir karışım kullanılmıştır. Bu karışımlarda da sıklıkla belli oranlarda zayıf çözücü olarak su ve kuvvetli çözücü olarak da tetrahidrofuran, metanol ve asetonitril gibi organik çözücüler tercih edilmiştir. Seçicilik parametresi, bu çözücü oranları veya bileşimi değiştirilerek kolaylıkla iyileştirilme sağlanmıştır.

Ters faz kromatografisinin avantajları:

1. Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olmuştur.
2. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır.
3. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.
4. Apolar çözücüler çok pahalıdır, ayrıca nemden uzak tutmak zordur.

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan *yüksek performanslı sıvı kromatografisi* (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmıştır. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanmasına ihtiyaç duyulmuştur.

HPLC’nin avantajları:

1. HPLC kolonu, rejenerasyon gerekmeksizin pek çok kez kullanılabilir.
2. HPLC tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
3. Nicel analiz kullanılabilir.
4. Analiz süresi kısadır.
5. Duyarlık yüksektir.

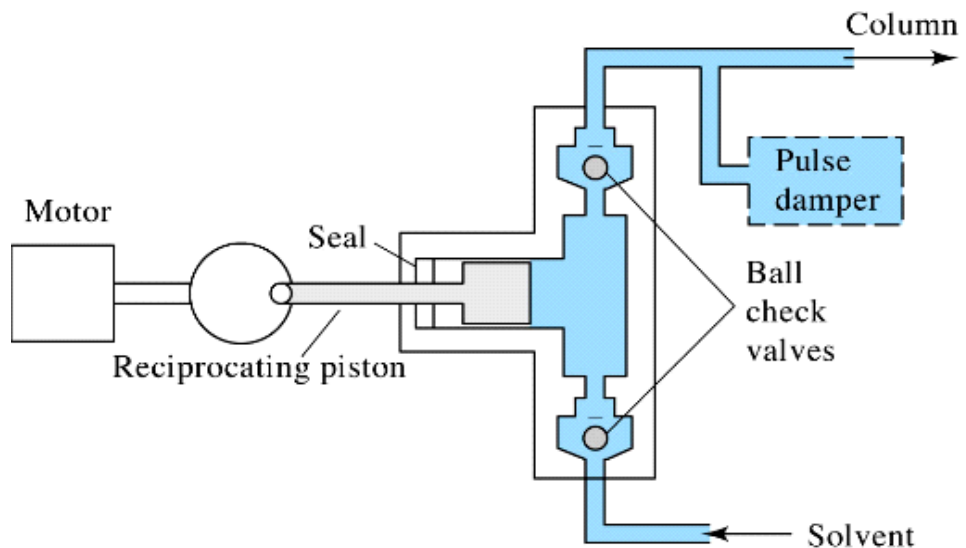
2.6.1. Pompalar

HPLC cihazlarının çoğundaki pompaların çıkış basıncı 1000 psi (libre/inc²) den büyüktür, dakikada 3 mL hızla akış sağlayan 4000-6000 psi lik pompalar tercih edilmiştir. Akış hızı % 2 lik bir toleransla sabit olmalıdır. Bu amaçla kullanılabilen iki mekanik pompa tipi bulunmakta olduğu görülmüştür. Bunlar:

- Vidalı (screw-driven) şırınga tipi pompalar
- Pistonlu pompalar

Birinci tip pompalarda kolaylıkla kontrol edilebilen, darbesiz bir akım alınır; ancak kapasitede düşme ve çözgen oranlarının değiştirilmesinde sorunlarla karşılaşmıştır. Pistonlu pompaların kullanım alanları daha geniş, kademeli olarak azaltılan miktarlarda darbeleri bir akım verilmiştir.

Pistonlu pompaların avantajı istenildiği kadar çözgen basabilmesidir; ayrıca iç hacminin küçük olması dereceli sıyırma işlemi için ideal bir durum haline geldiği görülmüştür (Şekil 2.28).



Şekil 2.28. Bir pistonlu pompanın şematik görünümü

HPLC cihazlarında pnömatik pompalar da kullanılabilir; en basitinde hareketli faz, sıkıştırılmış hava ile basınçlandırılan bir kabın içindeki portatif bir rezervuarda bulunmaktadır. Basittir, ucuzdur ve darbesiz akım verirler; kapasiteleri ve çıkış basınçları sınırlıdır, çözgenin viskozitesine göre akış hızı değişmektedir. Ancak dereceli sıyırma işlemi için uygun olmadığı görülmüştür.

Pompalarla yüksek basınçlara çıkılmasının herhangi bir tehlike yaratmayacağını belirtmek gerekir, sıvılar fazla sıkıştırılmadıklarından sistemin bir parçasında meydana gelebilecek kopma veya açılma sadece çözgen sızıntısına yol açmakta olduğu görülmüştür (West, 1981).

2.6.2. Enjektörler (Örnek giriş sistemleri)

HPLC donanımını oluşturan enjektör analizlenecek örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılmaktadır. Sabit olduğu sarmal sayesinde insan faktöründen kaynaklanan enjeksiyon hacmi hata oranı sıfıra çekilmiştir elle kumanda edilen manuel ve bilgisaya kumandalı otomatik enjektörler olmak üzere farklı çeşitleri bulunmaktadır. Enjektörlerin 2 tipi vardır. Bunlar;

1-Valf Enjektörler

2- Şırınga Enjektörler dir.

2.6.2.1. Valf enjektörler

Paslanmaz çelikten yapılmış boru şeklindeki bir üniteye bağlanan ve açılıp kapanabilen valflerden ibaret olup küçük bir boru yardımı ile kolon başına bağlanmıştır. Valf enjektörler dayanıklı olup daha az bakım gerektirdiğinden dolayı ve bu nedenle rutin ilaç analizlerinde fazlaca kullanılmaktadır.

2.6.2.2. Şırınga enjektörler

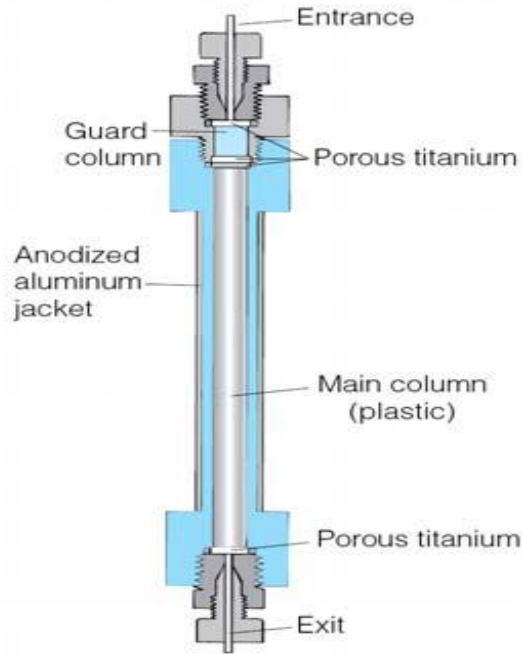
Enjeksiyon aleti doğrudan kolon başına bağlanmıştır. Kolon başında 5-10 mm derinliğinde cam tanecikleri ile dolu bir bölüm bulunmaktadır. Kolondaki dolgu materyali ile bu cam tanecikler arasında paslanmaz çelikten yapılmış bir ağ tabakası yerleştirilmiştir. Örnek cam tanecik tabakası içine bir şırınga ile verilmektedir. Valf enjeksiyondan biraz daha iyi bir kolon etkinliği verdiği görülmüştür (West, 1981).

2.6.3. Kolonlar

Dolgu Materyali ve Taşıyıcı olmak üzere iki kısımdan meydana gelir.

Dolgu Materyalinin; partikülyüzeyi ve partikül büyüklüğü,

Taşıyıcı kısmın ise; uzunluğu, çapı ve üretildiği materyalin ayırma üzerinde etkileri olduğu görülmüştür. Paslanmaz çelik ve plastikten yapılanları vardır. Genellikle bunlar yüksek basınca dayanıklı malzemeden yapılmışlardır (Şekil 2.29).



Şekil 2.29. HPLC ön ve ana kolonun şematik görünümü

Analitik amaçlar için kullanılan kolonların en küçüğü 5 cm, en büyüğü ise 150 cm uzunlukta olabilmekte, bunların çapları da 1-8 mm arasında değişmektedir. Kısa kolonlarda çalışmak retansiyon zamanını azaltacağından hızlı analiz gerektiren durumlarda tercih edilmektedirler (Şekil 2.30).



Şekil 2.30. HPLC’de kullanılan farklı çaplarda kolon örnekleri

Preparatif çalışmalarda kullanılan kolonların çapları daha geniş olabilmekte, örneğin; uzunluğu 30 cm, çapı 57 mm olan bir preparatif kolonla 1-1000 g arasında madde ayrılabilirdiği tespit edilmiştir.

Pahalı analitik kolonların ömrünü uzatmak için *iki tip koruyucu kolon* kullanılmaktadır (Şekil 2.31). Bu koruyucu kolonlardan ilki, pompa ile enjektör arasında yer almakta, dolgu materyali olarak silica içermekte ve *ön kolon (precolumn)* adını almıştır. Mobil fazın bu kolondan geçirilmesi silica ile doyurulmasını sağlar ve böylece analitik kolon içindeki dolgu materyalinin mobil fazdaki çözünürlüğü azalttığı görülmüştür.

Koruyucu kolonların ikincisi ise enjektör ile analitik kolon arasına yerleştirilen ve iç çapı analitik kolona eşit olan 2-10 cm uzunluğundaki *koruyucu kolondur* olduğu görülmüştür. Bu kolon, örnek içindeki parçacıkları ve safsızlıkları tutmak suretiyle bunların analitik kolondaki dolgu materyaline bağlanmasına engel olmuştur (West, 1981).



Şekil 2.31. Farklı malzemelerden yapılmış kolon örnekleri

Durgun Faz; Kolon Dolgu Materyali: HPLC durgun fazın kolon içindeki katı destek maddesidir. Örnek solüsyonunun, kolona enjeksiyonu ile non-kovalent etkileşim olmaksızın durgun fazda bileşenlerin göçü söz konusu olmuştur.

Durgun faz ve örneğin hareketli faz ile kimyasal etkileşimleri, göç derecede ve örnek bileşenlerin ayrılmasını belirlemektedir. Uygulanacak kromatografi türünün prensibine göre kolon dolgu maddelerinin de farklı olduğu belirtilmiştir (West, 1981).

Kolonların doldurulması: HPLC kolonları; değişik dolgu materyali yapılarında ve boyutlarda ticari firmalardan temin edilebilirler. Ancak birçok araştırmacı ucuz olması nedeniyle kendi kolonlarını doldurmayı tercih etmişlerdir. Kolon doldurulmasında kullanılacak metot, dolgu materyalinin tabiatına ve partikül büyüklüğüne bağlı olduğu tespit edilmiştir.

HPLC kolonlarında en fazla kullanılan dolgu maddesi mikroporöz silikadır. Alumina ve Celite (diyatome toprağı) de çok kullanılan maddelerdir. Dolgu maddelerin tanecik büyüklüklerinin 1,5-10 mikrometre aralığında olması istenmiştir (West, 1981).

2.6.4. Dedektörler

Kolonda ayırımı yapılan analizlenecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinden geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı HPLC donanımı olmuştur. Kullanılacak dedektörün türü analizlenecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmesi önemlidir. Dedektörler ölçümünü yaptıkları, analizlenecek maddeye ait, fiziksel özelliğe göre şu şekilde sınıflandırılırlar: Dedektörler, Kolondan elüe olan örnek bileşeninden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan bir alet olduğu görölmüştür. Dedektörler kolon sonrasında monte edilir (Şekil 2.32).

Dedektörler ikiye ayrılırlar:

1-Üniversal Dedektörler,

2-Seçici Dedektörler

Seçici dedektörlerden, *Fluoresans, Elektrokimyasal ve UV-Visible Dedektörler*, Üniversal dedektörlerden de, *Refraktif İndex Dedektörleri* en fazla kullanılan dedektörler arasında yer almıştır.

Üniversal dedektörler, kolondan çıkan bileşiklerin tümüne karşı duyarlı dedektörler arasında yer almıştır. Seçici dedektörler ise elüe edilen bileşiklerin sadece bir kısmına duyarlı ve bu nedenle de daha yüksek hassasiyete sahip olan dedektörler olduğu belirlenmiştir.

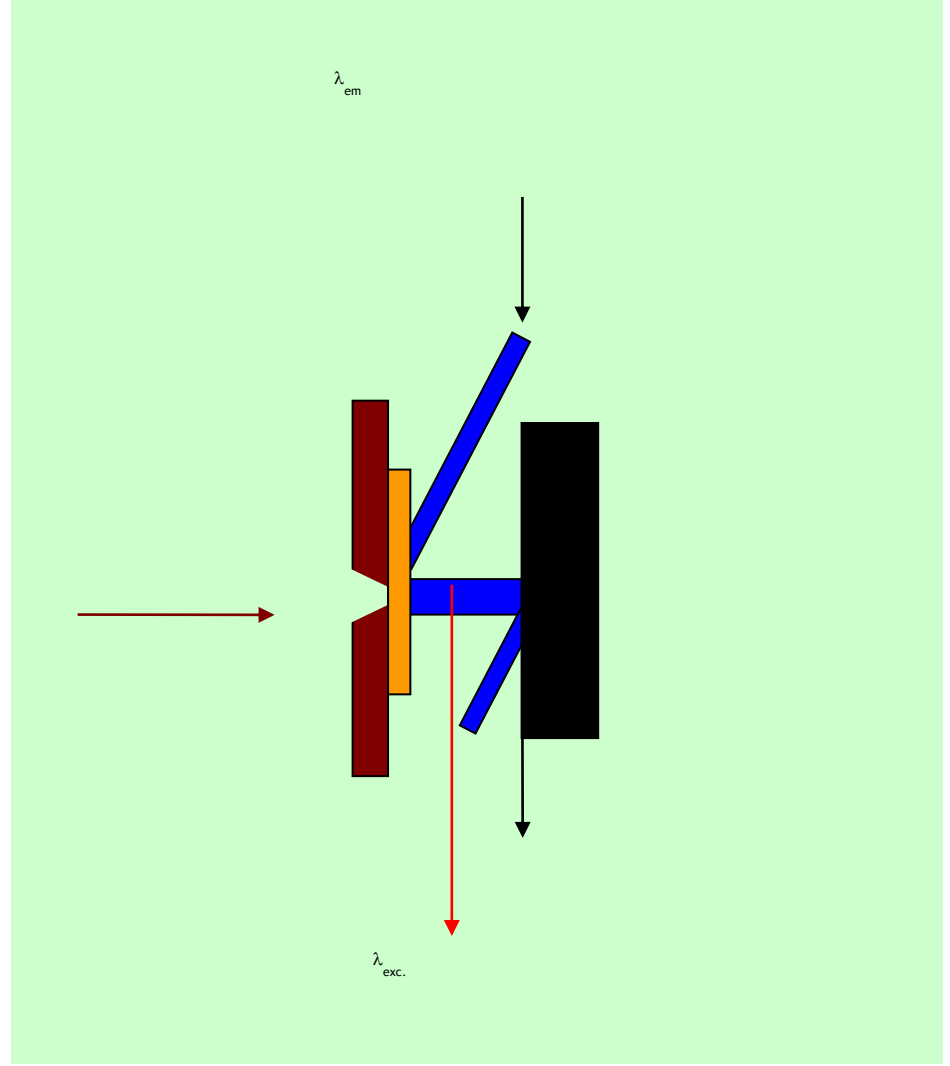


Şekil 2.32. HPLC’de kullanılan dedektör

2.6.4.1. Flouresans dedektörler

Monokromatik UV ışınlarına maruz bırakılan bazı bileşikler bu ışınları absorbe ederek dalga boyu daha uzun olan farklı bir ışık yayarlar. Fotolüminesans olarak bilinen bu olay ışığın absorpsiyonu ile tekrar yayılması (emisyon) arasındaki sürenin 9 sn’den daha az olması durumunda flouresans adını almıştır (Şekil 2.33). Uyarma (Eksitasyon) kaynağı olarak döteryum ya da ksenon ark lambaları olarak kullanılmıştır. Kendiliğinden flouresans gösteren bileşiklerin sayısı az olduğundan bu tür dedektörlerle tayini yapılabilen bileşiklerin sayısı da az olmuştur.

Bununla birlikte, yapılarında uygun gruplar bulunan bazı bileşikler fluoresan hale getirildikten sonra bu dedektörlerle saptanabilirler. Fluoresans dedektörlerle 10-100 pikogram konsantrasyonlarda analiz yapılmıştır.



Şekil 2.33. Flouresans dedektörler

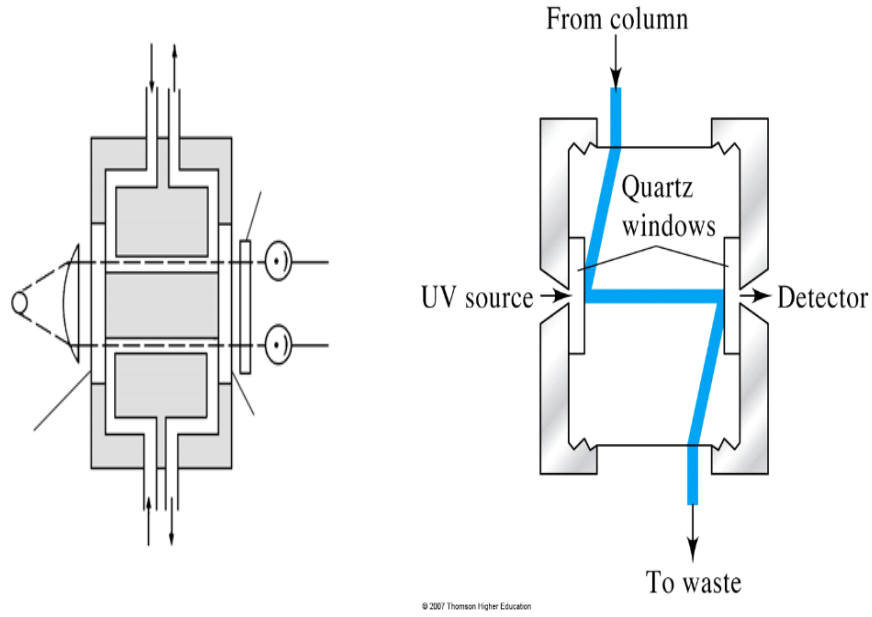
2.6.4.2. Elektrokimyasal dedektörler

Kontrollü potansiyel koşullarda elektrokimyasal olarak değişikliğe uğrayabilen bileşikler, bir elektrod yüzeyinde elektrolitik oksidasyon ya da redüksiyon geçirebilir. Bu dedektörlerle ayırım yapabilmek için mobil fazın elektriği iletebilmesi gerekmektedir. Bu iletkenlik, *organik mobil fazlar* için; *tetraalkilamonyumperklorat*, *sulu fazlar* için ise; *potasyum nitrat* gibi inert elektrolitlerin 0,05-0,1 M konsantrasyonlarda ilavesi ile sağlanmaktadır. Bu dedektörler, pek çok ilacın oksidatif yolla tayininde kullanılabilmektedir. Örneğin; morfin, parasetamol, fenotiyazinler, trisiklik antidepresanlar, haloperidol, salisilik asid vb. deki gibidir.

Redüktif yolla analiz ise, mobil fazda çözünmüş olan oksijenin uzaklaştırılmasını gerektirdiği için daha zor olduğu görülmüştür. Elektrokimyasal dedektörlerle 50-100 pikogram konsantrasyonlardaki analizlerin yapılması açısından önemli olduğu belirlenmiştir (West, 1981).

2.6.4.3. Ultraviyole ve görünür ışık dedektörleri

En çok kullanılan dedektörler, ultraviyole veya görünür ışın absorpsiyonuna dayanan dedektörler olmuştur. Küçük bir akış hücresi (flow-cell) taşıyan ve bu hücrenin içinden geçerken maddeler tarafından absorblanan UV radyasyonu ya da görünen ışığı saptayabilen detektörlerden oluşmuştur. Akış hücresinin uzunluğu 5-10 mm, hacmi 5-10 mL arasında değişmektedir. *Sabit* ve *değişken* dalga boylu dedektörler olmak üzere ikiye ayrılmıştır (Şekil 2.34).



Şekil 2.34. HPLC’de kullanılan ultraviyole dedektörler

Sabit dalga boylu dedektörlerin en basiti, ışık kaynağı olarak 254 ve 280 nm’de radyasyon veren cıva-ark lambalarının kullanıldığı dedektörler olduğu belirlenmiştir. Ancak, 254 nm’de absorpsiyon göstermeyen bileşikler için 280-660 nm arasında (örneğin; 280 nm, 313 nm, 365 nm, 405 nm, 546 nm ve 660 nm) sabit dalga boylarında emisyon yapan uygun lambalar kullanılmıştır.

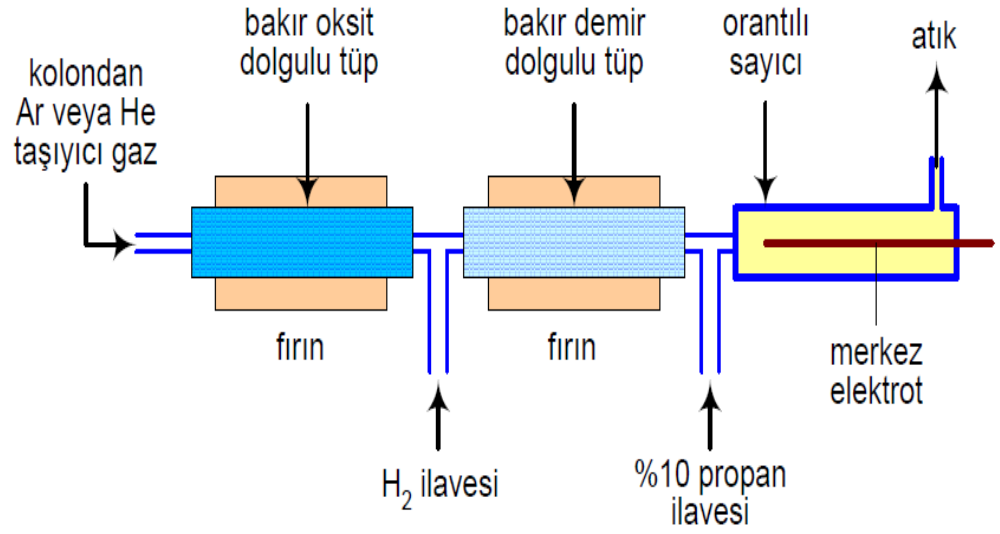
Değişken dalga boylu dedektörler ise, 180-400 nm arasında sürekli radyasyon verebilen döteryum lamba ya da 400-700 nm arasında ışık verebilen tungsten lamba içeren ve istenilen dalga boyunu seçmek için monokromatör taşıyan fotometrelerden meydana gelmiştir. Maddenin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler hassasiyeti artırdıkları için son derece önemli oldukları görülmüştür (West, 1981).

2.6.4.4. Refraktif indeks dedektörleri

Madde içermeyen, mobil fazın refraktif indeksi ile madde içeren mobil fazın refraktif indeksi arasındaki farkın (+) ve ya (-) değişimlerini saptayan dedektörlerden meydana getirilmiştir. Duyarlılıkları az olması nedeniyle ilaç analizlerinde sınırlı kullanıma sahip dedektörlerdendir. Farmasötik preparatlarda, ancak UV'de uygun absorbsiyon vermeyen yardımcı maddelerin (örneğin şekerler) analizleri için kullanılabilirler.

Refraktif indeks dedektörü en az hassas sıvı kromatografisi dedektörüdür; çevre sıcaklığı, basınç, akış hızı değiştiğinde dedektörün algılaması da değişmektedir. Çeşitli dezavantajlarına rağmen, refraktif indeks dedektörleri, noniyonikler, UV bölgede absorbsiyon yapamayan maddeler ve flüoresans olmayan bileşikler için çok uygun dedektörlerdendir. Refraktif indeks dedektörleri çeşitlidir; diferansiyel refraktif indeks, Fresnel metodu, Christiansen etki, interferometre, termal lens, dielektrik sabiti dedektörler gibi. Şekil 2.35'de bir diferansiyel refraktif indeks dedektörünün şematik diyagramı verilmiştir. Burada çözgen ve analit çözeltileri bir cam levha ile birbirinden ayrılmıştır. Cam levha, iki çözeltinin refraktif indeksleri birbirinden farklı olduğunda gelen ışının sapmasını sağlayacak bir açı ile yerleştirilmiştir. Bir ışık demeti, optik maskeden geçerek hücre bölmesine gelmesi ile oluşmuştur.

Mercekler demeti yönlendirerek örnek ve referans hücrelerden geçmesini ve düz aynaya gelmesini sağlarlar. Ayna, demeti yansıtarak tekrar örnek ve referans hücrelerine gönderirler. Mercekten geçen demet, bir fotosel üzerine odaklanmaktadır. Demetin yerini şiddeti değil, açısal sapması belirler; sapma, iki hücredeki maddeler arasındaki refraktif indeks farkının bir sonucu olarak oluşmaktadır.



Şekil 2.35. Refraktif indeks dedektörleri

Fotoelektrik hücrede demetin odak konumu (yeri) değiştiğinde çıkış da değişir ve fark sinyal elektronik olarak modifiye edilerek örnek hücresindeki madde konsantrasyonuyla orantılı bir sinyal şekline dönüştürüldüğü tespit edilmiştir (West, 1981).

HPLC için ideal bir dedektör; geniş konsantrasyon aralığında; yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, bilinen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olması gerekmektedir. Böyle bir dedektör, sıcaklık ve basınçtaki değişmelere karşı duyarsız olması gerektiği görülmüştür.

Kullanılacak dedektör sistemi, analizi yapılacak numunenin cinsine uygun olmalıdır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektörler, ultraviyole veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanması açısından önem taşımıştır (West, 1981).

2.7. HPLC'nin Kullanım Alanı

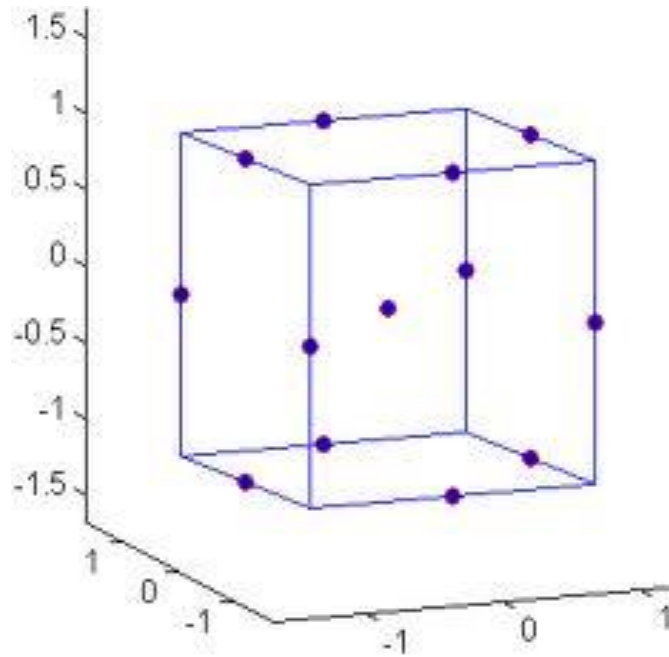
İlaç, gıda, kozmetik vb. endüstrilerde hammaddenin ve üretimin belirlenen standartlara uygun olup olmadığının kontrolü için birtakım analizlere ihtiyaç duyulmuştur. Örnek olarak ilaç endüstrisinde, ilaçların kalitesini doğrudan etkileyen ilaç etken maddeler, koruyucu maddeler ve safsızlıkların miktar tayin analizleri için, gıda endüstrisinde ise koruyucu, tatlandırıcı, renklendirici, vitamin vb. analizlerde sıvı kromatografik yöntemlerin kullanımları yaygın olmaktadır. İlaç etken maddesinin hızlı, duyarlı ve güvenilir analizini yapmaya yarayan bir yöntem olduğu görülmüştür. Bu yöntemle saflık ve kalite kontrolü, stabilite tayini ve reaksiyon sırasında reaksiyon ara ve sonuç ürünlerinin saptanması ile enansiyomer ayırımları sağlanabildiği tespit edilmiştir. Biyolojik materyallerde ilaç ve ilaç metabolitlerinin analizine de olanak sağlayan bu yöntemde, plazmadaki ilaç düzeyinin saptanması, doz ayarlanması ve biyo ayarlılık gibi konularda çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. HPLC'nin kullanım alanları

Uygulama Alanı	Karışımlar
İlaçlar	Antibiyotikler, sedatifler, steroidler, analjezikler
Biyokimyasallar	Amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipitler
Gıda Maddeleri	Suni tatlandırıcılar, antioksidanlar, alfatoksinler
Endüstriyel Kimyasallar	Çok halkalı aromatikler, boyalar, yüzey aktif maddeleri
Kirleticiler	Pestisitler, herbisitler, fenoller, PCB'ler
Uyuşturucular	Uyuşturucu ilaçlar, zehirler, narkotikler
Klinik Tıp	Safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre ekstraktları

2.8. Box-Behnken Design Expert Programı

Box-Behnken tasarımı bir faktöryel veya kısmi faktöryel tasarım içermediği gibi bağımsız ikinci dereceden bir tasarım model uygulaması olmuştur. Bu tasarımda değişkenlerin kombinasyonları işleminde, alan kenarlarının orta noktaları ve merkezindeki noktalarda yer almaktadır. Köşelerdeki noktaların yakın tahmin belirsizliği merkezi kompozit tasarımına göre yapılmıştır. Bu tasarımlar döndürülebilir (ya da dönebilen yakın) ve her bir faktörün 3 düzeylerine ihtiyaç duyulmaktadır. Tasarımları, merkezi kompozit tasarımlara göre dik engelleme sınırlı yeteneği olduğu görülmüştür. Bu tasarımın geometrisinde, işlem alanı içinde bir küre modeli gösterilmektedir. Kürenin yüzey alanı her bir kenarının orta teğet kürenin yüzeyi ile her bir yüze taşacak şekilde oluşturulmuştur (Şekil 2.36).

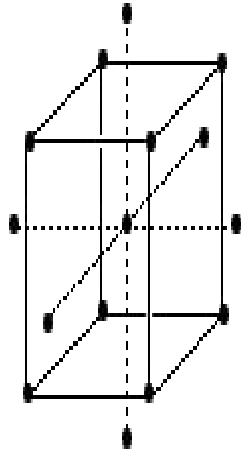


Şekil 2.36. Faktör için Box-Behnken Design geometrisi

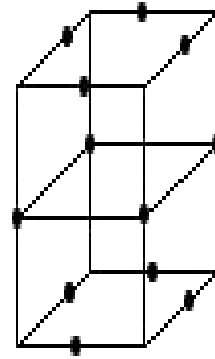
Tepki yüzey yöntemi (RSM) çevrede bulunan bir sorumlu çok değişkenli ile etkilenmektedir. Amaç, bu sorumlu optimize değeri elde etmektir. Bağımsız değişkenleri modellemeye ve bağımlı değişkenlerin analizi için yararlı matematiksel ve istatistiksel teknikler topluluğunu oluşturmaktadır.

Şekil 2.37’de gösterdiği gibi Box-Behnken tasarımı, merkezi kompozit bir alternatif tasarım modeli olmuştur. Box-Behnken tasarımın bir ayırt edici özelliği, faktör başına sadece üç ve daha fazla düzeyde bağımsız değişkenlerin olmasıdır. İki tasarım türleri arasındaki bir diğer önemli farkta, Box-Behnken tasarım hiçbir nokta olmadan da küpün köşe faktörlerinin aralıkları ile tanımlanır. Bundan dolayı uygulamada tercih edilmektedir. Bu kimi zaman kullanışlı olmakla birlikte mühendislik noktalarında yeterli sonuçları vermediği için uygulanmamaktadır. Bu özelliğinden dolayı fiyatı çok yüksektir.

Central Composite Design



Box-Behnken Design



Şekil 2.37. Response Surface Designs

Box-Behnken tasarım dengeli blok tasarımları yapımına dayalı ve her faktör için en az üç düzeye gerek duyulmaktadır. Diğer faktörlerin her seviyedeki kombinasyonları (Myers ve Montgomery, 2002) uygulansa da, Box-Behnken deneysel tasarımı olarak, faktörlerden birinin seviyesi orta düzeyde sabitlenerek model oluşturulmuştur.

Deneysel tasarım seçimi, deney ve araştırılması gereken faktörlerin sayısına ve hedeflenen noktalara bağlı olmalıdır. Tasarımların türlerini karşılaştırmak, deneysel çalışmanın amacına göre değişiklik göstermektedir. Karşılaştırmanın amacı: Deneysel çalışmanın kapsamında bir veya birkaç sorumlu faktör bulunacak. Ancak deneyin birinci amacı önemli faktörse ve ilgili sorumlu faktörün "önemli" olup olmadığını ya da önemsizse, (bu faktörün farklı düzeylerdeki uygulamalarda yanıt olarak önemli bir değişiklik olup olmadığını), o zaman karşılaştırmalı sorun var ve ihtiyacımız için karşılaştırmalı bir tasarım modelinde çözüm noktası olduğu belirlenecektir.

Sonuçların analiziyle ilgili ANOVA analizi olarak "saf ikinci dereceden" eğrilerin (yani merkezinde sorumlu değişkene ait yaklaşık faktöryel çalışma yanıtlarının ortalamasına eşittir) olduğu değerler ortaya çıkmaktadır. Aslında kullanılan tasarım matrisi modelini uygulamak için kullanılabilir. Faktörün sınırlarını ayarlama iyi sonuç veren değerler elde edilmektedir. Diğer durumlarda, modelin uygulanmasını açıklamada tam bir kuadratik veya kübik modele ihtiyaç duyulmuştur.

İkinci dereceden denklem;

Bağımsız değişkenler, $X_1, X_2, \dots, X_k$ olarak ifade edilir. Bağımsız değişkenlere bağlı olarak değişim gösteren değişken Y ; β_0, β_i ($i=1,2,\dots,k$), β_{ii} ($i=1,2,\dots,k$), ve β_{ij} ($i=1,2,\dots,k; j=1,2,\dots,k$) kesişim, doğrusal kuadratik ve etkileşim açısından sırasıyla regresyon katsayıları olan değişkenlerin sayısını göstermektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (2.7)$$

Bizim bir deney için kodlanmış bağımsız değişkenlerimiz katı /solvent oranı, pH , ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı vardır.

Box-Behnken design modellemesinde 3 faktör yani -1,0,+1 kullanılması uygun görülmüştür. Bu program üst nokta için +1, alt nokta için -1 ve orta nokta için 0 olarak ifade edilmektedir. Box-Behnken design programı bağımsız değişkenlerin değerlerinin kullanılan bağımlı değişkenle olan etkileşimini araştırmaktadır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

Haşhaşlar 2012 Temmuzun hasat döneminde Afyon Alkoloid fabrikası tarlalarından toplandı. Kapsüller kırılarak tohumlarından ayrıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 10 gün süreyle kurutuldu. Kurutulmuş haşhaş kapsülleri blender’da öğütüldü.

Öğütülmüş haşhaş kapsülleri A060-01 Motorlu Elek Sallama 230 V, 50 Hz ve 110 W gücünde elek sistemi ile aşağıdaki tane boyutlarına ayrıldı (Şekil 3.1).

Boyutlar:

- 38 μ m = 0,038mm
- 75 μ m = 0,075mm
- 106 μ m = 0,106mm
- 150 μ m = 0,15mm
- 300 μ m = 0,3mm
- 500 μ m = 0,5mm

Çalışmanın bütün aşamalarında 80-100 mesh (150 μ m) tane boyutlarındaki haşhaş kapsül tozları kullanıldı. Deneysel çalışmalarda analitik saflıkta kimyasallar, analizlerde HPLC saflığında kimyasallar kullanıldı. Mobil fazı filtre etmek için 0,45 μ m membran (Milipore, Bedford, MA, USA) filtre kullanıldı. Tüm alkoloid standartları % 99 ve üzerinde saflıkta idi ve morfin analiz metodu Afyon alkoloidleri fabrikasından temin edildi. Analitik saflıktaki sodyom hidroksit ve klorük asit Merck firmasından satın alındı.



Şekil 3.1. Öğütülmüş haşhaş kapsülleri

Metanol (CH_3OH): Ekstraksiyon ve analizlerde mobil faz yapımında kullanılmıştır. Merck firmasından (Katolog no: 106018, 822283) temin edilmiştir. % 99,8 saflıktadır.

Asetikasit (CH_3COOH): Analizlerde mobil faz yapımında kullanılmıştır. Merck firmasından (Katolog no: 101830) temin edilmiştir. % 99,7 saflıktadır.

Etanol (C_2H_5OH): Ekstraksiyon ve analizlerde mobil faz yapımında kullanılmıştır. Merck firmasından (Katolog no: 111727, 818760) temin edilmiştir. % 99,9 saflıktadır.

Asetonitril (CH_3CN): Analizlerde mobil faz yapımında ve soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak kullanılmıştır. Merck firmasından (Katolog no: 113358.2500) temin edilmiştir. % 99,9 saflıktadır.

Amonyak (NH_3): Ultrasonik ekstraksiyonda kullanılmıştır. Merck firmasından (Katolog no: M1054322500) temin edilmiştir. Analizler için % 25,0 saflıktadır.

Glasial asetikasit (CH_3COOH): Kromatografik analizler için olarak kullanılmıştır. Merck firmasından (Katalog no: 100063) temin edilmiştir. % 100 saflıktadır.

Kloroform ($CHCl_3$): Ultrasonik ekstraksiyonda çözücü kullanılmıştır. Merck firmasından (Katalog no: 102445) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Amonyum hidroksit (NH_4OH): Analizlerde mobil fazı hazırlamada çözücünün pH değerini 4'e ayarlamak için kullanılmıştır. Merck firmasından (katalog no: 105432) temin edilmiştir. % 25 saflıktadır.

Hidroklorük asit (HCl): Alkali ekstraksiyon solventlerin hazırlanması işlemlerinde kullanılmıştır. Merck firmasından (katalog no: 100319) temin edilmiştir. % 32 saflıktadır.

Sodyum Hidroksit ($NaOH$): Ekstraksiyon pH'ını belirleme çalışmalarında kullanılmıştır. Merck firmasından (katalog no: 106482) temin edilmiştir. % 98 saflıktadır.

Rotary Evaporatörü

Soxhlet ekstraksiyonu sonucu, çözücünün uzaklaştırılması işleminde kullanılmıştır. Heidolph marka döner buharlaştırıcı kullanılmıştır.

Terazi

Tüm tartım işlemlerinde Metler-Toledo marka hassas terazi kullanılmıştır.

Ultrasonik Banyo

Ultrasonik ekstraksiyonu işlemleri Bandelin Sonorex marka 50 Hz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Soxhlet Aparatı

Morfin verimi'nin Soxhlet ekstraksiyonu 45/40 boyutunda NS marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Blender

Haşhaş kapsüllerini öğütme işleminde Philips marka HR1371-90 blender kullanılmıştır.

Elek

Öğütülmüş kapsülü tane boyutlarına ayırmak için A060-01 Motorlu Elek Sallama 230 V, 50 Hz ve 110 W gücünde elek sistemi kullanılmıştır.

Etüv

Analizlerde kullanılacak standartları Binder marka etüv kullanılarak kurutulmuştur.

Manyetik Karıştırıcı: Manyetik karıştırma işlemleri IKA marka RW 20 model manyetik karıştırıcı kullanılarak yapılmıştır.

Saf su cihazı: Millipore Milli-Q Integral 15 ultra saf su sistemi kullanılmıştır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Alkoloidlerin tanımlanması ve miktar analizi Agilent 1260 kromatografik sistem multi-wavelength dedektör, kolon bölümü, dörtlü pompa ve otomatik örnekleyici içermektedir. Kromatografik ayırma XBridge Phenyl 3,5 µm; 3,0 x 150 mm kolon (su corp., Milford, MA) kullanılarak yapılmıştır. Multi-wavelength dedektör 284 nm'ye set edildi. Akış hızı 0.8 mL/dakikada sabit tutuldu. Enjeksiyon hacmi 10 µL idi. Kolon sıcaklığı 40°C'de tutuldu.

3.2. METOD

Haşhaş kapsül tozları, Ultrasonik ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu, mekanik karıştırırmalı ekstraksiyonu ve maceration ekstraksiyonu metodu ile ekstrakte edildi ve elde edilen morfin ekstraksiyon verim değerleri karşılaştırıldı.

3.2.1. Çözücü türünün belirlenmesi çalışması

Çalışmamızda, farklı ekstraksiyon metotları kullanılacağından dolayı haşhaş kapsülünden morfin ekstraktı işleminin her aşamasında, kullanılacak çözücü (solvent) türünü belirlememiz gerekmektedir. Hassas terazide 150 µm'lik tane boyutunda beş ayrı numune 500 mg'lık olarak ölçüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Haşhaş tozlarının ölçümünde kullanılan hassas terazi

Tartılan numunelere, 25 mL kloroform, 25 mL Etanol, 25 mL Metanol, 25 mL Deiyonize su ve 25 mL Asetonitril konuldu (Şekil 3.3). Çalışma için hazırlanan numuneler sonikasyon tekniği kullanarak ultrasonik banyo cihazının deney sıcaklığı 30 °C de olup, 30 dk bekletildi. Belirtilen süre sonunda numuneler önce Whatman marka filtre kâğıdı ile filtre edildikten sonra 0,45 µm'lik membran filtrelerden filtre edildi. HPLC'de analiz için, numunelerden alınan sıvılar viallere konuldu.



Şekil 3.3. Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

3.2.2. Ultrasonik ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon işleminde, 50 kHz frekansında Bandelin Sonorex brand markalı cihaz kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan çözücülerin pH seviyesi, Mettler Toledo-Seven ile kontrol edildi. Ultrasonik banyonun sıcaklığı ve süresi belirtilen koşullarda ayarlandı. Standart ultrasonik koşullar için erlenler ultrasonik banyo içerisine yerleştirildi. Banyodaki su ile erlen içerisindeki çözelti seviyesi aynı tutuldu ve ultrasonik banyo çalıştırıldı. pH seviyesini 1 ve 13'e ayarlamak için hidroklorik asit ve sodyum hidroksit kullanıldı. Ekstraksiyon yöntemi tamamlandıktan sonra 29 numune ilk olarak Whatman filtre kâğıdı ile filtre edildi. Sonra kapiler tıkanmayı önlemek için 0,45 mikronluk filtre kağıdı ile filtre edildi (Çizelge 3.1) (Milipore, Bedford, MA, USA).

Çizelge 3.1. Ultrasonik ekstraksiyon için hazırlanan numune koşulları

Çalışma	Çözücü (Solvent) Oranı (mg/mL)	pH	Zaman (dk)	Sıcaklık (°C)
1	10	1	45	40
2	20	1	45	40
3	10	13	45	40
4	20	13	45	40
5	15	7	30	30
6	15	7	60	30
7	15	7	30	50
8	15	7	60	50
9	10	7	45	30
10	20	7	45	30
11	10	7	45	50

Çizelge 3.1. (Devam)

12	20	7	45	50
13	15	1	30	40
14	15	13	30	40
15	15	1	60	40
16	15	13	60	40
17	10	7	30	40
18	20	7	30	40
19	10	7	60	40
20	20	7	60	40
21	15	1	45	30
22	15	13	45	30
23	15	1	45	50
24	15	13	45	50
25	15	7	45	40
26	15	7	45	40
27	15	7	45	40
28	15	7	45	40
29	15	7	45	40

3.2.2.1. Morfin tayini

Morfinin tanımlanması ve miktar analizi Agilent 1260 kromatografik sistem multi-wavelength dedektör, kolon bölümü, dörtlü pompa ve otomatik örnekleyici içermektedir. Kromatografik ayırma XBridge Phenyl 3,5µm; 3,0 x 150mm kolon (su corp., Milford, MA) kullanılarak yapılmıştır. Multi-wavelength dedektör 284 nm'ye ayarlandı. Akış hızı 0,8 mL/dakikada sabit tutuldu. Enjeksiyon hacmi 10µL idi.

Kolon sıcaklığı 40°C’de tutuldu. Mobil faz, çözücü (0,4 M asetik asit, pH 4,0) ve B (% 50 su içinde metanol) ile karıştırıldı. Analitik yöntemler Çizelge 3.2 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Morfin analiz metodu

Metot	Morfin Analiz Metodu		
Kolon	Waters XBridge® Phenyl, 3,5µm; 3,0 x 150mm		
Enjeksiyon Hacmi	10 µL		
Kolon Sıcaklığı	40°C		
Dedektör Dalga Boyu	284 nm		
Akış Hızı	0.8 mL/dak.		
Çalışma Süresi	30 dakika		
Gradient Koşulları	Zaman (Dakika)	% Mobil Faz A	% Mobil Faz B
	0	99	1
	7	99	1
	17	45	55
	23	45	55
	23,1	0	100
	28	0	100
	28,1	99	1
	30	99	1
Mobil Faz A	0,4 M Asetik Asit; pH: 4,0 (NH ₃ ile)		
Mobil FAz B	% 50 Metanol, % 50 saf su		

Kalibrasyon eğrileri 100 – 500 µg/L alan içinde morfin içeren standart solisyondaki alanların morfin içeriği belirlendi.

3.2.3. Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraktörü, bir solvent şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden meydana gelen aletler kullanılarak sistem hazırlandı. Numuneler soxhlet cihazı kullanılarak ekstrakte edildi. 1g numune hassas terazide tartılarak içerisine 100 mL metanol ilave edildi.

Karışımın bulunduğu numune, sıcaklığı 80°C olan cam balon kafesli ısıtıcının içinde, 6 saat süreyle ısıtılma işlemine tabi tutuldu (Şekil 3.4). Kaynayan solventten gelen buharlar yoğunlaşarak tekrardan örnek içerisine damladığı görüldü. Solvent örneği ıslatmaktadır. Daha sonra solvent seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, solvent tüm örnek bölmesini boşaltarak, solvent şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak solvent birkaç kere örnek içerisine sirküle olur. Ekstrakte olan analitler solvent şişesinin içinde kalırken, yalnız temiz solvent buharlaştığından, her dolaşımında taze solvent kullanıldığı görüldü (Kellner R., 2004). Sürekli olarak taze solvent ile temas olmaktadır. Distilasyon balonuna uygulanan ısıyla, ekstraksiyon kavitesine ulaşıldığından, sistemin sıcaklığı oda sıcaklığından daha yüksek olur. Sistem bu yüksek sıcaklıkta değişmeden kalır. İşlem sonunda, geriye kalan numunenin miktarı 35 mL olarak ölçüldü. HPLC analizinden önce Whatman marka filtre kağıdı ile filtre edildikten sonra, 0,45 mikronluk filtre kağıdıyla da filtre edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Soxhlet ekstraksiyon düzeneği



Şekil 3.5. Filtrasyon işlemi

3.2.4. Maceration ekstraksiyonu

Hassas terazide 1g olarak tartılan haşaş kapsül tozlarının içine 70 mL metanol ve 30 mL deiyonize su, oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra behere konuldu. 6 saat için bu işlemler u kez tekrarlandı. Ekstraklar rotary vakum buharlaştırıcı aletle yoğunlaştırıldı ve sonrasında geriye kalan çözelti birleştirildi (şekil 3.6 - 7). HPLC analizinden önce bütün zltiler Whatman marka filtre kâğıdı ile filtre edildikten sonra, 0,45 mikronluk filtre kâğıdıyla da filtre edildi. Numunenin, maceration ekstraksiyon metodu uygulaması aynı durumlar altında u kez tekrarlanmıştır.



şekil 3.6. Ekstraktın distilasyonu



Şekil 3.7. Distile edilen metanol

3.2.5. Mikrodalga ekstraksiyonu

Mikrodalga destekli ekstraksiyon çözücü içine örnek matrinden analitlerin bir numune ile temas halinde olarak çözücüyü ısıtarak mikrodalga enerjisini kullanan bir sistemdir. Haşhaş kapsül tozlarını mikrodalga ekstraksiyon ile ekstrakte etmek için, evsel amaçlı Vestel – MD – 23 marka mikrodalda fırın modifiye edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Deneyler 900 Watt gücünde yapılmıştır (Çizelge 3.3). Test edilen parametrelerin süresi 20 s, 40 s ve 60 s ve solvent miktarı (çözücü/500 mg haşhaş kapsül tozu) 20 mL, 30 mL ve 40 mL olarak kullanıldı. HPLC analizinden önce bütün çözeltiler Whatman marka filtre kâğıdı ile filtre edildikten sonra, ayrıca kapiller tıkanmayı önlemek için 0,45 mikronluk filtre kâğıdı ile tekrar filtre edildi.

Çizelge 3.3. Deneyde kullanılan mikrodalga koşulu

Güç	1400 Watt
Frekansı	50 Hz
Potansiyel farkı	230 V
Çıkış gücü	900 Watt
Model	Vestel – MD – 23

3.2.6. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon

Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon yönteminde IKA marka RW 20 model manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Hassas terazide 5 g olarak tartılan haşhaş kapsül tozları çizelge 3.4’de belirtilen katı / solvent miktarı, pH, süre ve sıcaklıkta işleme tabi tutulmuştur. HPLC analizinden önce bütün çözeltiler önce Whatman marka filtre kâğıdı ile filtre edildikten sonra, ayrıca kapiller tıkanmayı önlemek için 0,45 mikronluk filtre kâğıdı ile de filtre edildi.

Çizelge 3.4. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon için hazırlanan numune koşulları

Çalışma	Katı/Çözücü(Solvent) miktarı (g/mL)	pH (pH)	Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)
1	100	1	60	60
2	200	1	60	60
3	100	13	60	60
4	200	13	60	60

Çizelge 3.4. (Devam)

5	150	7	30	30
6	150	7	90	30
7	150	7	30	60
8	150	7	90	90
9	100	7	60	30
10	200	7	60	30
11	100	7	60	90
12	200	7	60	90
13	150	1	30	60
14	150	13	30	60
15	150	1	90	60
16	150	13	90	60
17	100	7	30	60
18	200	7	30	60
19	100	7	90	60
20	200	7	90	60
21	150	1	60	30
22	150	13	60	30
23	150	1	60	90
24	150	13	60	90
25	150	7	60	60

Çizelge 3.4. (Devam)

26	150	7	60	60
27	150	7	60	60
28	150	7	60	60
29	150	7	60	60

Çizelge 3.5. Morfin analiz metodu

Metot	Morfin Analiz Metodu AA2012.M		
Kolon	Waters XBridge® Phenyl, 3,5µm; 3,0 x 150mm		
Enjeksiyon Hacmi	10 µL		
Kolon Sıcaklığı	40°C		
Dedektör Dalga Boyu	284 nm		
Akış Hızı	1,5 mL/dak.		
Çalışma Süresi	30 dakika		
Gradient Koşulları	Zaman (Dakika)	% Mobil Faz A	% Mobil Faz B
	0	99	1
	7	99	1
	17	45	55
	23	45	55
	23,1	0	100
	28	0	100
	28,1	99	1
	30	99	1
Mobil Faz A	2 lt Deiyonize su, 2 mL triflurasetik asit karışımı (pH = 9,6)		
Mobil Faz B	Saf % 0,1 Metanol		

3.2.7. Deneysel tasarım

Box-Behnken tasarımı her bir faktör için 3 seviye (-1,0,+1) olarak kullanılır. Bu tasarım, iki faktör 0 seviyesine sabit tutulurken, kalan faktörler +1 ve -1 seviyeleri içerisinde tekrarlanır (Çizelge 3.6). Daha sonra bu yöntem farklı gruplar içinde tekrarlanır (Lawson, 2010; Vining, 2010). Bu çalışmada, Design Expert Programında Box-Behnken tasarımı kullanılarak, bağımlı değer olan morfin verimi üzerine 4 bağımsız değişkenin etkileri araştırılmıştır. Burada X_1 (Katı / Solvent oranı - mg/mL), X_2 (pH), X_3 (zaman - dakika) ve X_4 (sıcaklık - °C) olarak gösterildi (Myers, 1995). Design-Expert 8.0.7.1 (trial version) yazılımı Box-Behnken tasarım modeli uygulama için kullanılmıştır. Bu uygulama için farklı koşullarda 29 deney yapılmıştır. Dört bağımsız değişken ile bağımlı faktör olan morfin verimi arasında birbiriyle olan ilişkileri için ANOVA testi uygulanmıştır (Draper, 1998).

Deneysel veriler, ikinci dereceden model denklemine uygundur. Önerilen kuadratik model aşağıdaki gibi denklem (3.1) ile verilir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (3.1)$$

Bu denklemde Y etkilenen, β_0 sabit sayıdır, X_i (i=1 - 4) kodsuz değişken, β_i doğrusal, β_{ii} ikinci dereceden ve β_{ij} etkileşim katsayılarıdır (Draper, 1998).

Çizelge 3.6. Ultrasonik ekstraksiyonu ile morfin optimizasyonu için RSM’de kullanılan sembolleri ile bağımsız değişkenler ve onlara ait kod değerleri

Bağımsız Değişkenler	Birim	Değişkenlerin Sembolü	Kod Seviyeleri		
			-1	0	1
Katı/Solvent Oranı	mL/500 mg	X_1	10	15	20
pH	pH	X_2	1	7	13
Ekstraksiyon Süresi	Dakika	X_3	30	45	60
Ekstraksiyon Sıcaklığı	°C	X_4	30	40	50

3.2.8. İstatistik analizi

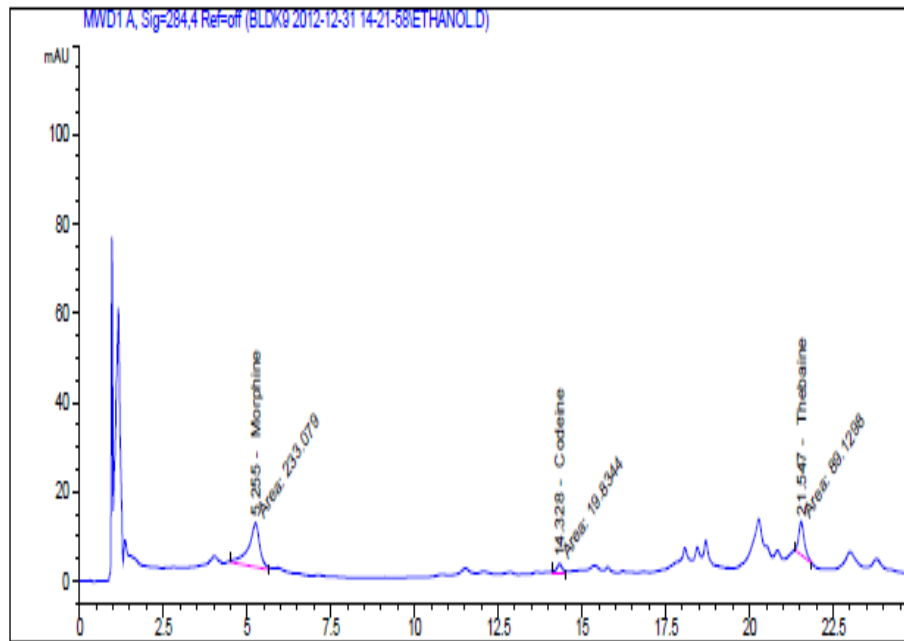
Deneylerin istatistiksel analizi Instat[®] software version 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Design-Expert programı kullanılarak değişkenler arasında etkileşimi belirlemede ANOVA testi uygulandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

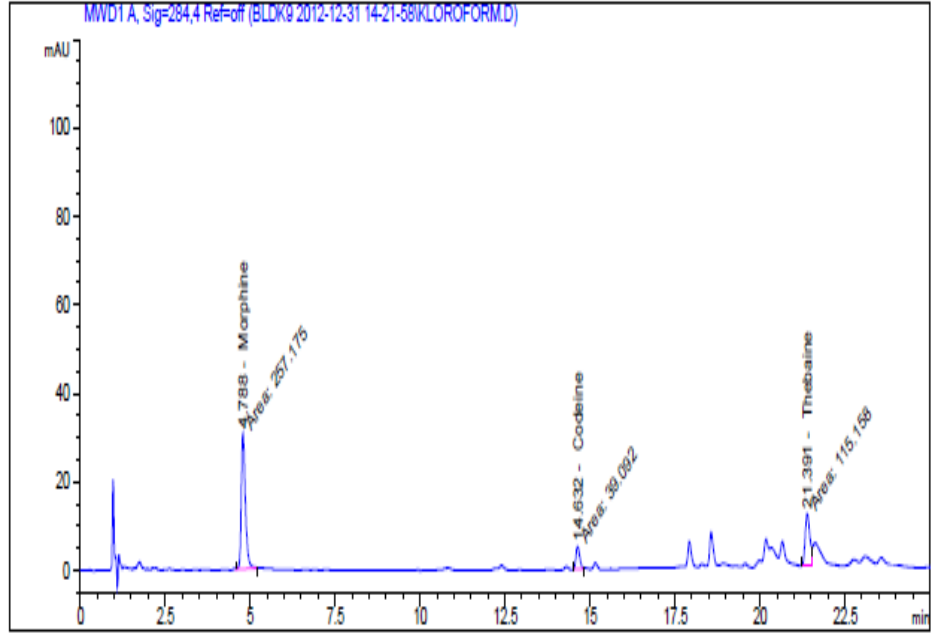
Ekstraksiyon şartları belirlendikten sonra haşhaş kapsül tozları ultrasonik, soxhlet, maceration, mikrodalga ve manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak morfin verimi ekstrakte edildi ve uygulanan ekstraksiyon yöntemleri sonucunda elde edilen morfin verim değerleri karşılaştırılmıştır.

4.1. Solvent Türünün Belirlenmesi

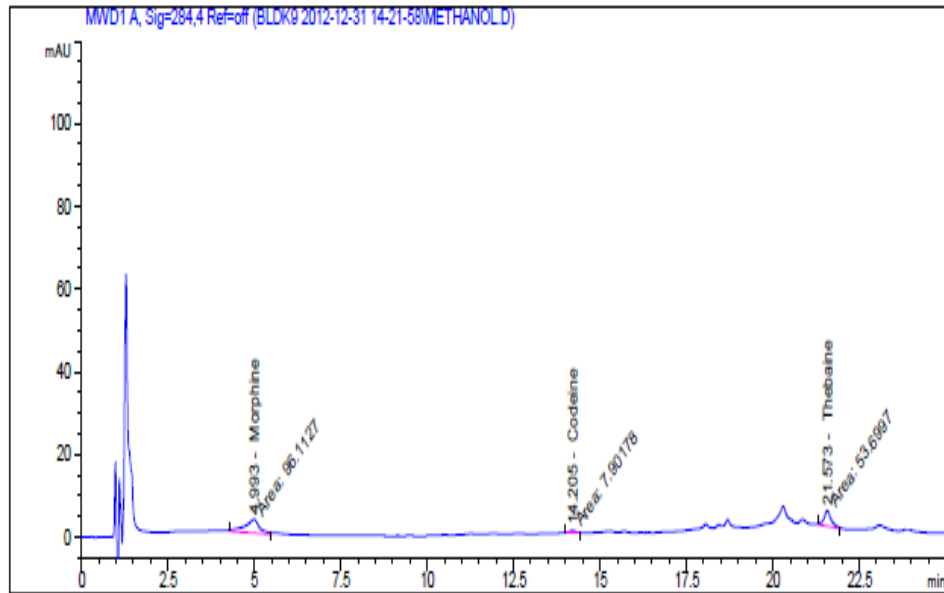
Ekstraksiyonla olan çalışmamızın her aşamalarında kullanacağımız solvent türünü belirlemeye çalıştık. Bunun için, kullandığımız solventler Kloroform, Etanol, Metanol, Deiyonize su ve Asetonitril'e ait ekstraktların kromatogram sonuçları Şekil 4.1-2-3-4-5'te verilmiştir.



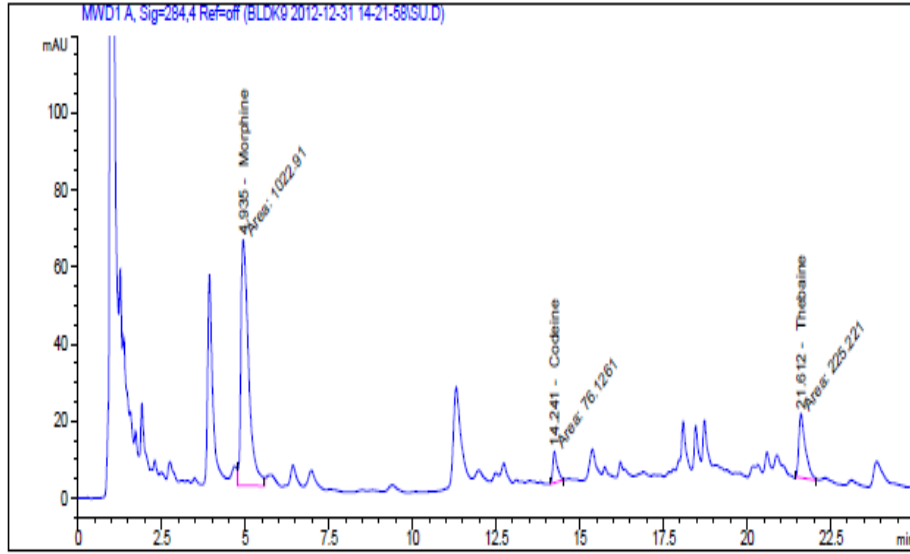
Şekil 4.1. Etanol ile yapılan ekstraktın kromatogramı



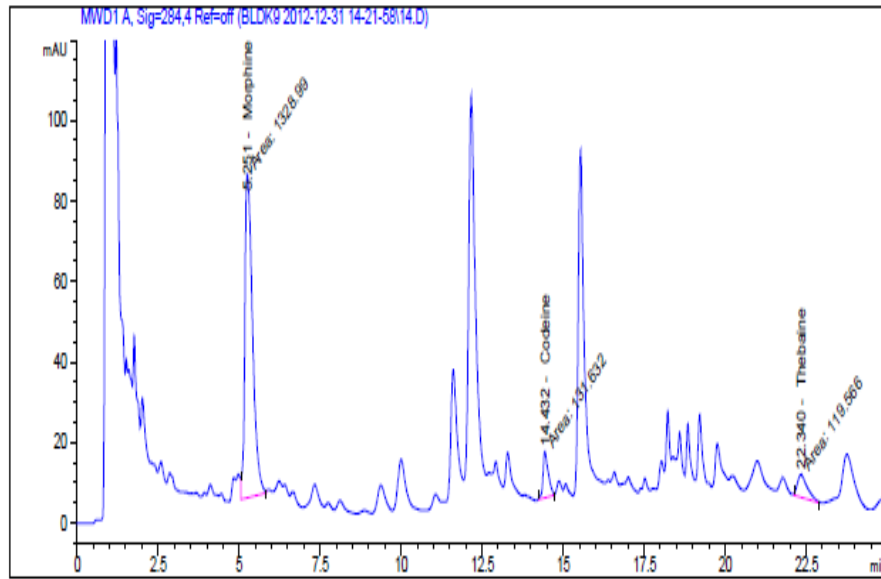
Şekil 4.2. Kloroform ile yapılan ekstraktın kromatogramı



Şekil 4.3. Metanol ile yapılan ekstraktın kromatogramı



Şekil 4.4. Deiyonize su ile yapılan ekstraktın kromatogramı



Şekil 4.5. Asetonitril ile yapılan ekstraktın kromatogramı

Analiz sonuçlarına göre, deiyonize su ve asetonitrilde elde edilen morfin ekstrakt verim değerleri diğer solventlere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Yaptığımız çalışmanın amacı; çevreye zarar vermeyen maddeler kullanmak olduğundan dolayı, ekstraksiyon çalışmalarımızın her aşamalarında solvent türü olarak deiyonize suyu kullanmayı tercih ettik.

4.2. Ultrasonik Ekstraksiyonu ile Morfin Verimi

Ultrasonik ekstraksiyon sonucunda 29 numuneden elde edilen morfin veriminde etkili olan dört bağımsız değişken olarak kullanılan katı/solvent oranı, pH, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının etkisi çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Box-Behnken Design’ın da kullanılan bağımsız değişkenlere ait veriler (X_1, X_2, X_3, X_4) ve elde edilen morfin verim değerleri

Çalışma	X_1 Katı/Çözücü(Solvent) Oranı (500 mg/mL)	X_2 pH (pH)	X_3 Süre (dk)	X_4 Sıcaklık (°C)	Morfin Verimi (mg/500mg Haşhaş Kapsülü)
1	10	1	45	40	2,40
2	20	1	45	40	3,32
3	10	13	45	40	3,12
4	20	13	45	40	3,28
5	15	7	30	30	2,25
6	15	7	60	30	2,28
7	15	7	30	50	1,80
8	15	7	60	50	2,30
9	10	7	45	30	2,26
10	20	7	45	30	2,32

Çizelge 4.1. (Devam)

11	10	7	45	50	1,50
12	20	7	45	50	2,12
13	15	1	30	40	2,90
14	15	13	30	40	3,35
15	15	1	60	40	2,97
16	15	13	60	40	3,00
17	10	7	30	40	2,12
18	20	7	30	40	2,54
19	10	7	60	40	2,26
20	20	7	60	40	2,40
21	15	1	45	30	2,76
22	15	13	45	30	2,88
23	15	1	45	50	2,81
24	15	13	45	50	2,99
25	15	7	45	40	2,24
26	15	7	45	40	2,31
27	15	7	45	40	2,07
28	15	7	45	40	2,21
29	15	7	45	40	2,27

Her kromatograma ait piklerin alanı hesaplanarak bulunan morfin verim değerleri, duyarlı ve spesifik bir yöntem olan Box-Behnken Design Expert Programında ANOVA analizleri yapılmıştır. Bu yöntem, bileşenlerin türetilmesinde çok önemli ve etkilidir (Babiker, 2007; Hofmann,1999). Çizelge incelendiği zaman, ultrasonik banyo cihazı kullanılarak gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyonu, morfin veriminin kazanılmasında geleneksel kullanılan yöntemlere göre, enerji tasarrufu ve çevreye zarar vermeyen alternatif bir yöntem olduğu görülmüştür.

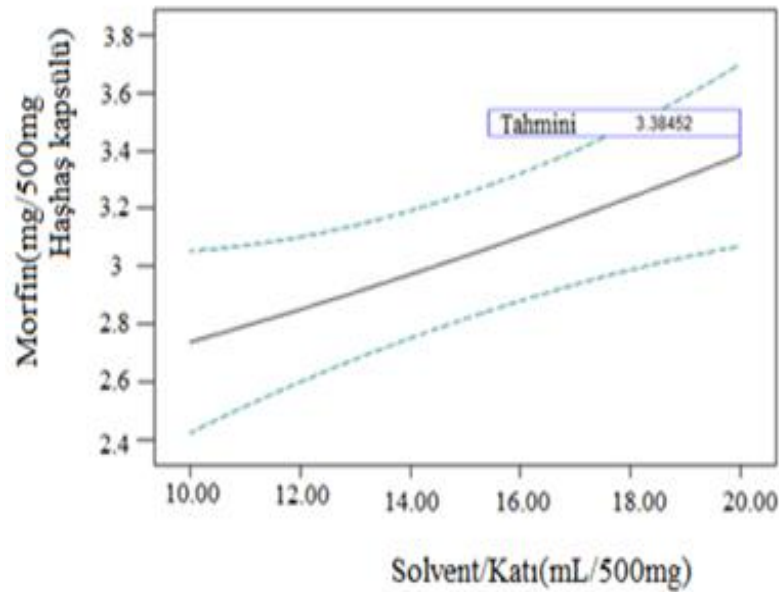
Box-Behnken tasarımı her faktör için üç düzeyde (-1,0, +1) kullanılmaktadır. Faktörlerin ikisi 0 düzeyinde sabit tutulurken, bu tasarımda, kalan faktörler bu süreci farklı gruplar için tekrarlanarak seviyeleri +1 ve -1 olarak belirlenmektedir. Bu çalışmada, Box-Behnken tasarımı bağımsız değişkenlerin etkisini keşfetmek için dört değişken ile yapıldı. Burada, X_1 (Katı/Solvent oranı-mg/mL), X_2 (pH), X_3 (zaman-dakika) ve X_4 (sıcaklık-°C) olarak gösterildi (Çizelge 4.2.)

Çizelge 4.2. Morfin Optimizasyonu Response Surface Model(RSM)'nin bağımsız değişkenleri ve kod seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Birimler	Değişkenlerin Sembolleri	Kod Seviyeleri		
			-1	0	+1
Katı/Solvent oranı	mg/mL	X_1	500/10	500/15	500/20
pH	pH	X_2	1	7	13
Süre	Dakika	X_3	30	45	60
Sıcaklık	°C	X_4	30	40	50

4.2.1. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine katı/solvent oranı'nın etkisi

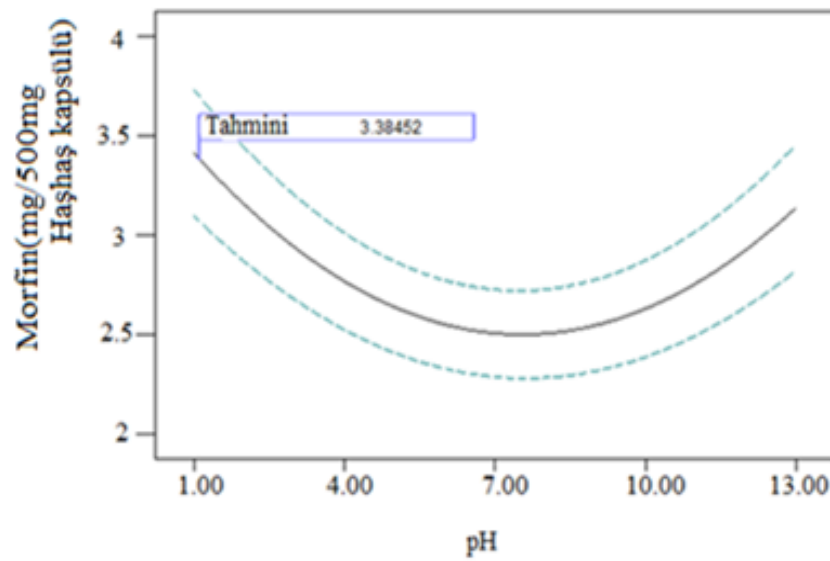
Katı/Solvent oranı önemli bir faktördür. Ayrıca, ekstraksiyon verimliliğini optimize etmek için kullanılan parametrelerden biridir. Küçük hacimlerde daha az morfin çıkarılması çevre açısından önemlidir. Büyük çözücü hacimleri, çalışmayı zorlaştırır ve gereksiz atığın oluşmasına neden olmaktadır. Çalışmamızın amacı, çevreye zarar vermeyen işlemlerin yapılması olduğu için, solvent miktarı az kullanıldı. Yapılan bir dizi deneylerde, çözücü / katı madde oranı etkisinin değerlendirilmesi için farklı çözücü / katı madde oranları ile çalışmalarımız gerçekleştirilmiştir. Çizelde 4.1'deki grafik ekstraksiyon verim miktarının solvent hacmi ile arttığını göstermektedir. İtici güç konsantrasyonu daha yüksek diffüzyona neden olduğundan dolayı, katı madde oranı için daha düşük bir solvent olması gerekmektedir. Çünkü çözücü (solvent) miktarının artışı ile verim artışının, kütle transferi ilkesi ile tutarlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. Katı/Solvent oranını ile morfin verimi grafiği

4.2.2. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine pH'ın etkisi

Morfin verimliliği üzerine çözücü pH'ın etkisi pH = 1-13 aralığında incelenmiştir. pH'ın etkisini gösteren sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Ayrıca, morfin ekstrakt veriminin pH=1'de maksimum olduğu görülmektedir. pH = 7'de verim değeri en düşüktür. pH = 13'de verim değeri orta değeri almaktadır. Asitik ortamlarda morfin salınımının kolay olduğu grafikte görülmektedir (Şekil 4.7).

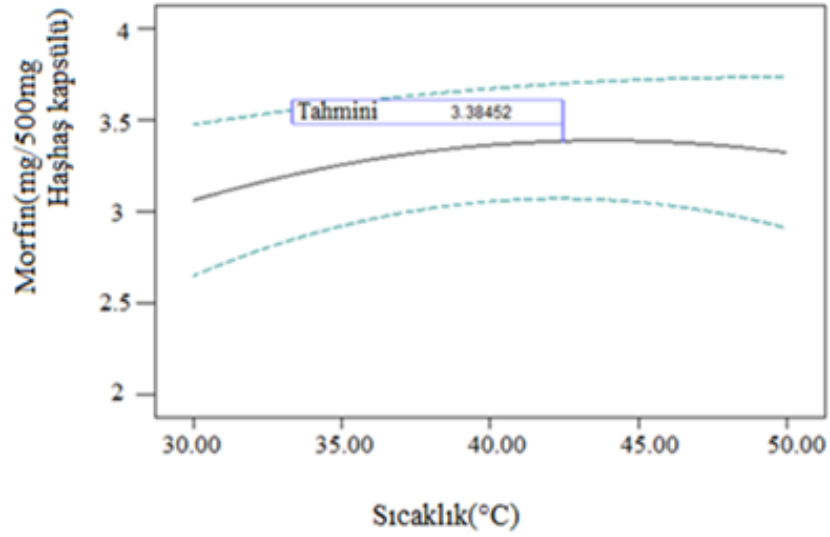


Şekil 4. 7. Çözücü pH ile morfin verimi grafiği

4.2.3. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon sıcaklığının etkisi

Haşhaş kapsül tozlarının ekstraksiyonu, 30°C ile 60°C arasında değişen bir sıcaklık üzerinde yapıldı. Morfin ekstraktı, 45°C sıcaklığa kadar artmaktadır. Ekstraksiyonda kütle transferi artışı bu sıcaklıkta v sıcaklığın bir fonksiyonu olduğu görülmektedir.

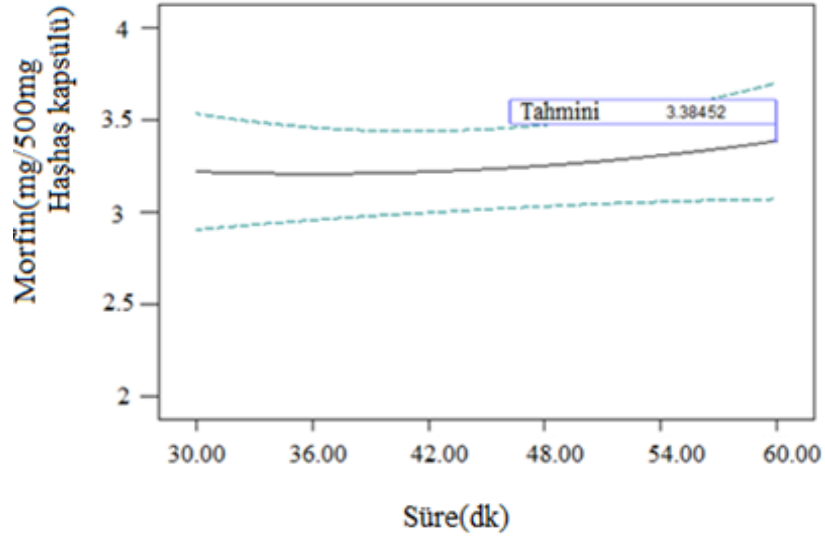
Giderek artan daha yüksek sıcaklıklarda ekstrakt yüzünden kütle transferi ve morfin çıkarma performansını artırmak bitki matrisinin aktif bölgelerinde çözünen gelişmiş geri emilim meydana getirmektedir (Şekil 4.8). Daha uzun bir sıcaklık tüketilmesi, ekonomik açıdan uygun olmamaktadır.



Şekil 4.8. Ekstraksiyon sıcaklığı ile morfin verimi grafiği

4.2.4. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi

Morfinin verimliliğinde, ekstraksiyon süresinin etkisi 30-60 dakika aralığında incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Bunlar da ekstraksiyon süresi 30 dakikadan 60 dakika doğru gidildikçe morfin verim çıkarılmasının daha da yükseldiği görülmektedir. Zamanın daha fazla olması hücre duvarlarını bozar ve çözücü içine morfin salınımını kolaylaştırır. Daha yüksek sıcaklıkta morfin içine çözücü salınımını kolaylaştırarak hücre duvarını yıkar (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Ekstraksiyon süresi ile morfin verimi grafiği

4.2.5. Response surface methodology (RSM) ile ultrasonik ekstraksiyonla morfin verim optimizasyonu

Değişken parametrelerinin bireysel etkileri, yaklaşık bir faktör olarak işlem değişkenleri uygulandı. Birbiriyle olan etkileşimleri klasik yaklaşımda yanıltıcı sonuçlara neden olabildiği için, değişkenlerin olası etkileşimleri göz ardı edilebilmektedir. Bunu önlemek için; Response surface methodology (RSM)'de kullanılarak, parametreler arasındaki bağlantı göz önünde bulunduruldu. Çizelge 4.2'de bağımsız değişkenleri içine alan pH, katı/solvent oranı, ekstraksiyon zamanı ve ekstraksiyon sıcaklığı parametrelerinin minimum, merkez ve maksimum noktaları gösterilmektedir. Design expert software programında farklı koşullarda yapılan 29 deney kullanıldı.

Response Surface yazılımı yüzey yöntemi kullanarak, haşhaş kapsülünden elde edilen morfin verimi için Box-Behnken design modeli kullanılarak kuadratik model elde edildi. Ayrıca, morfin verimi için regresyon analizi de elde edildi.

Response surface methodology yöntemiyle bulunan kuadratik model denklemi aşağıdaki gibidir:

$$M = 2,75964 - 0,00450X_1 - 0,14637X_2 - 0,04011X_3 + 0,03608X_4 - 0,00633X_1X_2 - 0,00093X_1X_3 + 0,00280X_1X_4 - 0,00117X_2X_3 + 0,00025X_2X_4 + 0,00078X_3X_4 + 0,00058X_1^2 + 0,02173X_2^2 + 0,00036X_3^2 - 0,00157X_4^2 \quad (4.1)$$

M: Morfin mg,

X_1 : Solvent mL,

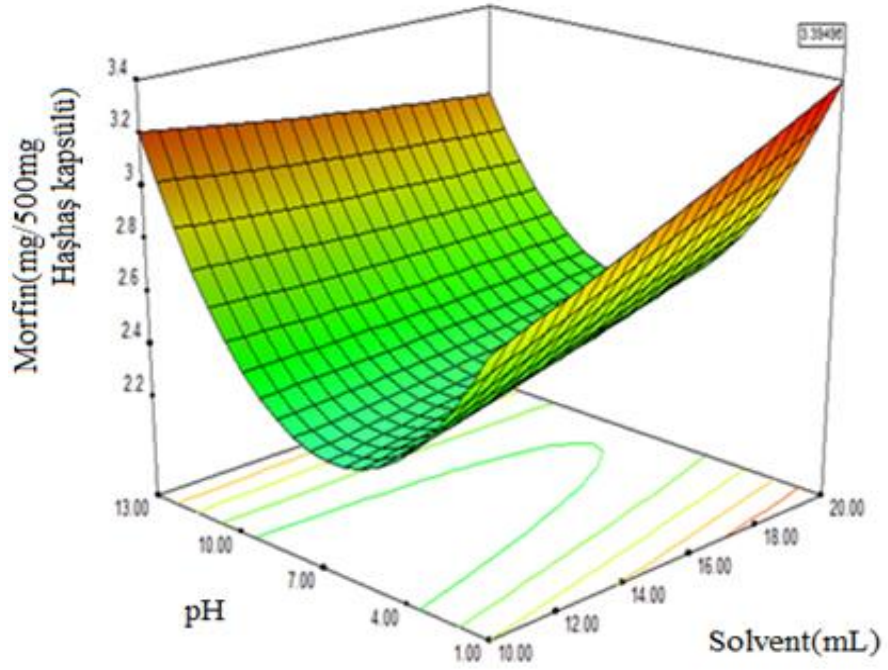
X_2 : pH,

X_3 : Ekstraksiyon süresi dk.,

X_4 : Ekstraksiyon Sıcaklık $^{\circ}\text{C}$

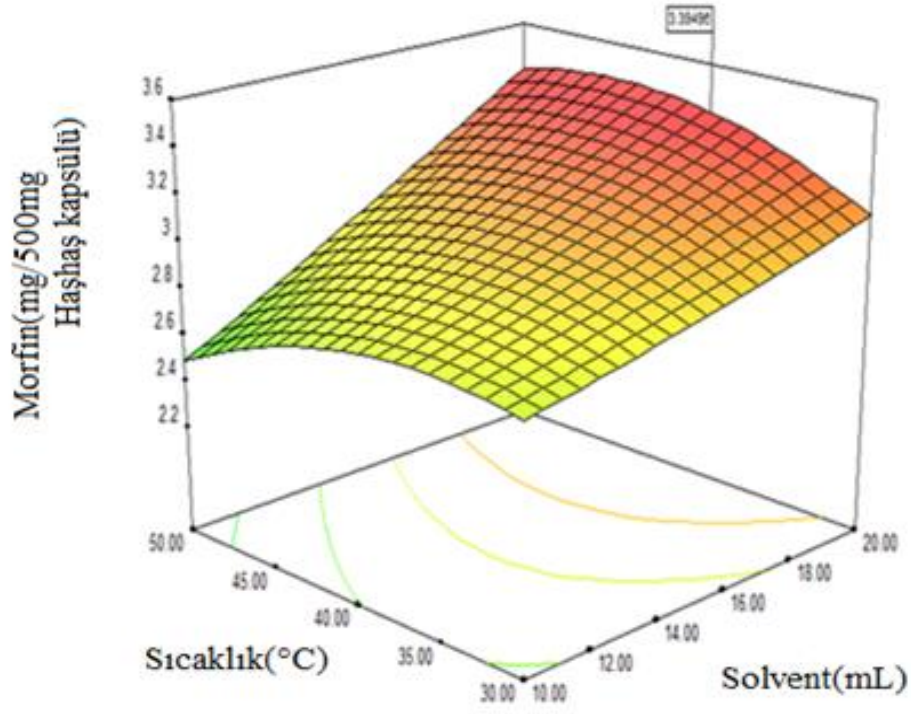
Bu denklemden, toplam morfin verimi için teorik değerlerle uygulamalı değerler arasındaki ilişki şekil 4.6'da gösterildi.

Şekil 4.10'da üzere solvent oranı ile pH'ın morfin verimi üzerinde etkisi gösterilmektedir. Katı/solvent oranının artması katının toplam miktarını da artırmaktadır. Bu da kütle transferini içermektedir. Yüksek katı/solvent oranı kullanıldığı zaman kütle transferi esnasında itici kuvvet sıvının hacmi ve katı arasında yoğunlaşmaya meyilimi arttırmaktadır. Bu da ekstraksiyon miktarının aktif hale gelmesine yol açmaktadır.



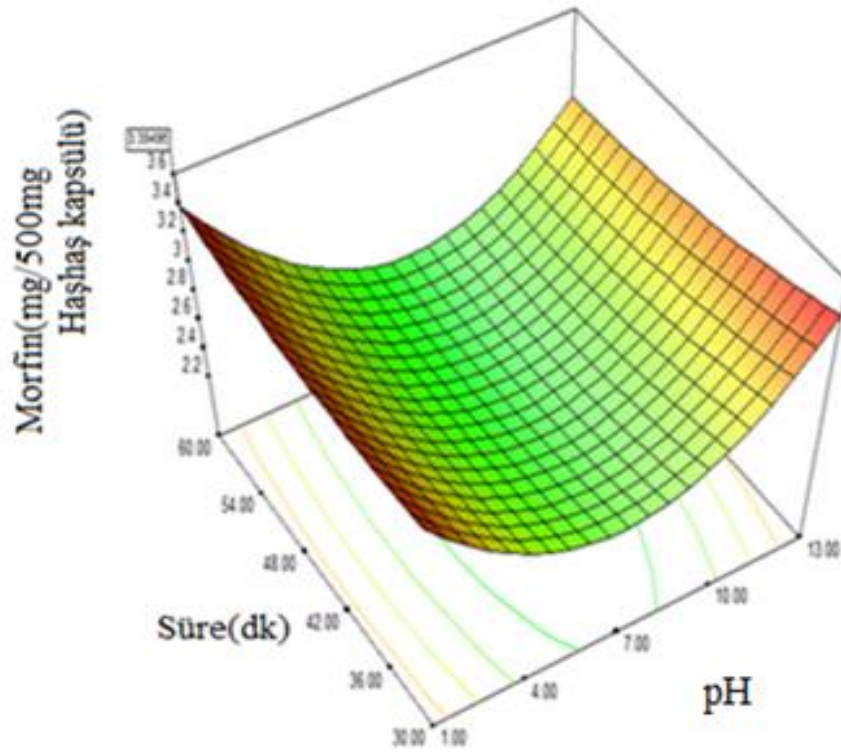
Şekil 4.10. Katı/solvent oranını ve çözücü pH'ın morfin verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Şekil 4.11'te iki bağımsız değişken olan solvent miktarı ve ekstraksiyon sıcaklığının etkisinin morfin verimi üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Solvent miktarının artmasıyla haşhaş kapsülünden morfin veriminin ekstraksiyon alanının arttırdığını görmekteyiz. Bundan dolayı ekstraksiyon sıcaklığının artmasıda morfin veriminde etkili olmuştur.



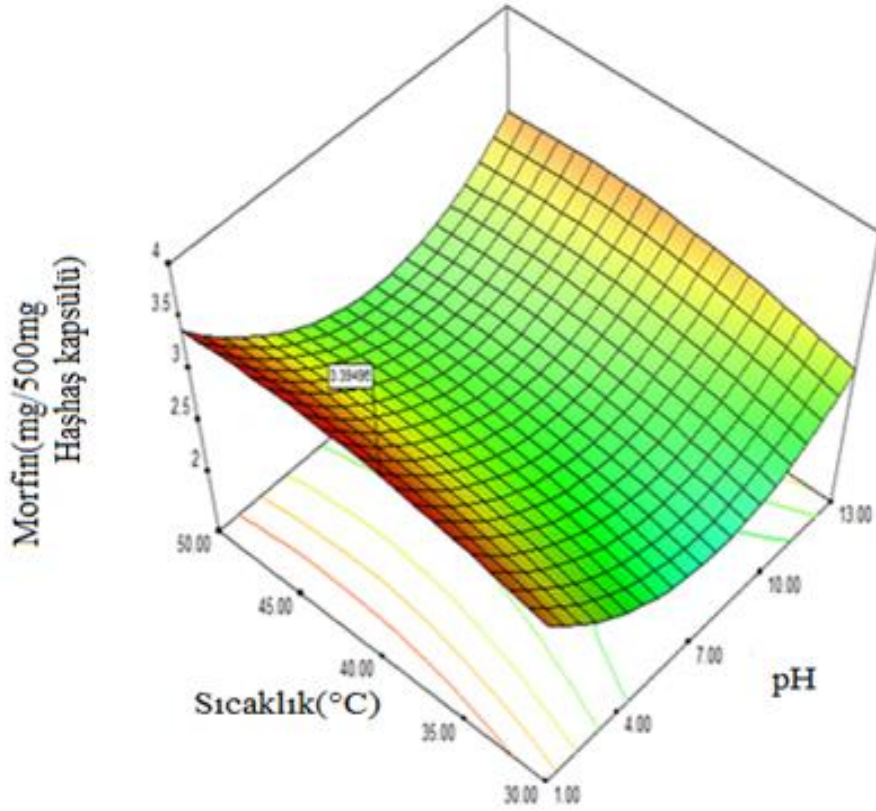
Şekil 4.11. Katı/solvent oranı ve ekstraksiyon sıcaklığının morfin verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Ekstraksiyon süresi ile pH arasında ilişki Şekil 4.12’de gösterilmektedir. Artan zamanlarda morfin verimi artarken, pH değeride bunda olumlu etki yaratmaktadır. Genellikle, yöntemin başlamasıyla morfin verim hızını arttırmaktadır. Çözücü (solvent) pH değerinin düşük olması morfin veriminin yükselmesine neden olmaktadır (Wang, 2007).



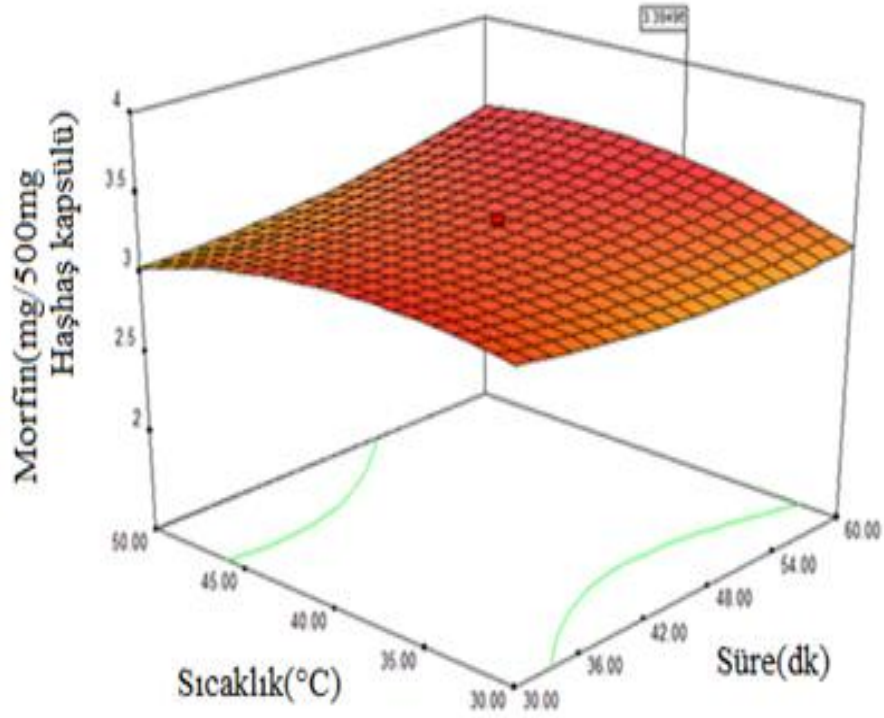
Şekil 4.12. Ekstraksiyon süresi ve çözücü pH ile morfin verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Yapılan çalışmada sıcaklık ve pH arasında bir ilişki olduğu görülmektedir (Şekil 4.13). Artan sıcaklıklarda morfin verim miktarının arttığı görülmektedir. Buna karşın pH'ın artan miktarlarında ekstraksiyon miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Burdan, sıcaklık ile pH arasındaki ilişkinin gücü ters orantılıdır diyebiliriz.



Şekil 4.13. Ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü bir pH'ın morfin verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Ekstraksiyon süresi ile ekstraksiyon sıcaklığı arasındaki ilişki Şekil 4.14'de gösterilmektedir. Artan zamanlarda morfin verimi artarken, sıcaklık değeride bundan olumlu etkilenmektedir.



Şekil 4.14. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi ile morfin verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

4.2.6. Model uygunluğu

Morfin verimi için Design Expert 8.0.7.1 kuadratik denklem varyans analizi (ANOVA) çizelde 4.3.'de verildi. Sahip olunan bir çok uygun değişkenlerin düzenlenmesi için adım adım regresyon analizi kullanıldı. Bu yöntemle göre, elde edilen değişkenlerin (0,1) seviyelerinde ileri ve geri tekniğinin her ikisinde kullanılarak test analizi yapıldı. Geri teknik yönteminde tahmini parametredeki değişkenlerin hepsi kullanıldı. Alfa seviyesindeki önemli olmayan parametrelerden herhangi bir değişken denklemden çıkarılır. Bu yöntem sola kadar devam eder.

$p < 0,05$ değerinde olan standartı en yüksek olan önemli değişken denklemdede ilave edilmektedir. Standart beta değeri çok yüksek ise değerlidir. Değişken önemli ise denkleme ilave edilir. Bu değerin altında olan değişkenler varsa onlarda elde edilecek olan denklem sistemine ilave yapılır. Bunlar, regresyonla aynı sonuca bağlanarak anova analizi yapılır (Miles, 2005; Nally, 2000).

Çalışmamızda, Regresyon analiziyle güven aralığının % 95 sağlanmıştır. Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi F değeri 23,46 ve $p < 0,0001$ olması iyi bir kanıttır. Bizim kullandığımız modelde $X_1, X_2, X_4, X_1X_2, X_2^2, X_4^2$ güven aralığı içinde önemli medel terimleridir (Çizelge 4.3). Bu terimleri regresyon denkleminde kullanacağız.

Çalışmamızda, R^2 değeri 0,9591; Pred R^2 değeri 0,7750 ve Adj R^2 değeri 0,9182 aralığında olması modelin uygulanabilirliğinin doğruluğunu göstermektedir. Ayrıca, response surface modeli, tahmini morfin verimi için yeterli sonuçlardır.

Morfin verim modeli için Anova sonuçları istatistiksel modelde belirtilmiştir. Joglekar ve May’e göre; iyi bir model için R^2 değerinin en az 0,8000 olması şartıdır. Çalışmamızda bu değer 0,8000’dan çok yüksektir.

Çalışmamızda elde edilen R^2 morfin verim değeri 0,9441’dir. Bu değer 1’e çok yakındır. Bu da bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenlerle olan ilişki gücünün çok yüksek olduğunu göstermektedir.

Morfin verimi için R^2 (0,9441), Adj- R^2 (0,8883), Perd- R^2 (0,7015) değerleri Box-Behnken modeli uygulamasının doğruluğunu iyi bir şekilde göstermektedir (Çizelge 4.3). Varyasyon katsayısı (C.V. %) 5,20 olarak bulundu. Böylece, Response Surface Modelinde deneysel sonuçların gerçekliği haşhaş kapsül tozlarından tahmini morfin verimi elde edilmesinde yeterli bir başarı sağlanmıştır (Pan, 2011; Zhu, 2007).

Morfin verimi için Design Expert 8.0.7.1’in kuadratik denklemi ANOVA analizini çizelge 4.3 vermektedir. Regresyon analizi için güven aralığı % 95 olduğu görülmektedir. ANOVAYA göre F – Value modelinin 23,46 olması model uygulaması için önemlidir.

Bizde $X_1, X_2, X_4, X_1X_2, X_1X_4, X_2^2, X_4^2$ model teriminde önemlidir. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi solvent oranı, çözücü pH değeri ve ekstraksiyon sıcaklığının morfin verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Lack of fit'in F – Value değerinin 6,15 olması model için önemli bir değerdir.

Çizelge 4.3. Morfin verimi için Design Expert 8.0.7.1'in kuadratik denkleminin varyans (ANOVA) analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri Prob.>f
Model	5,65	14	0,40	23,46	< 0,0001
X_1 -Katı/Solvent	0,44	1	0,44	25,62	0,0002
X_2 -pH	0,18	1	0,18	10,46	0,0060
X_3 -Süre	0,0052	1	0,0052	0,30	0,5909
X_4 -Sıcaklık	0,13	1	0,13	7,69	0,0150
X_1X_2	0,11	1	0,11	6,33	0,0247
X_1X_3	0,020	1	0,020	1,14	0,3039
X_1X_4	0,10	1	0,10	5,95	0,0286
X_2X_3	0,044	1	0,044	2,56	0,1317
X_2X_4	0,0072	1	0,0072	0,42	0,5275
X_3X_4	0,055	1	0,055	3,21	0,0949
X_1^2	0,0044	1	0,0044	0,26	0,6193
X_2^2	3,85	1	3,85	223,44	<0,0001
X_3^2	0,032	1	0,032	1,84	0,1961
X_4^2	0,19	1	0,19	11,07	0,0050

Çizelge 4.3. (Devam)

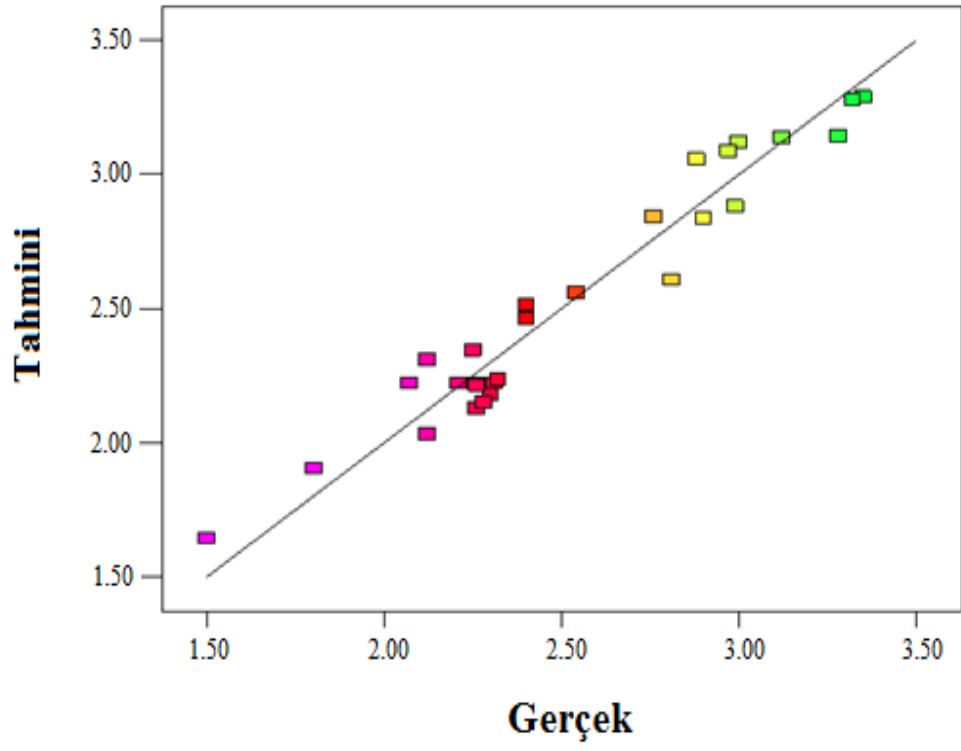
Residual	0,24	14	0,017	-	-
Lack of fit	0,23	10	0,023	6,15	0,0475
Pure error	0,015	4	0,0037	-	-
Cor. total	5,89	28	-	-	-

df, serbestlik derecesi

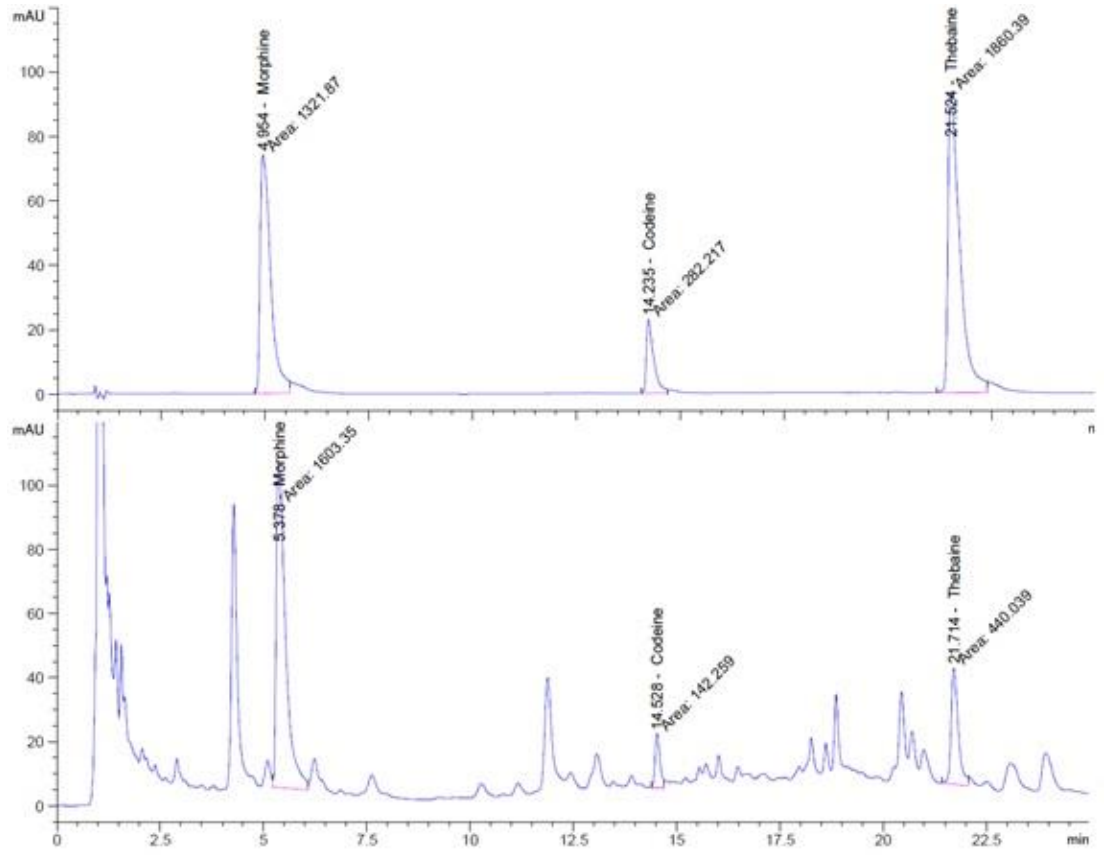
cor, ortalama için düzeltilmiş tüm bilgilerin toplamı

Çok yakın ve çok yüksek çoklu katsayıların (R^2 , $\text{Adj-}R^2$ and $\text{Pred-}R^2$) modelin doğruluğunu göstermektedir. $\text{Adj-}R^2$ gerçek ve tahmini veriler arasındaki ilişkinin derecesinin yüksek olduğunun kanıtıdır. Çalışmamızda, R^2 (0,9591), $\text{Adj-}R^2$ (0,9182) ve $\text{Pred-}R^2$ (0,7750) değerleri modelin doğru olarak uygulanacağını göstermektedir

Böylece, response surface modeli ultrasonik ekstraksiyonu ile haşhaş kapsülünden yeterli morfinin çıkarılmasında başarılı olunmuştur. Çalışmamızda, varyans katsayı değeri 5,20 olarak bulundu. Varyasyon katsayısının çok düşük olması deney sonuçlarının gerçekliğini ve kesinliğini göstermektedir (Pan, 2011; Zhu, 2007). Şekil 4.15’de ultrasonik ekstraksiyonla haşhaş kapsülünden elde edilen morfin ekstraktı denklem 4.1’den deney ve tahmini veriler arasındaki ilişkinin gücünü göstermektedir. Görüldüğü gibi, modelden elde edilen tahmini veri uygulanan koşullarda deney verileri ile çok iyi uygunluk göstermektedir. Şekil 4.16’da çalışma analizi ve standart morfin kromatogramı verilmektedir.



Şekil 4.15. Model denklem kullanılarak hesaplanan değerlere karşı deneysel olarak elde edilen değerler arasındaki ilişki



Şekil 4.16. Morfin standartı ve çalışma kromatogramı

Box-Behnken Design programı yardımıyla morfin optimizasyon analizi çalışması yapılmıştır. İdeal ekstraksiyon koşulları design expert yazılımı kullanılarak deney maksimum koşulları bulundu. Bu değer, pH = 1, ekstraksiyon süresi 60 dakika, ekstraksiyon sıcaklığı 38,75 °C ve katı/solvent oranı 20 mL bulundu. Ayrıca, bu koşullarda altı kez deney tekrarlanarak maksimum morfin verimi 3,3950 mg morfin / 500 mg haşhaş kapsülü olarak bulundu (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Response surface methodoloji (RSM) kullanılarak en iyi morfin verimi ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi

Çalışma	Katı/Çözücü(Solvent) oranı (mg/mL)	pH (pH)	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Morfin verimi (mg/500mg Haşhaş kapsülü)
1	20,00	1,00	60	38,75	3,3950Selected
2	20,00	1,00	54,65	42,57	3,4282
3	20,00	1,00	54,62	42,82	3,4332
4	20,00	1,00	56,45	42,94	3,48454
5	20,00	1,00	54,47	42,56	3,42355
6	20,00	1,00	56,62	42,59	3,48035
7	19,19	1,00	54,80	42,89	3,4386
8	20,00	1,00	56,88	42,28	3,47866
9	20,00	1,00	53,28	43,08	3,40491
10	20,00	1,00	52,18	42,84	3,37486
11	19,95	1,00	53,71	42,77	3,40595
12	20,00	1,00	49,97	41,89	3,31532
13	20,00	1,00	59,26	42,12	3,54085
14	20,00	1,00	59,86	42,67	3,57737
15	20,00	1,00	48,99	41,86	3,29784
16	20,00	1,02	60,00	42,20	3,55945
17	19,85	1,00	50,78	41,06	3,30547
18	20,00	1,00	45,19	41,14	3,23908

Çizelge 4.4. (Devam)

19	19,46	1,00	57,93	43,30	3,49911
20	20,00	1,00	46,19	39,96	3,23938
21	20,00	1,00	43,17	40,71	3,21881
22	20,00	1,00	43,21	43,51	3,2173
23	19,09	1,00	60,00	43,60	3,54911
24	20,00	1,00	39,66	42,87	3,18354
25	19,68	1,00	43,51	39,63	3,19369
26	20,00	1,00	51,33	36,38	3,21389
27	20,00	1,64	52,69	42,78	3,22034
28	17,58	1,00	60,00	36,18	3,31487
29	20,00	1,00	30,00	36,18	3,31487
30	20,00	1,00	30,15	34,33	3,3369
31	10,33	13,00	60,00	38,55	3,24069
32	10,32	13,00	59,99	38,48	3,23941
33	10,25	13,00	59,99	38,41	3,23919
34	10,56	13,00	59,98	38,71	3,24017
35	10,40	12,99	60,00	38,51	3,23624
36	10,00	13,00	59,99	37,18	3,22039
37	10,00	13,00	59,83	39,78	3,25941
38	11,62	13,00	60,00	39,13	3,23568
39	10,93	13,00	54,20	38,34	3,15189

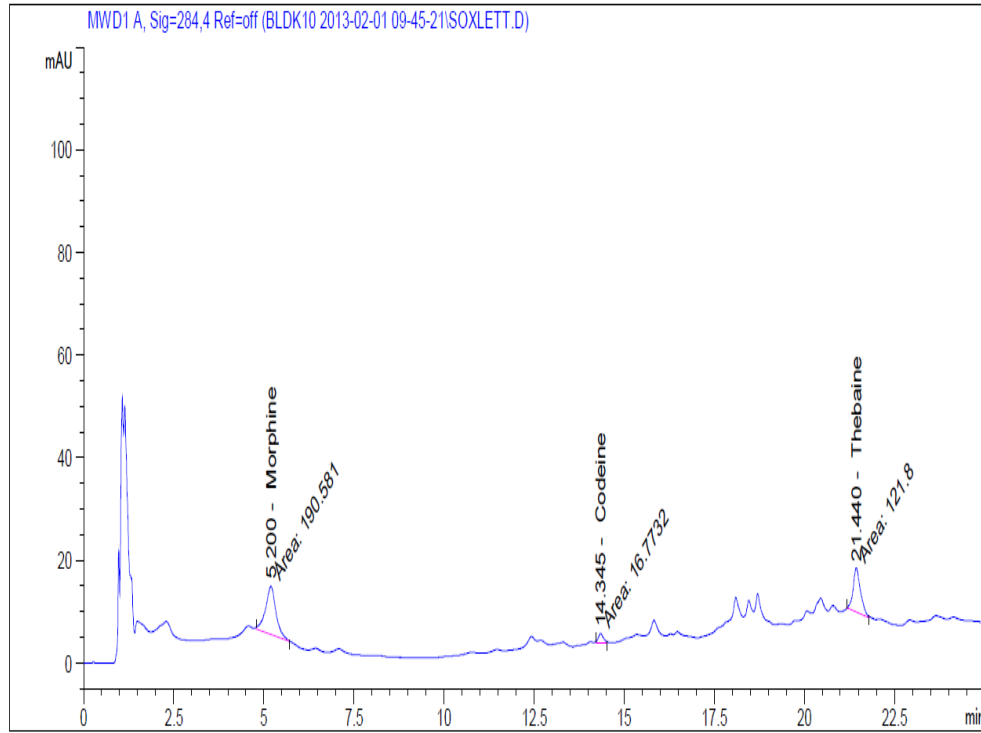
Çizelge 4.4. (Devam)

40	10,34	13,00	54,58	37,38	3,15243
41	11,95	13,00	50,84	39,20	3,1213
42	11,86	13,00	48,81	38,33	3,11212
43	12,18	13,00	46,87	37,11	3,11245
44	11,47	13,00	45,28	37,05	3,12141
45	12,06	13,00	44,87	37,61	3,11658
46	10,00	13,00	46,99	37,03	3,12407
47	12,49	13,00	45,98	38,98	3,10389
48	12,23	13,00	40,01	35,62	3,17897
49	13,05	13,00	38,52	36,33	3,18754
50	13,34	13,00	37,67	36,68	3,19432
51	13,27	13,00	37,10	37,64	3,18435
52	14,15	13,00	34,35	37,30	3,23967

4.3. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyon yöntemi sonucunda geriye kalan numune 35 mL olarak ölçüldü. Ekstraksiyon prosesi tamamlandıktan sonra karışım ilk olarak Whatman filtre kâğıdı ile filtre edildi. Sonra kapiler tıkanmayı önlemek için 0,45 mikron membran filtre (Millipore, Bedford, MA, USA) ile filtre edildi.

HPLC analizinden Şekil 4.17’de görüldüğü gibi kromatogram sonucunda, 1g haşhaş kapsül tozundan 0,819 mg morfin verimi çıkarılmıştır.



Şekil 4.17. Soxhlet ekstraksiyon kromatogramı

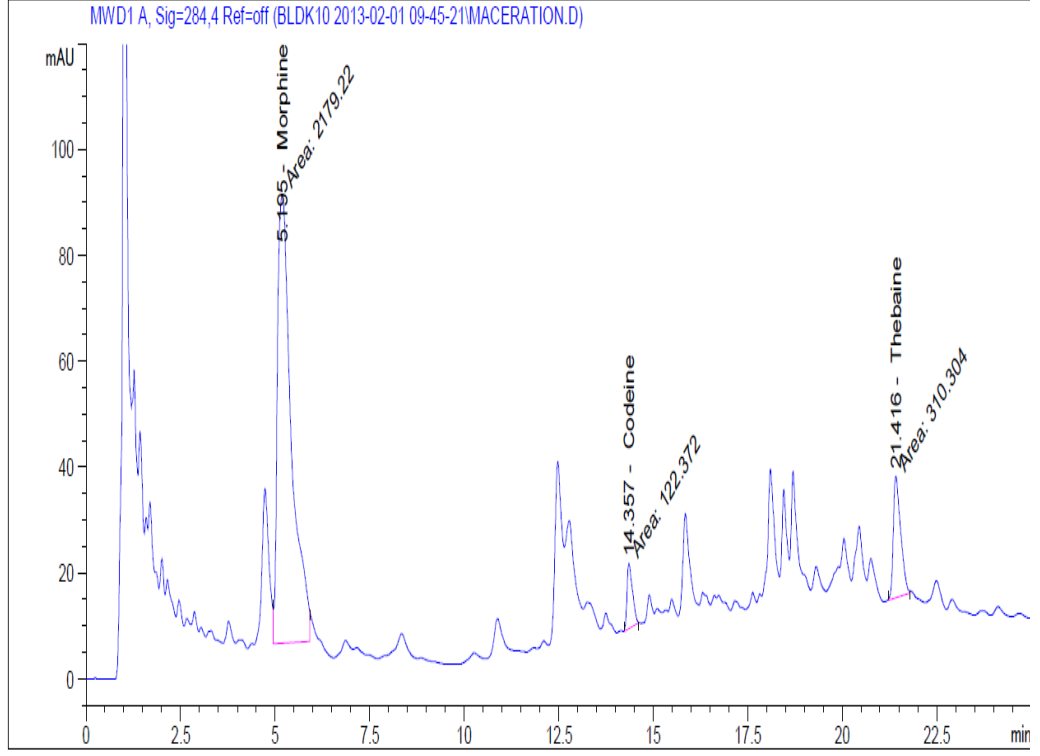
4.4. Maceration Ekstraksiyonu

Her 4 aşamada elde edilen sıvı ekstrakte edildi. Geriye kalan sıvı ekstraktı 25 mL olarak ölçüldü. HPLC analizinden önce Whatman marka filtre kâğıdı ile filtre edildi. Sonra kapiler tıkanmayı önlemek için 0,45 mikron membran filtre (Millipore, Bedford, MA, USA) ile tekrar filtre edildi. Maceration Ekstraksiyonunda kullanılan HPLC koşulları; hazırlanan numune otosampler, quaterner pompa, kolon fırını ve multiwavelength dedektör içeren Agilent 1260 HPLC cihazı ile analiz edildi (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Morfin analiz metodu

Metot	Morfin Analiz Metodu		
Kolon	Waters XBridge® Phenyl, 3.5µm, 3.0 x 150mm		
Enjeksiyon Hacmi	10 µL		
Kolon Sıcaklığı	40°C		
Dedektör	284 nm		
Dalga Boyu			
Akış Hızı	0,8 mL/dakika.		
Çalışma Süresi	30 dakika		
Gradient Koşulları	Zaman (Dakika)	% Mobil Faz A	% Mobil Faz B
	0	99	1
	7	99	1
	17	45	55
	23	45	55
	23,1	0	100
	28	0	100
	28,1	99	1
	30	99	1
Mobil Faz A	0,4 N Asetik asit, pH 4,0		
Mobil Faz B	% 50 Metanol, % 50 su		

HPLC analizinden Şekil 4.18’de görüldüğü gibi kromatogram sonucunda, morfin verimi 7,325 mg olarak hesaplandı (Şekil 4.18).

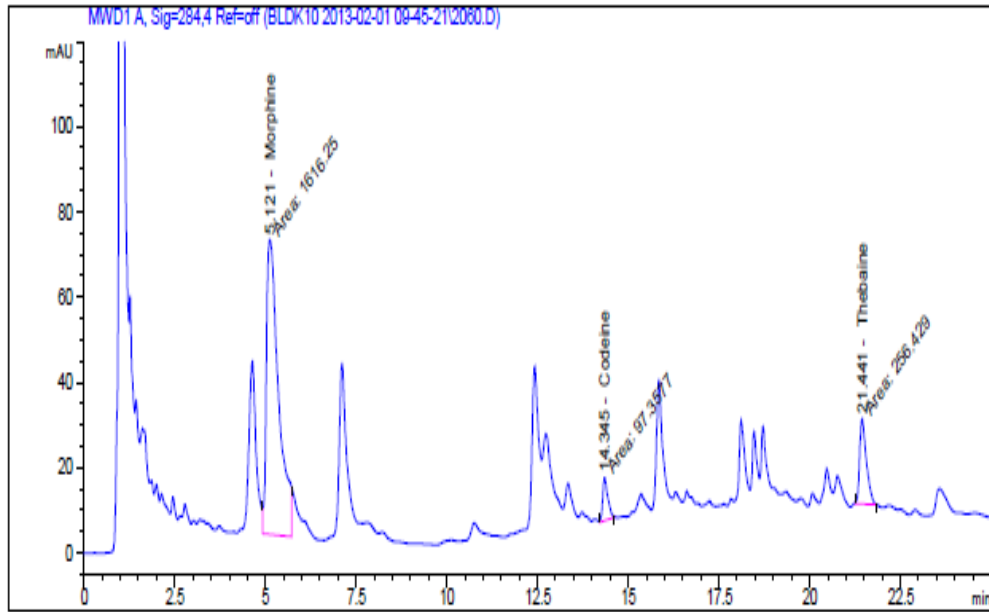


Şekil 4.18. Maceration ekstraksiyon kromatogramı

4.5. Mikrodalga Ekstraksiyonu

Şekil 4.19’da mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle haşhaş kapsül ekstraktı görülmektedir. Ekstraksiyonda kullanılan katı/solvent oranının 500 mg / 20 mL olması, çalışma sonunda kalan atık madde miktarının çevreye zarar vermemesi açısından önemlidir. Bu da çalışmamızın amacını doğrulamaktadır. Mikrodalga ekstraksiyon yönteminde morfin en fazla solvent miktarı 20 mL ve ekstraksiyon süresi 60 dk’da gerçekleşmektedir (Çizelge 4.6). Ekstraksiyonda sıcaklığın önemli bir fonksiyon olduğunu görmekteyiz.

Mikrodalga ekstraksiyonunda kullanılan cihazın gücü ekstraktın morfin üzerinde etkisi önemlidir. Cihazın düşük güçde olması ekstrak seviyesini düşürdüğü yapılan araştırmalarda belirtilmektedir (Proestos C., 2008).



Şekil 4.19. Mikrodalga ekstraksiyon kromatogramı

Çizelge 4.6. Mikrodalga ekstraksiyonu morfin verim değerleri

Çözücü Miktarı (mL)	Süre (s)	Morfin Verimi (mg/500mg Haşhaş kapsülü)
20	20	3,2400
20	40	3,8600
20	60	4,3400
30	20	2,5770
30	40	2,8650
30	60	3,3600
40	20	2,6640
40	40	2,8240
40	60	2,9200

4.6. Manyetik Karıştırıcı İle Ekstraksiyon

Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyonu için 29 numune hazırlandı. Morfin verimim üzerine katı/solvent oranı, pH, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının etkisi çizelge 4.7’de gösterildi.

Çizelge 4.7. Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon verim değerleri

Çalışma	Katı/Çözücü(Solvent) Oranı (g/mL)	pH (pH)	Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)	Morfin Verimi (mg/5g Haşhaş kapsülü)
1	100	1	60	60	20,0
2	200	1	60	60	15,4
3	100	13	60	60	14,3
4	200	13	60	60	16,0
5	150	7	30	30	13,65
6	150	7	90	30	13,8
7	150	7	30	60	13,5
8	150	7	90	90	21,6
9	100	7	60	30	12,7
10	200	7	60	30	13,2
11	100	7	60	90	15,0
12	200	7	60	90	15,4
13	150	1	30	60	14,7
14	150	13	30	60	15,15
15	150	1	90	60	14,85
16	150	13	90	60	16,05
17	100	7	30	60	13,6
18	200	7	30	60	14,2
19	100	7	90	60	13,2
20	200	7	90	60	14,16
21	150	1	60	30	14,4

Çizelge 4.7. (Devam)

22	150	13	60	30	15,75
23	150	1	60	90	16,8
24	150	13	60	90	Yok
25	150	7	60	60	13,05
26	150	7	60	60	13,2
27	150	7	60	60	14,4
28	150	7	60	60	12,9
29	150	7	60	60	12,75

4.7. Ultrasonik Ekstraksiyonu ile Tebain Verimi

Ultrasonik ekstraksiyonu sonucunda 29 numuneden elde edilen tebain veriminde etkili olan dört bağımsız değişken olarak kullanılan katı/solvent oranı, pH, süre ve sıcaklığın etkisi çizelge 4.8’de gösterildi.

Çizelge 4.8. Box-Behnken Design’ında kullanılan bağımsız değişkenlerle birlikte (X_1, X_2, X_3, X_4) ve elde edilen tebain verim değerleri

	X_1	X_2	X_3	X_4	Tebain Verimi
Çalışma	Katı/Solvent Oranı (500 mg/mL)	pH (pH)	Ekstraksiyon Süre (dk)	Ekstraksiyon Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	(mg/500mg Haşhaş Kapsülü)
1	20	1	45	45	6,05
2	40	1	45	45	6,00
3	20	13	45	45	4,96
4	40	13	45	45	5,54
5	30	7	30	30	4,98
6	30	7	60	30	4,86
7	30	7	30	60	5,08
8	30	7	60	60	5,07
9	20	7	45	30	4,80

Çizelge 4.8. (Devam)

10	40	7	45	30	4,96
11	20	7	45	60	4,80
12	40	7	45	60	5,16
13	30	1	30	45	6,03
14	30	13	30	45	5,43
15	30	1	60	45	6,06
16	30	13	60	45	5,41
17	30	7	30	45	4,88
18	40	7	30	45	5,00
19	20	7	60	45	4,76
20	40	7	60	45	5,08
21	30	1	45	30	5,97
22	30	13	45	30	5,40
23	30	1	45	60	6,10
24	30	13	45	60	5,37
25	30	7	45	45	5,01
26	30	7	45	45	5,01
27	30	7	45	45	4,95
28	30	7	45	45	4,89
29	30	7	45	45	5,04

Her kromatograma ait piklerden hesaplanarak bulunan tebain verim değerleri duyarlı ve spesifik bir yöntem olan Box-Behnken Design Expert Programında ANOVA analizleri yapılmıştır. Bu yöntem bileşenlerin türetilmesinde çok önemlidir (Babiker, 2007; Hofmann,1999). Çizelge incelendiği zaman, ultrasonik banyo cihazı kullanılarak gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyonu, tebain veriminin kazanılmasında geleneksel kullanılan yöntemlere alternatif bir yöntem olduğu görülmektedir.

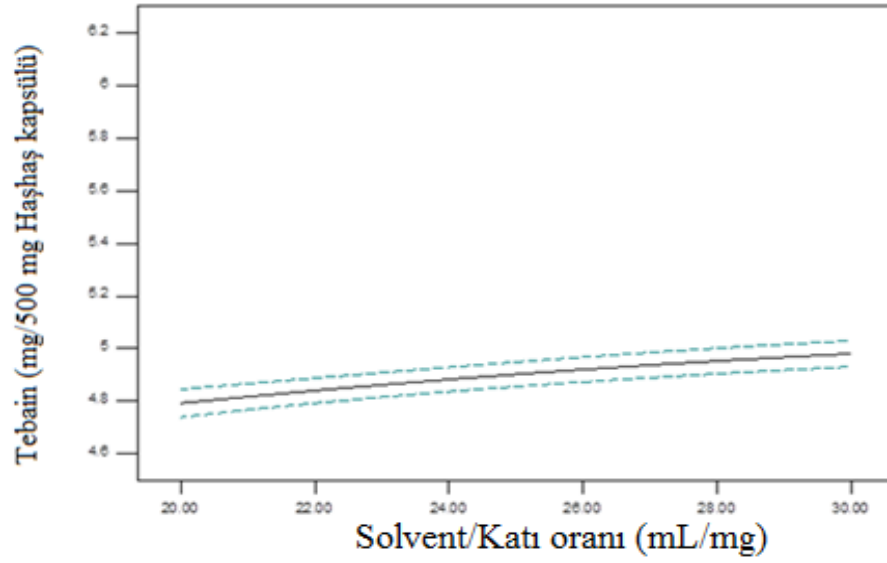
Box-Behnken tasarımı her faktör için üç düzeyde (-1,0, +1) kullanır. Faktörlerin iki 0 düzeyinde sabit tutulurken Bu tasarımda, kalan faktörler bu süreci farklı gruplar için tekrarlanır, seviyeleri +1 ve -1 içindir. Bu çalışmada, Box-Behnken tasarım bağımsız değişkenlerin etkisini keşfetmek için dört değişken ile yapıldı. Burada X_1 (Katı/Çözücü(Solvent) oranı (mg/mL), X_2 (pH), X_3 (zaman-dakika) ve X_4 (sıcaklık-°C) olarak gösterildi (Çizelge 4.9.)

Çizelge 4.9. Tebain Optimizasyonu Response Surface Model(RSM)'de kullanılan bağımsız verilere ait değişkenler ve kod seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Birimler	Değişkenlerin Sembolleri	Kod Seviyeleri		
			-1	0	1
Katı/Solvent oranı	mL / 500 mg	(X_1)	20	30	40
pH	pH	(X_2)	1	7	13
Ekstraksiyon Süresi	dakika	(X_3)	30	45	60
Ekstraksiyon Sıcaklığı	$^{\circ}\text{C}$	(X_4)	30	45	60

4.7.1. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine katı/çözücü oranı'nın etkisi

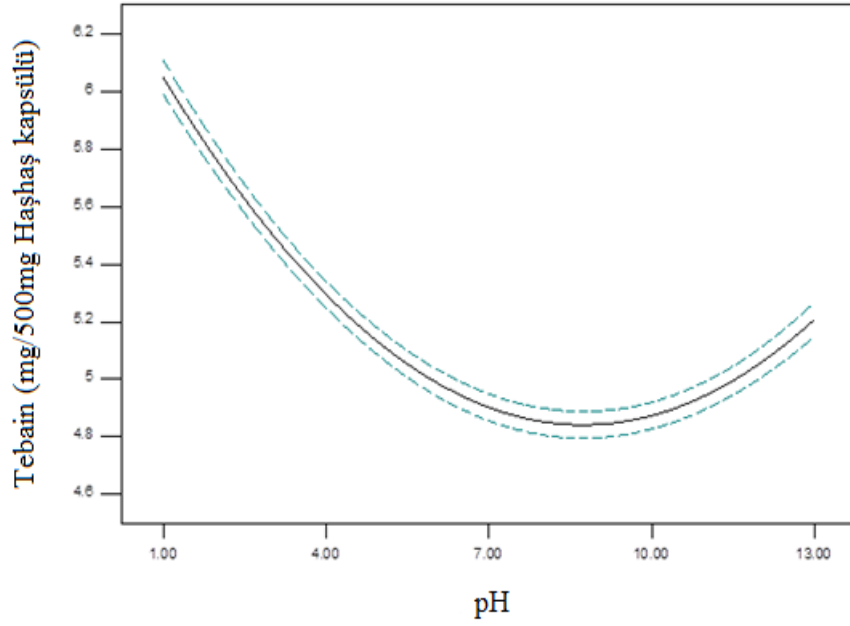
Çözücü / katı oranı önemli bir faktördür. Ayrıca ekstraksiyon verimliliğini optimize etmek için çalışılmıştır. Küçük hacimlerde daha az tebain çıkarılmasına yol açabilir. Büyük çözücü hacimleri, çalışmayı zorlaştırır ve gereksiz atığın oluşmasına neden olmaktadır. Çalışmamızın amacı, çevreye zarar vermeyen işlemlerin yapılmasıdır. Yapılan bir dizi deneylerde, çözücü / katı madde oranı etkisinin değerlendirilmesi için farklı çözücü / katı madde oranı ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çizelde 4.7'de ekstraksiyon verim miktarı solvent hacmi ile arttığını göstermektedir. İtici güç konsantrasyonu daha yüksek diffüzyona neden olduğu katı madde oranı için daha düşük bir solvent, daha fazla olması gerekiyordu. Çünkü solvent miktarının artışı ile verim artışı, kütle transferi ilkeleri ile tutarlıdır (Şekil 4.20).



Şekil 4. 20. Katı/Solvent oranı ile tebain verimi grafiği

4.7.2. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine pH'ın etkisi

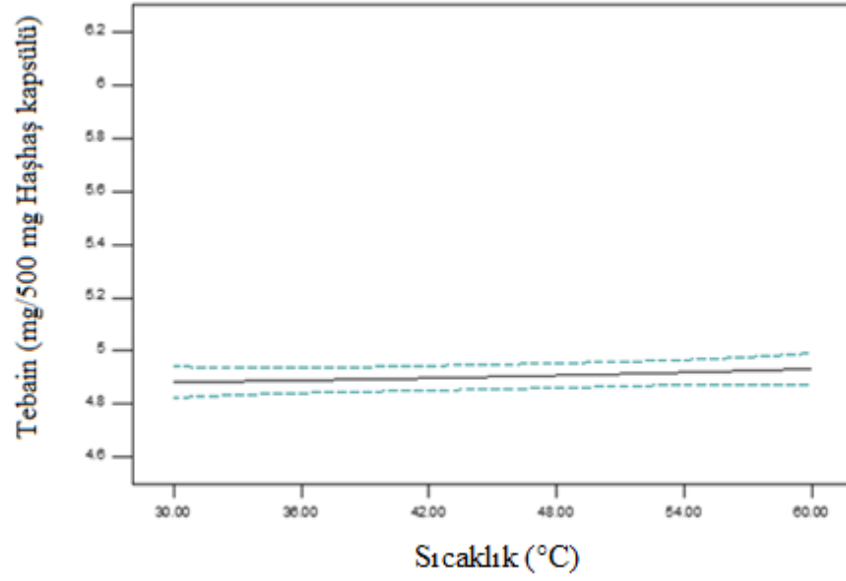
Tebain verimi üzerine çözücü pH'ın etkisi pH = 1-13 aralığında incelenmiştir. pH'ın etkisini gösteren sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Ayrıca, tebain ekstrakt veriminin pH=1'de maksimum olduğu görülmektedir. pH = 7'de verim değeri en düşüktür. pH = 13'de verim değeri orta değeri almaktadır. Asitik ortamların tebain salınımına yardımcı olduğu gerçeği ile açıklanabilir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. pH oranını ile tebain verimi grafiği

4.7.3. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon sıcaklığının etkisi

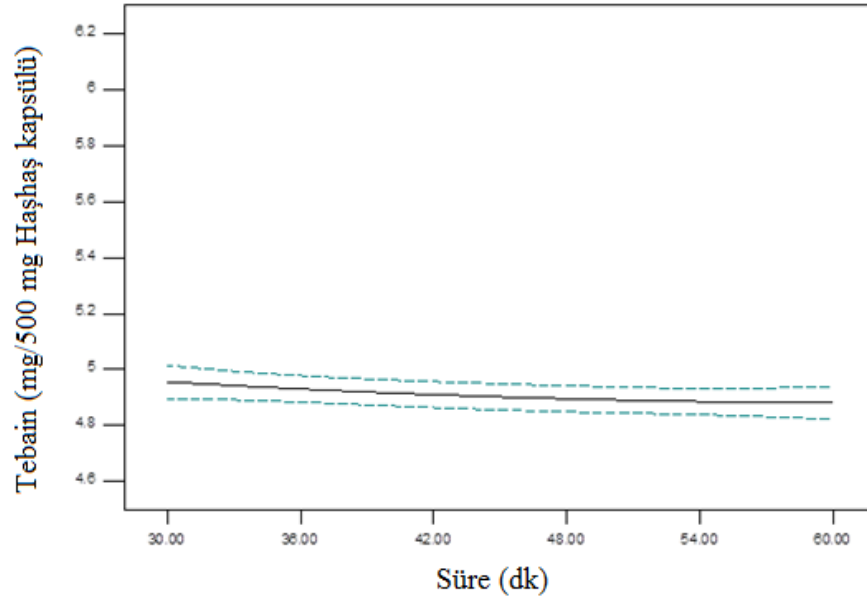
Daha uzun bir sıcaklık tüketilmesi ekonomik açıdan pratik bir durum olmadığı için haşhaş kapsülü ekstraksiyonu, 30 ila 60 °C arasında değişen bir sıcaklıkta üzerinde yapıldı. Beklenildiği gibi ekstraksiyonda morfin ekstrakt sıcaklığı 45°C olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7). Fakat ekstraksiyonda kütle transferi artışı bu sıcaklıkta olmaktadır. Daha sonra yavaş yavaş azaldı, 45°C'ye kadar sıcaklığın bir fonksiyonu olduğu, giderek artan daha yüksek sıcaklıklarda ekstrakt yüzünden kütle transferi ve tebain çıkarma performansını artırmak bitki matrisinin aktif bölgelerinde çözünen gelişmiş geri emilim meydana gelmektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Ekstraksiyon sıcaklığı ile tebain verimi grafiği

4.7.4. Ultrasonik ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi

Tebain veriminin ekstraksiyon süresine etkisi 30-60 dakika aralığında incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Bunlar da ekstraksiyon süresi 30 dakikadan 60 dakikaya doğru gidildikçe tebain çıkarılmasının azaldığı görülmektedir. Zamanın daha fazla olması hücre duvarlarının yıkılması zorlaşmakta ve çözücü içine tebain salınımını daha da azalmaktadır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Ekstraksiyon süre ile tebain verimi grafiği

4.7.5. Response surface methodology (RSM) ile ultrasonik ekstraksiyonda tebain verim optimizasyonu

Değişken yöntemlerinin bireysel etkileri yaklaşık bir faktör olarak bilinen işlem değişkenleri önceki bölümde uygulandı. Birbiriyle olan etkileşimleri klasik yaklaşımda yanıltıcı sonuçlara neden olabildiği gibi, değişkenlerin olası etkileşimleri göz ardı edilebilir. Response surface methodology (RSM)'de işlemde kullanılan parametreler arasındaki bağlantı göz önünde bulunduruldu. Çizelge 4.8'de bağımsız değişkenleri içine alan pH, katı/solvent oranı, ekstraksiyon zamanı ve ekstraksiyon sıcaklığı parametrelerinin minimum, merkez ve maksimum noktalarını göstermektedir. Design expert software programında farklı koşullarda 29 deney kullanıldı.

Response Surface yazılımı yüzey yöntemi kullanarak, haşhaş kapsülünden elde edilen tebain verimi için Box-Behnken design modeli kullanılarak kuadratik model elde edildi. Ayrıca tebain için geriye dönük eleme regresyonu elde edilmiştir.

Response surface methodology yöntemiyle bulunan kuadratik model denklemi aşağıdaki gibidir:

$$T = +7,03882 + 0,00229 X_1 - 0,39236 X_2 - 0,022361 X_3 - 0,011556 X_4 + 0,00262 X_1X_2 + 0,00033 X_1X_3 + 0,00033 X_1X_4 - 0,00014 X_2X_3 - 0,00044 X_2X_4 + 0,00013 X_3X_4 - 0,00064 X_1^2 + 0,02021 X_2^2 + 0,00007 X_3^2 + 0,00002 X_4^2 \quad (4.2)$$

T: Tebain mg,

X_1 : Solvent mL,

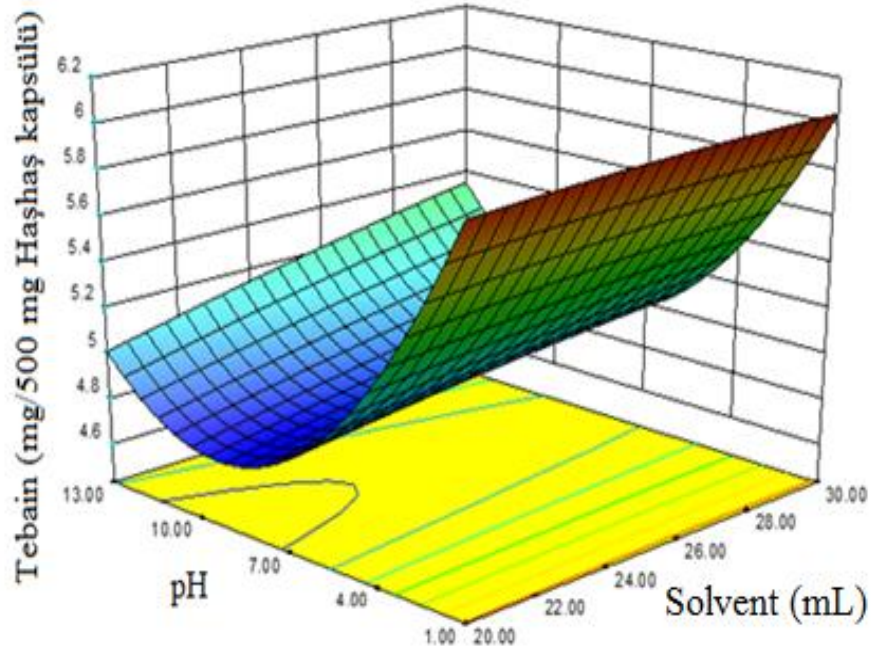
X_2 : pH,

X_3 : Ekstraksiyon süresi dk.,

X_4 : Ekstraksiyon Sıcaklık $^{\circ}\text{C}$

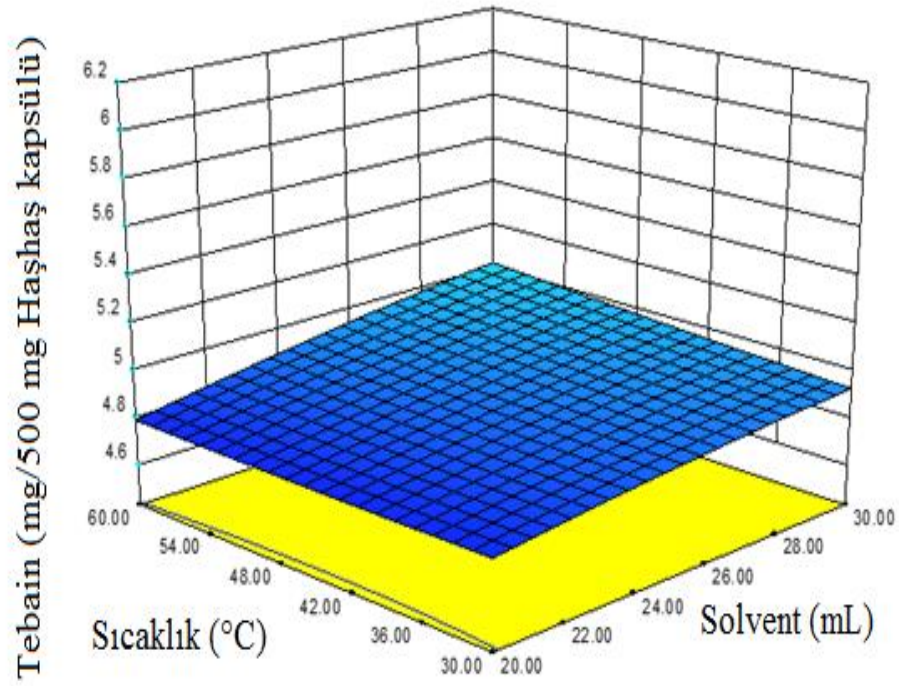
Bu denklemden toplam tebain için teorik değerlerin uygulamasında karşısına çizilmiştir. Bu ilişkiler şekil 4.7’de gösterildi.

Çalışmamızda Şekil 4.24’de görüldüğü üzere katı/solvent oranı olumlu etki göstermektedir. Katı/solvent oranının artması katının toplam miktarını da artırmaktadır. Bu da kütle transferini içermektedir. Yüksek katı/solvent oranı kullanıldığı zaman kütle transferi esnasında itici kuvvet sıvının hacmi ve katı arasında yoğunlaşmaya meyilim arttırmaktadır. Bu da ekstraksiyon miktarının aktif hale gelmesine yol açmaktadır.



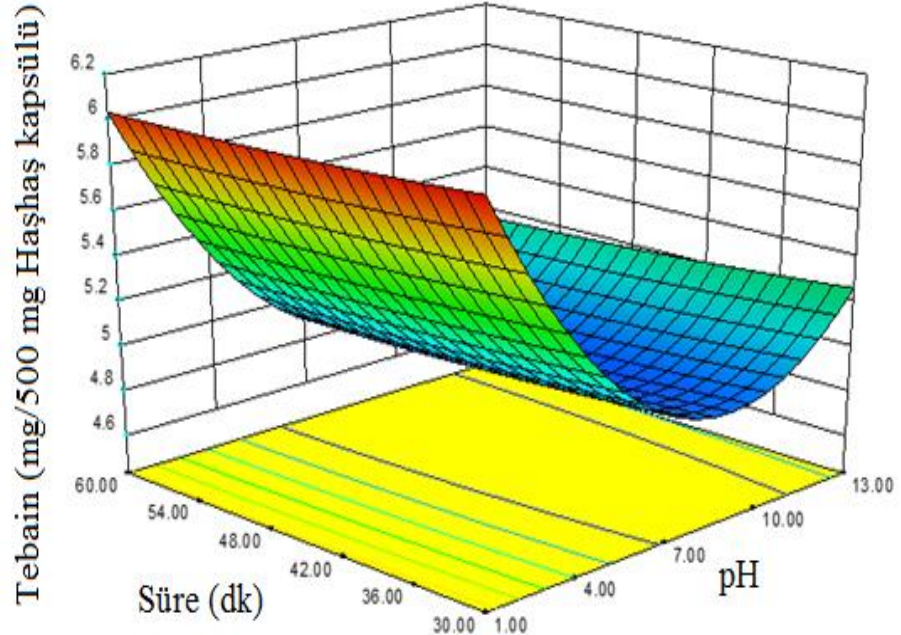
Şekil 4.24. Katı/solvent oranı ve çözücü pH'ın tebain verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Şekil 4.25'te görüldüğü gibi bağımsız değişkenler olan solvent miktarı ve sıcaklığın etkisinin tebain verimi üzerinde etkili olduğu yüzeyi göstermektedir. Solvent miktarının artmasıyla haşhaş kapsülünden tebain veriminin ekstraksiyon alanının arttırdığını görmekteyiz. Bundan dolayı ekstraksiyon sıcaklığının artmasıda etkili olmaktadır.



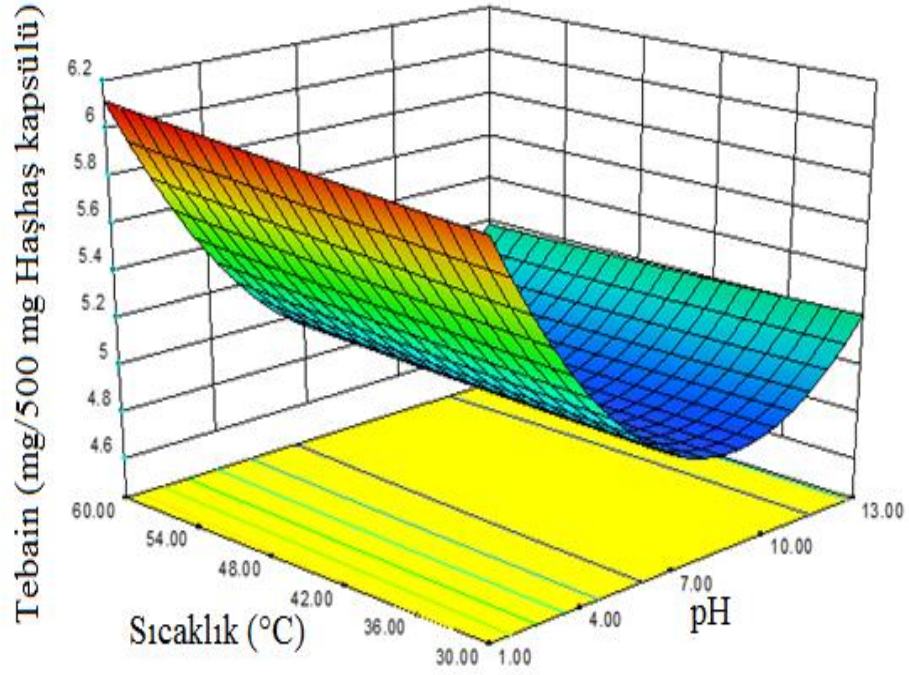
Şekil 4.25. Katı/solvent oranı ve ekstraksiyon sıcaklığının tebain verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Ekstraksiyon süresi ile pH arasında ilişki Şekil 4.26'de gösterilmektedir. Artan zamanlarda tebain verimi artarken, pH değeride bunda olumlu etki yaratmaktadır. Genellikle yöntemin başlamasıyla verim hızlı olarak artmaktadır. Solvent pH değerinin düşük olması dağılım katsayısının yükselmesine neden olmaktadır (Wang, 2007).



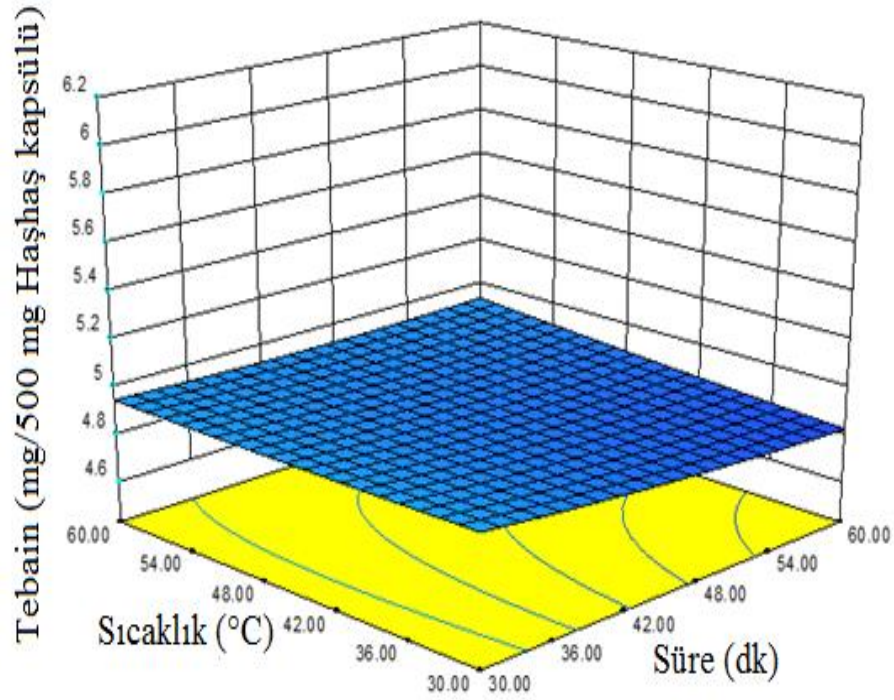
Şekil 4.26. Ekstraksiyon süre ve çözücü pH'ın tebain verimi ilişkisini gösteren yüzey grafiği

Yapılan çalışmada sıcaklık ve pH arasında bir ilişki olduğu görülmektedir (Şekil 4.27). Artan sıcaklıklarda tebain ekstraksiyon miktarının arttığı görülmektedir. Buna karşın pH'ın artan miktarlarında ekstraksiyon miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Asidik ortamda kodein verimi fazla olmaktadır. Burdan sıcaklık ile pH arasındaki ilişkinin gücü ters orantılıdır diyebiliriz.



Şekil 4.27. Ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü bir pH'ın tebain verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Ekstraksiyon süresi ile ekstraksiyon sıcaklığı arasındaki ilişki Şekil 4.28'de gösterilmektedir. Artan zamanlarda tebain verimi azalmakta, sıcaklık değeride bundan olumsuz etkilenmektedir. Genellikle yöntemin başlamasıyla, tebain veriminin değişmediği görülmektedir.



Şekil 4.28. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon sürenin tebain verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

4.7.6. Model uygunluğu

Tebain verimi için Design Expert 8.0.7.1 kuadratik denklem varyans analizi (ANOVA) çizelde 4.9.'de verildi. Sahip olunan bir çok uygun değişkenlerin düzenlenmesi için adım adım regresyon analizi kullanıldı. Bu yönleme göre, elde edilen değişkenlerin (0,1) seviyelerinde ileri ve geri tekniğinin her ikisinde kullanılarak test analizi yapıldı. Geri teknik yönteminde tahmini parametredeki değişkenlerin hepsini içine alır. Alfa seviyesindeki önemli olmayan parametrelerden herhangi bir değişken denklemden çıkarılır. Bu yöntem sola kadar devam eder. $p < 0,05$ değerinde olan standart en yüksek olan önemli değişken denkleme ilave edilecektir. Standart beta değeri çok yüksek ise değerlidir. Değişken önemli ise denkleme ilave edilir.

Bu değerin altında olan değişkenler varsa onlarda elde edilecek olan denklem sistemine ilave yapılır. Bunlar regresyonla aynı sonuca bağlanır (Miles, 2005; Nally, 2000).

Çalışmamızda, Regresyon analiziyle güven aralığının % 95 sağlanmıştır. Çizelge 4.9'de görüldüğü gibi F değeri 151,76 ve $p < 0,0001$ olması iyi bir kanıttır. Bizim kullandığımız modelde (X_1) , (X_2) , (X_1X_2) , (X_1^2) , (X_2^2) güven aralığı içinde önemli medel terimleridir (Çizelge 4.9). Bu terimleri regresyon denkleminde kullanacağız.

Çalışmamızda, R^2 değeri 0,9935; Pred R^2 değeri 0,9731 ve Adj R^2 değeri 0,9869 aralığında olması modelin uygulanabilirliğinin doğruluğunu göstermektedir. Ayrıca response surface modeli tahmini tebain verimi için yeterli sonuçlardır.

Tebain verim modeli için Anova sonuçları istatistiksel modelde belirtilmiştir. Joglekar ve May'e göre; iyi bir model için R^2 değerinin en az 0,8000 olması şartıdır. Çalışmamızda bu değer 0,8000'den çok yüksektir.

Çalışmamızda elde edilen R^2 tebain verim değeri 0,97'dir. Bu değer 1'e çok yakındır. Bu da bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenlerle olan ilişki gücünün çok yüksek olduğunu göstermektedir.

Tebain verimi için R^2 (0,9935), Adj- R^2 (0,9869), Perd- R^2 (0,9731) değerleri Box-Behnken modeli uygulamasının doğruluğunu iyi bir şekilde göstermektedir (Çizelge 4.9). Varyasyon katsayısı (C.V. %) 0,97 olarak bulundu. Böylece, Response Surface Modelinde deneysel sonuçların gerçekliği haşhaş kapsül tozlarından tahmini tebain verimi elde edilmesinde yeterli bir başarı sağlanmıştır (Pan, 2011; Zhu, 2007).

Tebain için Design Expert 8.0.7.1'in kuadratik denklemi ANOVA analizi çizelge 4.9'da verilmektedir. Regresyon analizi için güven aralığı % 95 olduğu görülmektedir. ANOVAYA göre F değeri modelinin 151,76 olması model uygulaması için önemlidir.

Bizde (X_1), (X_2), (X_1X_2), (X_1^2), (X_2^2) model teriminde önemlidir. Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklık (X_1) ve (X_2)’nın tebain üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Lack of fit’in F – Value değerinin 151,76 olması model için önemli bir değerdir.

Çizelge 4.10. Tebain verimi için Design Expert 8.0.7.1’in kuadratik denkleminin varyans (ANOVA) analizi

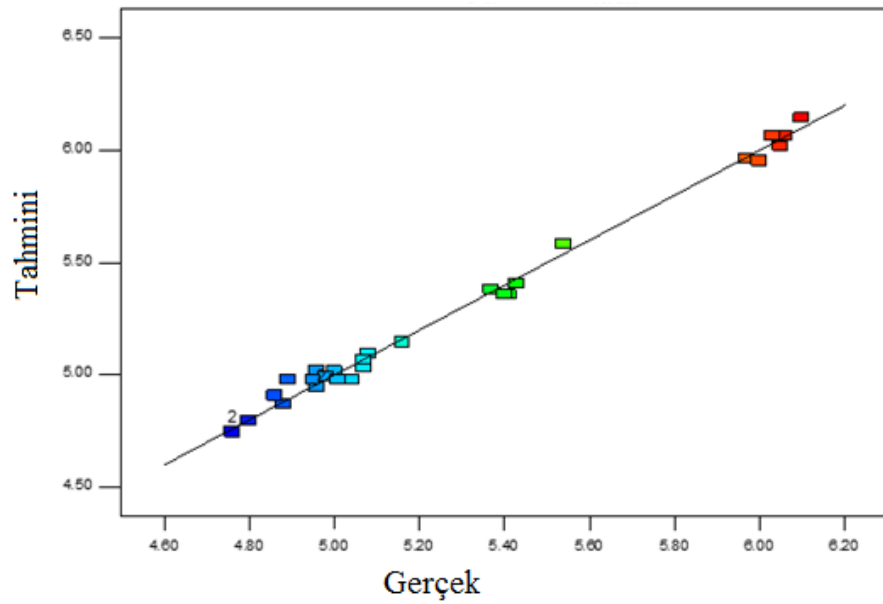
Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri Prob.>f
Model	5,56	14	0,40	151,76	< 0,0001
X_1 - Katı/Solvent	0,15	1	0,15	56,78	< 0,0001
X_2 -pH	1,21	1	1,21	462,87	< 0,0001
X_3 -Süre	0,0096	1	0,0096	3,68	0,0756
X_4 -Sıcaklık	0,0043	1	0,0043	1,64	0,2216
$X_1 X_2$	0,099	1	0,099	37,89	< 0,0001
$X_1 X_3$	0,010	1	0,010	3,82	0,0709
$X_1 X_4$	0,010	1	0,010	3,82	0,0709
$X_2 X_3$	0,00063	1	0,00063	0,24	0,6327
$X_2 X_4$	0,0064	1	0,0064	2,44	0,1403
$X_3 X_4$	0,0036	1	0,0036	1,37	0,2605
X_1^2	0,0026	1	0,0026	10,07	0,0068
X_2^2	3,43	1	3,43	1311,08	<0,0001
X_3^2	0,0017	1	0,0017	0,65	0,4322
X_4^2	0,00016	1	0,00016	0,062	0,8071
Residual	0,037	14	0,0026	-	-
Lack of fit	0,022	10	0,0022	0,62	0,7554
Pure error	0,014	4	0,0036	-	-
Cor. total	5,60	28	-	-	-

df, serbestlik derecesi

cor, ortalama için düzeltilmiş tüm bilgilerin toplamı

Çok yakın ve çok yüksek çoklu katsayıların (R^2 , $Adj-R^2$ and $Pred-R^2$) modelin doğruluğunu göstermektedir. $Adj-R^2$ gerçek ve tahmini veriler arasındaki ilişkinin derecesinin yüksek olduğunun kanıtıdır. Çalışmamızda, R^2 (0,9935), $Adj-R^2$ (0,9869) ve $Pred-R^2$ (0,9731) değerleri modelin doğru olarak uygulanacağını göstermektedir

Böylece, response surface modeli ultrasonik ekstraksiyonu ile haşhaş kapsülünden yeterli tebain çıkarılması başarılı olabilir. Varyasyon katsayısının çok düşük olması deney sonuçlarının gerçekliğini ve kesinliğinin delilidir (Pan, 2011; Zhu, 2007). Şekil 4.29'da ultrasonik ekstraksiyonla haşhaş kapsülünden elde edilen tebain ekstraktı deney ve tahmini veriler arasındaki ilişkinin gücünü göstermektedir. Görüldüğü gibi modelden elde edilen tahmini veri uygulanan koşullarda deney verileri ile çok iyi uygunluk vermektedir.



Şekil 4.29. Model denklem kullanılarak hesaplanan değerlere karşı deneysel olarak elde edilen değerler arasındaki ilişki

Box-Behnken Design programı yardımıyla tebain optimizasyon analizi çalışması yapılmıştır. İdeal ekstraksiyon koşulları design expert yazılımı kullanılarak maksimum koşullar bulundu. Bu değer pH = 1,00; ekstraksiyon süresi 59,99 dakika, ekstraksiyon sıcaklığı 59,99 °C ve katı/solvent oranı 32,17 mL bulundu. Ayrıca maksimum tebain verimi bu uygulanan koşullarda 6,20 mg tebain / 500 mg haşhaş kapsülü olarak bulundu.

4.8. Ultrasonik Ekstraksiyon ile Kodein Verimi

Ultrasonik ekstraksiyonu sonucunda 29 numuneden elde edilen kodein veriminde etkili olan dört bağımsız değişken olan katı/solvent oranı, pH, süre ve sıcaklığın etkisi çizelge 4.11’de gösterildi.

Çizelge 4.11. Box-Behnken Design’ın da kullanılan bağımsız değişkenler (X_1, X_2, X_3, X_4) ve elde edilen Kodein verim değerleri

	X_1	X_2	X_3	X_4	Kodein Verimi
Çalışma	Katı/Solvent Oranı (500 mg/mL)	pH (pH)	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	(mg/500mg Haşhaş Kapsülü)
1	10	1	45	40	0,190
2	20	1	45	40	0,220
3	10	13	45	40	0,269
4	20	13	45	40	0,230
5	15	7	30	30	0,137
6	15	7	60	30	0,188
7	15	7	30	50	0,141
8	15	7	60	50	0,130

Çizelge 4.11. (Devam)

9	10	7	45	30	0,181
10	20	7	45	30	0,190
11	10	7	45	50	0,120
12	20	7	45	50	0,174
13	15	1	30	40	0,192
14	15	13	30	40	0,230
15	15	1	60	40	0,165
16	15	13	60	40	0,236
17	10	7	30	40	0,174
18	20	7	30	40	0,200
19	10	7	60	40	0,204
20	20	7	60	40	0,192
21	15	1	45	30	0,168
22	15	13	45	30	0,242
23	15	1	45	50	0,152
24	15	13	45	50	0,188
25	15	7	45	40	0,180
26	15	7	45	40	0,180
27	15	7	45	40	0,165
28	15	7	45	40	0,180
29	15	7	45	40	0,195

Her kromatograma ait piklerden hesaplanarak bulunan kodein verim değerleri duyarlı ve spesifik bir yöntem olan Box-Behnken Design Expert Programında ANOVA analizleri yapılmıştır. Bu yöntem bileşenlerin türetilmesinde çok önemli istatistiksel bir yöntemdir (Babiker, 2007; Hofmann,1999).

Çizelge incelendiği zaman, ultrasonik banyo cihazı kullanılarak gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyonu, kodein veriminin kazanılmasında geleneksel kullanılan yöntemlere alternatif bir yöntem olduğu görülmektedir.

Box-Behnken tasarımı her faktör için üç düzeyde (-1,0, +1) kullanır. Faktörlerin iki 0 düzeyinde sabit tutulurken Bu tasarımda, kalan faktörler bu süreci farklı gruplar için tekrarlanır, seviyeleri +1 ve -1 içindir. Bu çalışmada, Box-Behnken tasarım bağımsız değişkenlerin etkisini keşfetmek için dört değişken ile yapıldı. Burada X_1 (Katı/Solvent oranı-mg/mL), X_2 (pH), X_3 (zaman-dakika) ve X_4 (sıcaklık-°C) olarak gösterildi (Çizelge 4.12.)

Çizelge 4.12. Kodein Optimizasyonu Response Surface Model (RSM)'nin bağımsız değişkenleri ve kod seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Birimler	Değişkenlerin Sembolleri	Kod Seviyeleri		
			-1	0	+1
Katı/Solvent oranı	mg/mL	X_1	500/10	500/15	500/20
pH	pH	X_2	1	7	13
Süre	Dakika	X_3	30	45	60
Sıcaklık	°C	X_4	30	40	50

4.8.1. Response surface methodology (RSM) ile ultrasonik ekstraksiyonda kodein verim optimizasyonu

Değişken yöntemlerinin bireysel etkileri yaklaşık bir faktör olarak bilinen işlem değişkenleri önceki bölümde uygulandı. Birbiriyle olan etkileşimleri klasik yaklaşımda yanıltıcı sonuçlara neden olabildiği gibi, değişkenlerinin olası etkileşimleri göz ardı edilebilir. Response surface methodology (RSM)'de işlemde kullanılan parametreler arasındaki bağlantı göz önünde bulunduruldu. Çizelge 4.11'de bağımsız değişkenleri içine alan pH, katı/solvent oranı, ekstraksiyon zamanı ve ekstraksiyon sıcaklığı parametrelerinin minimum, merkez ve maksimum noktalarını göstermektedir. Design expert software programında farklı koşullarda 29 deney kullanıldı.

Response Surface yazılımı yüzey yöntemi kullanarak, haşhaş kapsülünden elde edilen kodein verimi için Box-Behnken design modeli kullanılarak kuadratik model elde edildi. Ayrıca kodein için geriye dönük eleme regresyonu elde edilmiştir.

Response surface methodology yöntemiyle bulunan kuadratik model denklemi aşağıdaki gibidir:

$$K = 0,31048 - 0,01609 x_1 + 0,00259 x_2 + 0,00739 x_3 + 0,02204 x_4 - 0,00058 x_1 x_2 - 0,00013 x_1 x_3 + 0,00023 x_1 x_4 + 0,00009 x_2 x_3 - 0,00016 x_2 x_4 - 0,00010 x_3 x_4 + 0,00060 x_1^2 + 0,00089 x_2^2 - 0,00002 x_3^2 - 0,00027 x_4^2 \quad (4.3)$$

K: Kodein mg,

X_1 : Solvent mL,

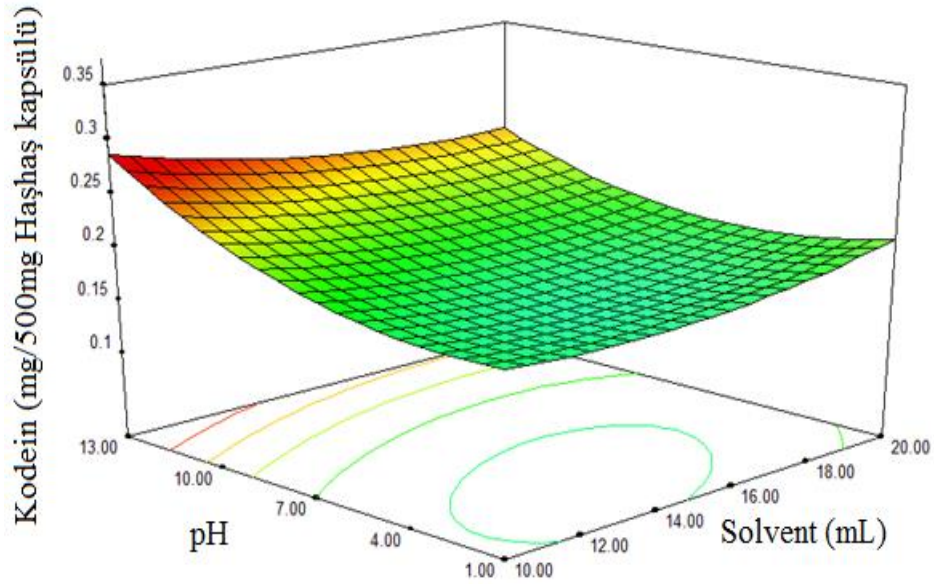
X_2 : pH,

X_3 : Ekstraksiyon süresi dk.,

X_4 : Ekstraksiyon Sıcaklık $^{\circ}\text{C}$

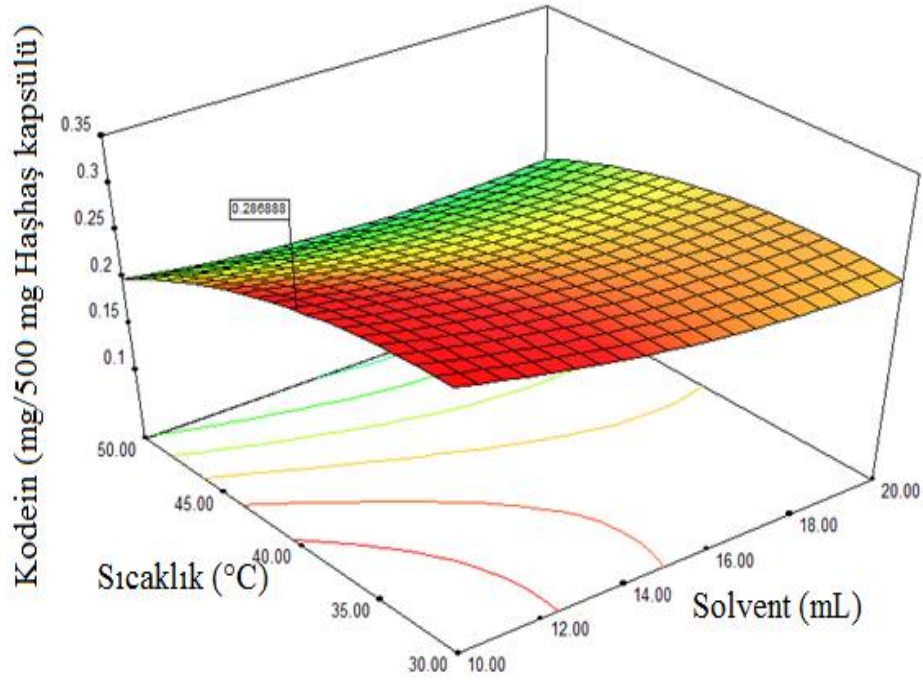
Bu denklemden toplam kodein için teorik değerlerin uygulamalarının karşısına çizilmiştir. Bu ilişkiler şekil 4.30'da gösterildi.

Çalışmamızda Şekil 4.30'da görüldüğü üzere, katı/solvent oranının artması kodein verimi üzerinde etkili olmamaktadır. Katı/solvent oranının artması katının toplam miktarını da artırmaktadır. Bu da kütle transferini içermektedir. Yüksek katı/solvent oranı kullanıldığı zaman kütle transferi esnasında itici kuvvet sıvının hacmi ve katı arasında yoğunlaşmaya meyilim artırmaktadır. Kullanılan çözücü pH'nın bazik olması verimi arttırmaktadır.



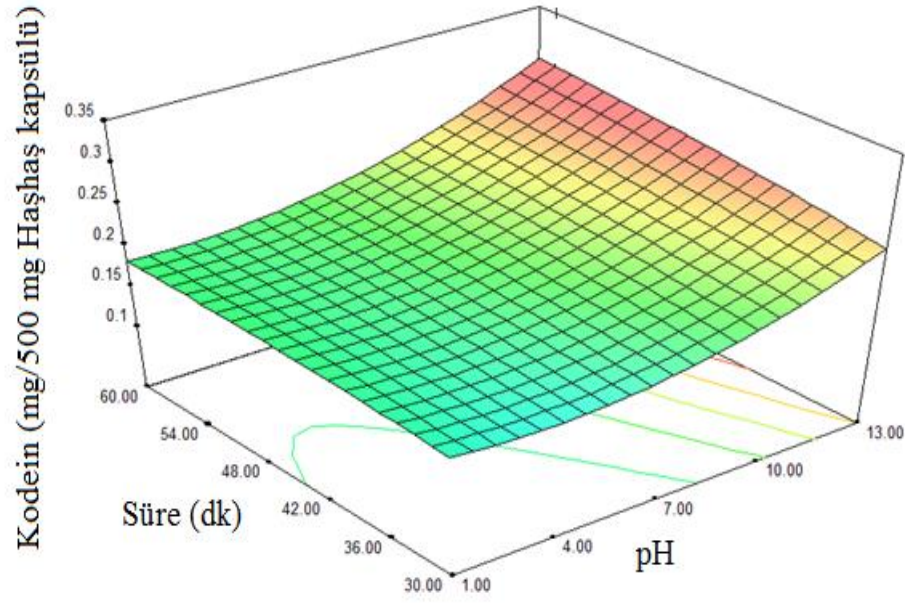
Şekil 4.30. Katı/solvent oranını ve çözücü pH'nın kodein verimi arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Şekil 4.31'de görüldüğü gibi bağımsız değişkenler olan solvent miktarı ve sıcaklığın etkisinin kodein verimi üzerinde etkili olduğu yüzeyi göstermektedir. Solvent miktarının artması ile birlikte ekstraksiyon sıcaklığının yüksek olması haşhaş kapsülünden kodein ekstrak verimini azaldığını görmekteyiz.



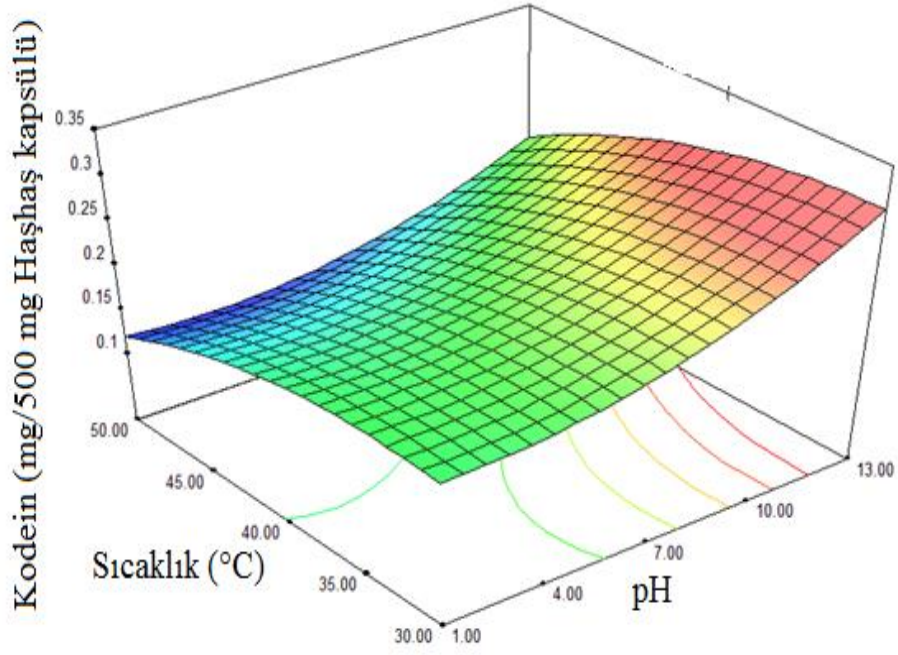
Şekil 4.31. Katı/solvent oranı ve ekstraksiyon sıcaklığının kodein verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Kodein verimi üzerinde, ekstraksiyon süresi ile pH arasında ilişki Şekil 4.32’de gösterilmektedir. Artan zamanlarda kodein veriminde değişme olmadığı, pH değerinde olumlu etki yaratmadığı görülmektedir. Genellikle yöntemin başlamasıyla verim hızlı olarak artmaktadır. Solvent pH değerinin düşük olması dağılım katsayısının yükselmesine neden olmaktadır (Wang, 2007).



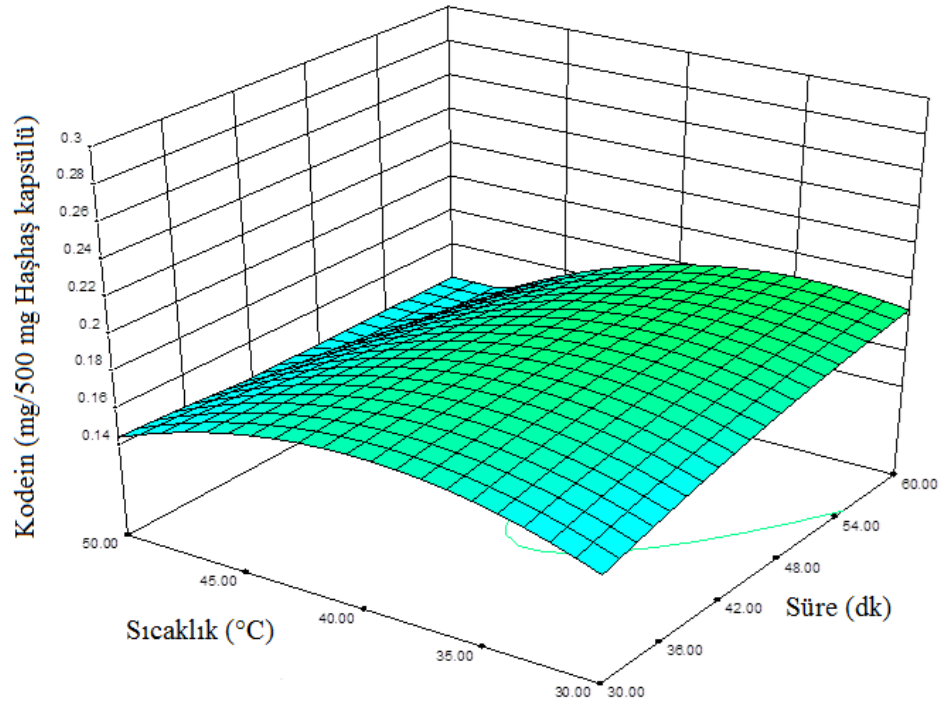
Şekil 4.32. Ekstraksiyon süre ve çözücü pH'ın kodein verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Yapılan çalışmada, ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü pH arasındaki ilişki Şekil 4.33'te görülmektedir. Artan sıcaklıklarda kodein ekstraksiyon miktarının azaldığı yüzey grafiğinde görülmektedir. Buna karşın çözücü pH'ın artan miktarlarında ekstraksiyon miktarında artma olduğu tespit edilmiştir. Burdan ekstraksiyon sıcaklığı ile pH arasındaki ilişki gücünün ters orantılı olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.33. Ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü bir pH'ın kodein verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

Kodein verimi üzerine ekstraksiyon süresi ile ekstraksiyon sıcaklığı arasındaki ilişki Şekil 4.34'de gösterilmektedir. Artan zamanlarda kodein verimi değişmiyor. Artan sıcaklık değerinde ise kodein verim miktarında artma olmamaktadır. Kodein verimi üzerinde bu parametrelerin etkisi olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.34. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon sürenin kodein verimi arasında ilişkiyi gösteren yüzey grafiği

4.8.2. Model uygunluğu

Kodein verimi için Design Expert 8.0.7.1 kuadratik denklem varyans analizi (ANOVA) çizelde 4.3.'de verildi. Sahip olunan bir çok uygun değişkenlerin düzenlenmesi için adım adım regresyon analizi kullanıldı. Bu yönleme göre, elde edilen değişkenlerin (0,1) seviyelerinde ileri ve geri tekniğinin her ikisinde kullanılarak test analizi yapıldı. Geri teknik yönteminde tahmini parametredeki değişkenlerin hepsini içine alır. Alfa seviyesindeki önemli olmayan parametrelerden herhangi bir değişken denklemden çıkarılır. Bu yöntem sola kadar devam eder. $p < 0,05$ değerinde olan standart en yüksek olan önemli değişken denkleme ilave edilecektir. Standart beta değeri çok yüksek ise değerlidir. Değişken önemli ise denkleme ilave edilir.

Bu değerin altında olan değişkenler varsa onlarda elde edilecek olan denklem sistemine ilave yapılır. Bunlar regresyonla aynı sonuca bağlanır (Miles, 2005; Nally, 2000).

Çalışmamızda, Regresyon analiziyle güven aralığının % 95 sağlanmıştır. Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi F değeri 17,10 ve $p < 0,0001$ olması iyi bir kanıttır. Bizim kullandığımız modelde $X_2, X_2^2, X_4^2, X_4, X_1X_2, X_3X_4, X_1^2$ güven aralığı içinde önemli medel terimleridir (Çizelge 4.13). Bu terimleri regresyon denkleminde kullanacağız.

Çalışmamızda, R^2 değeri 0,9447, Pred R^2 değeri 0,7390 ve Adj R^2 değeri 0,8895 aralığında olması modelin uygulanabilirliğinin doğruluğunu göstermektedir. Ayrıca response surface modeli tahmini kodein verimi için yeterli sonuçlardır.

Kodein verim modeli için Anova sonuçları istatistiksel modelde belirtilmiştir. Joglekar ve May’e göre; iyi bir model için R^2 değerinin en az 0,8000 olması şarttır. Çalışmamızda bu değer 0,8000’den çok yüksektir.

Çalışmamızda elde edilen R^2 kodein verim değeri 0,9447’dir. Bu değer 1’e çok yakındır. Bu da bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenlerle olan ilişki gücünün çok yüksek olduğunu göstermektedir.

Kodein verimi için R^2 (0,9447), Adj- R^2 (0,8895), Perd- R^2 (0,7390) değerleri Box-Behnken modeli uygulamasının doğruluğunu iyi bir şekilde göstermektedir (Çizelge 4.13). Varyasyon katsayısı (C.V. %) 6,11 olarak bulundu. Böylece, Response Surface Modelinde deneysel sonuçların gerçekliği haşhaş kapsül tozlarından tahmini kodein verimi elde edilmesinde yeterli bir başarı sağlanmıştır (Pan, 2011; Zhu, 2007).

Kodein verimi için Design Expert 8.0.7.1’in kuadratik denklemi ANOVA analizini çizelge 4.13 verilmektedir. Regresyon analizi için güven aralığı % 95 olduğu görülmektedir. ANOVAYA göre F – Value modelinin 17,10 olması model uygulaması için önemlidir.

Bizde $X_2, X_2^2, X_4^2, X_4, X_1X_2, X_3X_4, X_1^2$ model teriminde önemlidir. Çizelge 4.13'te görüldüğü gibi çözücünün pH değeri, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının kodein verimi üzerinde çok önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. Lack of fit'in F – Value değerinin 17,10 olması model için önemli bir değerdir.

Çizelge 4.13. Kodein verimi için Design Expert 8.0.7.1'in kuadratik denkleminin varyans (ANOVA) analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri Prob.>f
Model	0,031	14	2,22	17,10	< 0,0001
X_1 -Katı/Solvent	3,5	1	3,85	2,96	0,1072
X_2 -pH	7,90	1	7,90	60,77	< 0,0001
X_3 -Süre	1,40	1	1,40	1,08	0,3170
X_4 -Sıcaklık	3,36	1	3,36	25,88	0,0002
X_1X_2	1,19	1	0,11	6,33	0,0247
X_1X_3	3,61	1	3,61	2,78	0,1179
X_1X_4	5,06	1	5,06	3,89	0,0686
X_2X_3	2,72	1	2,72	2,09	0,1700
X_2X_4	3,61	1	3,61	2,78	0,1179
X_3X_4	9,61	1	9,61	7,39	0,0167
X_1^2	1,45	1	1,45	11,16	0,0049
X_2^2	6,72	1	6,72	51,73	<0,0001
X_3^2	1,26	1	1,26	0,97	0,3407
X_4^2	4,61	1	4,61	35,46	<0,0001

Çizelge 4.13. (Devam)

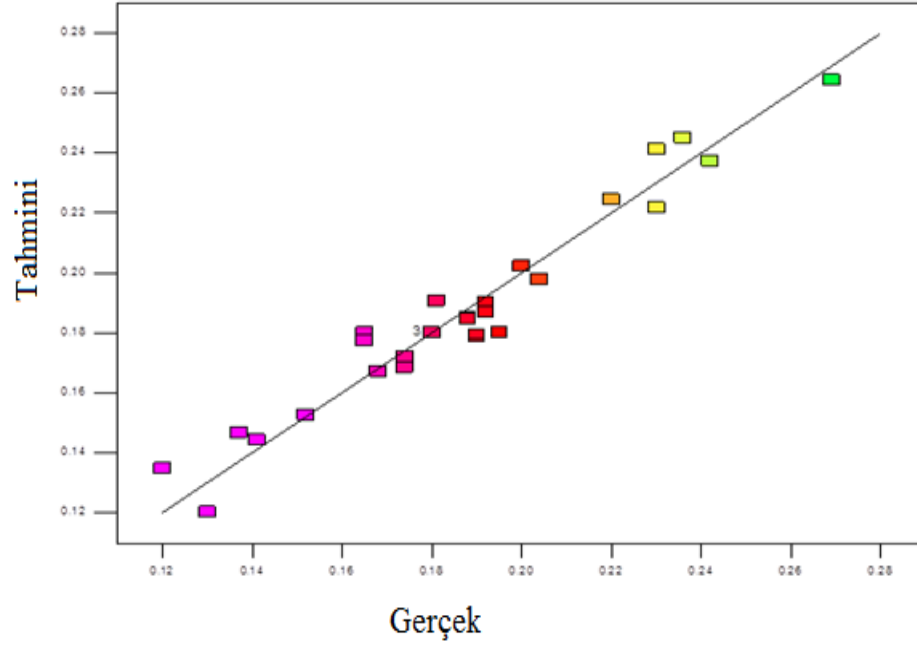
Residual	1,82	14	1,301	-	-
Lack of fit	1,37	10	1,37	1,22	0,4592
Pure error	4,500	4	1,125	-	-
Cor. total	0,033	28	-	-	-

df, serbestlik derecesi

cor, ortalama için düzeltilmiş tüm bilgilerin toplamı

Çok yakın ve çok yüksek çoklu katsayıların (R^2 , $Adj-R^2$ and $Pred-R^2$) modelin doğruluğunu göstermektedir. $Adj-R^2$ gerçek ve tahmini veriler arasındaki ilişkinin derecesinin yüksek olduğunun kanıtıdır. Çalışmamızda, için R^2 (0,9447), $Adj-R^2$ (0,8895) ve $Perd-R^2$ (0,7390) değerleri modelin doğru olarak uygulanacağını göstermektedir

Böylece, response surface modeli ultrasonik ekstraksiyonu ile haşhaş kapsülünden yeterli kodein veriminin çıkarılması istenilen seviyede sağlanamamıştır. Varyasyon katsayısının çok düşük olması deney sonuçlarının gerçekliğini ve kesinliğini gösteren delildir (Pan, 2011; Zhu, 2007). Şekil 4.35’de ultrasonik ekstraksiyonla haşhaş kapsülünden elde edilen kodein ekstraktı denklem 4.1’den deney ve tahmini veriler arasındaki ilişkinin gücünü göstermektedir.



Şekil 4.35. Model denklem kullanılarak hesaplanan değerlere karşı deneysel olarak elde edilen değerler arasındaki ilişki

Box-Behnken Design programı yardımıyla kodein optimizasyon analizi çalışması yapılmıştır. İdeal ekstraksiyon koşulları design expert yazılımı kullanılarak maksimum koşullar bulundu. Bu değer, pH = 13, ekstraksiyon süresi 57,60 dakika, ekstraksiyon sıcaklığı 35,83 °C ve katı/solvent oranı 10 mL bulundu. Ayrıca, maksimum kodein verimi bu uygulanan koşullarda 0,2955 mg kodein / 500 mg haşhaş kapsülü olarak bulundu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Haşhaş kapsül tozundan morfin ekstrakte edilmesi için kullanılan metotları ve bu metotlar sonucunda elde edilen maksimum morfin miktarları çizelge 5.1’de belirtilmiştir. Morfinin elde edilmesinde çözücü olarak saf suyun kullanıldığı ekstraksiyonlar sonucunda en iyi ekstraksiyon verimleri elde edilmiştir. Haşhaş kapsülünden elde edilen morfin miktarlarına göre ekstraksiyon metotları karşılaştırıldığı zaman sırasıyla soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu, maceration ekstraksiyonu ve mekanik karıştırıcı ile ekstraksiyonu şeklinde ekstraksiyon verimleri çizelge 5.1’de belirtilmektedir.

Çizelge 5.1. Farklı ekstraksiyon metoduna göre en yüksek morfin verim değerleri

Ekstraksiyon Türü	Haşhaş Kapsül Tozu Miktarı (g)	Morfin Verim Miktarı (mg)	% Verim Miktarı
Ultrasonik Ekstraksiyonu	1	6,7000	0,067
Soxhlet Ekstraksiyonu	1	0,8190	0,0081
Maceration Ekstraksiyonu	1	7,3250	0,0732
Mikrodalga Ekstraksiyonu	1	8,6800	0,0868
Manyetik karıştırıcı ile Ekstraksiyon	1	4,3200	0,0432

Chemat ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre; ultrasonik ekstraksiyon yöntemi, morfin ekstraktı üzerine katı / solvent oranı, pH, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı arasındaki ilişki şekil 4.6-7-8-9'da görülmektedir. Katı-sıvı ekstraksiyonu için etkili bir yöntemdir. Bununla birlikte, çok sayıda örneğin ultrasonik banyo ile analiz edilmesi daha iyi bir seçenektir. Ultrasonik banyonun güç seviyesi çok yüksek olduğu zaman haşhaş kapsülünden morfin ekstraktı daha az olmaktadır. % 80 oranında güç azaltıldığında ekstrak sıcaklığı düşmesiyle elde edilen verim değeride artmaktadır. Bundan dolayı çalışmamızda yaklaşık 40 °C de ve 30 dakika sürede en yüksek morfin verim değeri elde edilmiştir. Bundan dolayı 30 dakika en iyi ekstraksiyon zamanı seçilmiştir (Chemat et al., 2004; Gogate et al., 2004). Diğer ekstraksiyon çalışmalarında bu ekstraksiyon süresi dikkate alınmıştır.

Herodez'in çalışmasına göre; son zamanlarda, solvent miktarını azaltmayı sağlamak için analitik örnek hazırlama işlemlerine önem veren yöntemdir. Ultrasonik ekstraksiyonun morfin verimi üzerinde katı solvent oranı ve zaman değişkenlerin gücü çok etkilidir. Gerçekte katı/solvent oranı yüksekse, katının toplam miktarı elde edilir. Bu kütle transfer ilkesini içerir. Kütle transferi esnasında itici güç sıvının hacmi ve katı arasındaki yoğunluk eğimine bağlıdır. Çok yüksek katı/solvent oranı kullanıldığı zaman bu kütle transferi hızlı olmaktadır. Benzer olarak da sıcaklığın etkisi ekstraksiyonu olumlu etkilemektedir. Ekstraksiyon sıcaklığı 40 °C – 60 °C'de morfin ekstraktı artmaktadır. Çalışmamızda şekil 4.11'de ekstraksiyon sıcaklığı ve katı/solvent oranı arasındaki ilişkinin çok yüksek olduğunu görmekteyiz (Pinelo, 2005). Son zamanlarda, solvent miktarını azaltmayı sağlamak için analitik örnek hazırlama işlemlerinde tercih edilmektedir. Katı/solvent oranı bir çok yazarlar tarafından farklı katı numuneler için incelenmiştir. Bizim çalışmamızda haşhaş kapsül tozlarının pozitif etkisinin olduğu görülmektedir (Herodez, 2003; Cacace, 2003). Pahalı olmaması, basit olması, ekstraksiyon kinetiğinin hızlı olması ve ısıya duyarlı bileşiklerin ekstrakte edilebilir olması nedeniyle ultrasonik ekstraksiyonun her yönde avantajlı bir ekstraksiyon tekniği olduğu belirtilmiştir (Wang, 2006).

Maceration ekstraksiyon metodunda morfin verim değeri ultrasonik ekstraksiyon metodu ile kıyaslandığında yüksek verim elde edilmiştir. Fakat bu metotda kullanılan solvent miktarı fazla, ekstraksiyon süresinin uzun olması ve sadece bir numune üzerinde aynı metodun uygulanmasından dolayı az tercih edilmektedir.

Mikrodalga ekstraksiyon metodu kullanılarak morfin ekstraktı, çizelge 4.6'da görüldüğü gibi solvent oranı arttığında önemli derecede morfin ekstraktı azalmaktadır. Bunun nedeni solvent artması ile aşama aşama yoğunluk artmaktadır. Ekstraksiyon süresi 60 dk olduğunda morfin ekstraktı yeterli düzeyde olmaktadır. Mikrodalga ekstraksiyonda en iyi ekstrak koşulu 60 dk'da katı/solvent oranı 500 mg/20 mL bulunmuştur. Papadakis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, bu deney koşulunda en yüksek morfin ekstraktı yapılmıştır. Fakat bu metodun kullanılması mikrodalga mekanizma sıcaklığının artması nedeniyle ekstrak edilen numunenin solvent miktarı çok azalmaktadır. Bu da işlemin uygulanmasını zorlaştıran bir etken olarak ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı kullanılacak solvent ve numune miktarının fazla olması ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır. Mikroalgalar katı numunenin iç basıncını ve ekstraksiyonunu artırır. Bu esnada morfinin mikrodalga ile kolay süzölebildiği görülmüştür (Bayramoğlu et. al., 2008). Yüksek sıcaklar ekstraksiyon süresini etkilemektedir.

Soxhlet ekstraksiyon metodunun morfin ekstrakt veriminin çok az etkili olduğu görülmüştür. Kullanılan 1 g'lık numuneden 0,819 mg morfin ekstraktı elde edilmiştir. Ayrıca analiz sonucunda net görülmektedir (Şekil 4.17). Bu metot da fazla miktarda solvent miktarına ihtiyaç duyulduğu gibi ekstraksiyon süresini de artırmaktadır. Çalışma amacımız, az numune ve solvent kullanarak çevreye zarar vermemektir. Soxhlet ekstraksiyonu ekstraksiyon süresini kısaltma, ekstraksiyon yapan madde hacmini azaltma ve birkaç örneğin eş zamanlı ekstraksiyonuna olanak sağladığı görülmüştür.

De Castro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtildiği gibi, Soxhlet ekstraksiyonunda, uygulanan basıncın artmasıyla, solventin katı örneğe nüfuz etmesi kolaylaşmıştır. Bunun sonucu olarak ekstraksiyon zamanı kısalmış ve solvent hacmi de azalmıştır. Bununla beraber yüksek basınçta çalışmak, deneysel kurulumu zorlaştırmaktadır. Bu cihazların maliyeti çok yüksek ve çok yönlü değildirler. Bundan dolayı, ultrasonik banyo ve mikrodalga kullanımı soxhlet ekstraksiyonuna göre en iyi alternatif olarak görülmüştür (De Castro, 2010).

Manyetik karıştırıcı ile ekstraksiyon metodunda kullanılan numune sayısı fazla olmasına karşın kullanılan katı/solvent miktarı çok fazladır. Ekstraksiyon sonucu geriye kalan küspe miktarının fazla olması çevreye zarar vermesi nedeniyle bizim çalışma amacımızla bağdaşmamaktadır.

Genel olarak katı/solvent oranı az numune kullanıldığında mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyon metodunun her ikisi de morfin ekstraktını artırmaktadır. Mikrodalga'nın gücüne bağlı olarak ekstraksiyon süresi azaltılır. Ultrasonik ekstraksiyon maceration ekstraksiyonu ile kıyaslandığında ekstraksiyon süresinin azaldığını görebiliriz. Genellikle ultrasonik ekstraksiyonda ekstraksiyon süresi bakımından diğer kullanılan metotlara göre daha avantajlı olduğu görülmüştür.

Morfin ekstraktı için ekstraksiyon metotlarında uygun ve uygulanabilir HPLC metodu, Afyon alkaloid fabrikasının kullandığı metod kullanıldı. Morfin ekstraktı için ultrasonik ekstraksiyon optimizasyon analizi yapıldı. HPLC metodunun amacı, hızlı bir şekilde haşhaş kapsülünden morfin ekstraktı içeriğini belirlemeye çalışmaktır.

Çalışmamızda, değişkenlerin bazıları maksimum değerleri alırken, diğerleri minimum değerleri almıştır. Response Surface Methodology kullanılarak dört değişken arasında etkileşimin gücü optimizasyonla yeterli olarak gösterildi. Kuadratik ve 2FI modelleri haşhaş kapsülünden morfin ekstraktı belirlenme çalışması yapılmıştır.

Ultrasonik ekstraksiyon metodunda morfin ekstraktı optimum koşulları katı/solvent oranı 20 mL, pH = 1, ekstraksiyon süresi 60 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 38,75 °C olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda beş farklı ekstraksiyon metodu kullanıldı. Ekstraksiyon işleminin yönetilmesinde çeşitli faktörler vardır. Ekstraksiyonda sıcaklığın; çözünürlük, katıların yayılma gücü, viskozite ve sıvıların yüzey gerilimi gibi önemli olayların üzerine etkisi vardır. Çoğu durumda, sıcaklıktaki bir artış, çözünürlüğü artırır ve moleküllerin yayılma gücünü artırır. Bu da genellikle ekstraksiyonun güçlenmesiyle sonuçlanır. Çalışmada kullandığımız teknikler gibi teknikler arasındaki benzerlik, ekstraksiyon olayının hızını önemli ölçüde artıran, yüksek sıcaklık ve zaman çalışma olasılığıdır. Bunların arasında ultrasonik ekstraksiyonu kullanım açısından pratik bir metot olduğu görülmektedir. Fazla sayıda numuneyle tekrarlanması, kullanılan ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı açısından kullanılabilirliği yüksek bir ekstraksiyon metodu olduğu görülmüştür.

Son yıllarda, çevresel kirleticilerin bir sağlık riski olduğuna dair toplum bilinci artmıştır. Hava, su ve toprak, tortu, gıda gibi katı örneklerde bulunan toksik kirleticilerin tayin edilmesine duyulan ihtiyaç neticesinde çevresel araştırma ve izlemeye olan ilgi artmıştır. Yüksek seçicilikte ayırmalar ve kantitasyon için duyarlı enstrumantasyona rağmen “seyrelt ve enjekte et” yaklaşımı, çevresel tayinlerle bağdaşmamaktadır. Örnek matrikslerinden eser düzeydeki analitlerin zenginleştirilmesi ve izole edilmesi için bir ekstraksiyon basamağı gereklidir. Klasik ekstraksiyon uygulamaları büyük miktarlarda solvent tüketir.

Böylece kendi çevresel ve mesleki tehlikelerini yaratırlar ve genellikle çok düşük seçicilik sağlarlar. Örneğin, farklı matrikslerde yarı-uçucu bileşikleri, katı örnekler için Soxhlet ekstraksiyonu, sulu matriksler için sıvı-sıvı ekstraksiyonu gibi geleneksel yaklaşımlar kullanılarak analiz edildiğinde, toksik kimyasal yönetimi ve imhası gerekmektedir.

Basıncılı sıvı ekstraksiyonu (PFE), katı-faz mikro ekstraksiyon (SPME), mikrodalga-destekli sıvı ekstraksiyonu (MAE), superkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE) gibi yeni teknolojilerin gelişimi solvent kullanımını azaltmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bu yeni teknikleri kullanma talebinde artış olmuştur. Çünkü bu teknikler otomasyona uygun, çok daha hızlı ve çevre dostu teknikler olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Babiker MEH, Abdelkader MAA, Heyam SA, Iqbal A, 2007. Forensic Toxicol 25;62-68.
- Baltussen, E., Cramers, C.A., Sandra, P.J.F.,2002. Sorptive sample preparation – a review, Anal. Bioana. Chem., 373, 3-22.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C., 1999. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, J. Microcolumn Sep., 11, 737–747.
- Barco-Bonilla, N., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Fernández-Moreno, J.S., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., 2011. Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, Anal. Chim. Acta, 693, 62- 71.
- Bayranoğlu B., Şahin S., Sumnu G., 2008. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano, J. Food Eng. 88: 535-540.
- Beejmohun, J., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek,L., Christen,P., Kovensky, J., Fliniaux,M., Mesnard,F., 2007. Microwave-Assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed, Phytochemical Analysis,18: 275-282.
- Cacace J.E., Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries, J. Food Eng. 59, 379-389.
- Carins, D., 2003. Essential of Pharmaceutical Chemistry, 2nd Edn, Pharmaceutical Press, New York, p. 106.
- Çalimli, A., 2003. Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi, BAP Sonuç Raporu, Ankara Üniversitesi.
- 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 (1-2).
- Draper N.R. and John, J.A., 1998. Response-Surface Designs for Quantitative and Qualitative Variables, Technometrics 30, 423-428.
- De Castro, M.D.L., 2010. Priego-Capote, F.: Soxhlet extraction: Past and Present panacea, Journal of Chromatography A., 1217 (16), 2383.

- Dietz, C., Sanz, J., C'ámara C., 2006. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques, J. Chromatogr. A, 1103, 183–192.
- Dieza, J., Dominguez, C., Guillen Rafael Veasa, D.A., Barroso, C.G., 2004. Optimization of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines, J. Chromatografi A., 1025, 263-267.
- Draper N.R. and John, J.A., 1998. Response-Surface Designs for Quantitative and Qualitative Variables. Technometrics 30, 423-428.
- Erdemoğlu, N. 1999. Türkiye’de Yetişen *Taxus Baccata* L. Bitkisinin Taxan Türevi Bileşikleri Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, 92-93.
- Erişim: <http://www.tr.wikipedia.org/soxhlet> [18 Mart 2014].
- Erişim: <http://www.kimyasal.net> [2 Nisan 2014].
- Erte, E., 2007. Siyah üzümde (*Vitis vinifera* L.) bulunan Resveratol’ün Üretim veriminin artırılmasına ses ötesi dalgaların etkisi.Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Facchini, P. J., 2001. Annu. Rev. Plant Physiol, 52, 29-66.
- Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Pierce M.M., Niemann, L., Siekman, D.K., 1990. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using SC-CO₂ J, pp 10.
- Herodez S. Stangler, M. Hadolin, M. Skerget, Z. Knez, 2003. Solvent extraction study from balm leaves, Food Chem. 80, 275-282.
- Hofmann U, Seefried S, Schweizer, Ebner T, Mikus G, Eichelbaum M., 1999. J. Chrom. B., 727: 81-88.
- Halliday, D., Resnick,R., 2001. Fiziğin Temelleri-1 (Çeviren Prof.Dr. Cengiz Yalçın) 3. Basım, 368-369.
- Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Valachovi, P., 1999. Ultrason. Sonochem., 5, 163-168.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., Wang, J., Food Chem. 2009, 114, 1147-1154.
- Jianyong, W., Lidong, L., Footim, C., Ultrason. Sonochem. 2001, 8, 347-352.

- Kaufmann, B., Christen, P., 2002. Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurized Solvent Extraction, *Phytochemical Analysis*, 13, 105-113.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H., 2006. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis, *J. Pharm. and Biomedical Analysis*, 40, 500-508.
- Kellner R., M.M., M.Otto, M.Valcarcel, H.M., 2004. Widmer, *Sample Preparation*, in *Analytical Chemistry: Modern Approach to Analytical Science*, Wiley: Weinheim, p. 506-508.
- Kende, A., Csizmazia, Z., Rikker, T., Angyal, V., Torkos, K., 2006. Combination of stir bar sorptive extraction–retention time locked gas chromatography–mass spectrometry and automated mass spectral deconvolution for pesticide identification in fruits and vegetables, *Microchemical Journal*, 84, 63-69.
- Kılıç, A., 2008. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10 (13): 37-45.
- J. Lawson, Design and analysis of experiments with sas, CRC Press, 2010.
- Lee S., Han E, Kim E,Choi E, Chung H, Oh SM, Yun YM, Jwa S.H., Chung K.H.,2010. *Arch Pharm Res.* 33 (11): 1805-1811.
- Lili, H. Xu, D. Song, Y. Cui, S. Hu, G. Zhang, 2010. Analysis of volatile aldehydebiomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr, A* 1217, 2365-2370.
- Luque-Garcia, J.L., de Castro, M.D.L., 2004. Focused microwave-assisted Soxhlet extraction, devices and applications, *Talanta*, 64(3), 571.
- MacNamaraa, K., Leardi, R., McGuigana, F., 2009. Comprehensive investigation and optimization of the main experimental variables in stir-bar sorptive extraction (SBSE), thermal desorption-capillary gas chromatography (TD-CGC), *Anal. Chim. Acta.*, 636, 190-197.
- Miles J. and M. Shevlin, 2005. *Applying Regression and Correlation: A Guide for Students and Researchers*, Sage Publications Ltd., London.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., 2005. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley&Sons, Inc., New York, NY, USA.

- Nally R.M., 2000. Regression and model-building in conservation biology, biogeography and ecology: The distinction between- and reconciliation of 'predictive' and 'explanatory' models, *Biodivers, Conserv.* 9, 655-671.
- Navarro, p., Etxebarria, N., Arana, G., 2009. *Anal. Chim. Acta*, 648, 178-182.
- Olariu, R-I., Vione, D., Grinberg, N., Arsene, C., 2010. Sample preparation for trace analysis by chromatographic methods, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33, 1174-1207.
- Pan G., J. Qiao, C. Zhu, 2011. Optimization of microwaveassisted extraction technology of flavonoids from solid wastes (hawthorn seed), in *Proceedings of an International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring*, Changsha, Hunan China;19–20Feb. 2011, ed.by Randall Bilof, IEEE Computer Society Conference Publishing Services (CPS) Los Alamitos, California, USA, pp. 541-544.
- Pichini, S., Alteeri, I., Pellegrini, M., Zuccaro, P., Pacifici, R., 1999. *Mass Spectrom. Rev.*, 18, 119-130.
- Pinelo M., P. Del Fabbro, L. Manzocco, M.J. Nunez, M.C., 2005. Nicoli, Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products, *food Chem.* 92, 109-117.
- Pinelo M., M. Rubilar, M. Jerez, J. Sinerio, M.J. Nunez, 2005. Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace, *J. Agric. Food Chem.* 53, 2111-2117.
- Principles of Instrumental Analysis, D.A.Skoog, D.M. West, II. Ed. 1981.
- Proestos, C., Komaitis, M., 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Lebensm Wiss Technol* 41: 652-659.
- Renoe, B.W., 1994. Microwave-Assisted Extraction. *American Laboratory*, 26(12), 34.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. 1996. Accelerated solvent extraction: A technology for sample preparation, *Analytical Chemistry*, 68: 1033-1039.

- Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P., Zakaria, Z., 1997. Ekstraktion of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 791 (1-2), 361.
- Suh J.H., Y.Y. Lee, H.J. Lee, M. Kang, Y. Hur, S. N. Lee, D. H. Yang, S.B. Han, 2013. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 75, 214-219.
- Theuns, H. G., Theuns, H. L., Lousberg, R. J. J. Ch., *Econ. Bot.* 1986, 40, 485-497.
- Ute, W., Naotaka, N., Christian, S., Stefan, J., Meinhart, H. Z., 1986. *Phytochemistry*, 25, 2639-2644.
- G. Vining, S. Kowalski, *Statistical methods for engineers*, third edition, 2010.
- Wang,L., Weller, C.L., 2006. Recent advanced in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.
- Wang S., F. Chen, J. Wu, Z. Wang, X. Liao, X. Hu, 2007. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *J. Food Eng.* 78, 693-700.
- Yalçın, İ., 2004. *Farmasötik Kimya Pratikleri* E.F. (ed.) *Ayırma ve Saflaştırma Yöntemleri*, 17-24.
- Yılmaz, N. 2002. Uludağ'da yetişen *Taxus baccata*'nın (porsuk ağacı) baccatin III açısından kimyasal bileşiminin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi.
- Yoshimatsu, K., Kiuchi, F., Shimomura, K., Makino, Y., 2005. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 1446-1450.
- Zhu C.H., Lu, F.P., Han, Z.L. and Du, L.X., 2007. Statistical optimization of medium components for avilamycin production by *Streptomyces viridochromogenes* Tü57-1 using response surface methodology, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 271-278.

Zuin, V.G., Montero, L., Bauer, C., Popp, P., 2005. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas, *J. Chromatogr. A*, 1091-2-10.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Bahdişen GEZER
Doğum Yeri ve Yılı : Nevşehir, 1968
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E – posta : bahdisen.gezer@usak.edu.tr



Eğitim Durumu

Lise : H.Ü.Sağlık Koleji
Lisans : Ege Üniv. Fen Fakültesi, Fizik Bölümü
Yüksek Lisans : AKÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü

Mesleki Deneyim

HÜ Hastanesi	1987 – 1988
Özel Sektör	1989 - 1992
Ege Üniv. Radyoloji	1992 – 1995
Afyon Kocatepe Üniv.	1995 – 2006
Uşak Üniv.	2006 – (halen)

Yayınları

- Gezer, B., 2009. Teknolojinin Bilimsel İlkeleri, Bölüm yazarlığı, Lisans Yayıncılık, 2009.
- Dikmen, S., Aslanbay, H., Gezer, B., 2011. K₂NiO₄-type materials new cathode materials for solid oxide fuel cells-Energy Challenges for Advanced Materials and Processes Conference, 25 -29 May 2011, Nevşehir.
- Gezer, B., 2012. Katı Oksit Yakıt Pillerinde (Ba_{0,5}Sr_{0,5})_{1-x}Sm_xCo_{0,8}Fe_{0,2}O_{3-d}'nin Katot Olarak incelenmesi (Sunum) - I.Ulusal Geri Kazanım Kongre ve Sergisi 2-4 Mayıs 2012, Uşak.
- Bulduk, İ., Gezer, B., Cengiz, M., 2013. Optimized of Ultrasonid-Assisted Extraction Morphine in poppy capsules by Box-Behnken Design Method – Workshop on Plant Products Chemistry & International Symposium on Medicinal – Aromatic Plants 4-7 June, 2013, İzmir.
- Gezer, B., Cengiz, M., Bulduk, İ., 2013. Optimized of Ultrasonid-Assisted Extraction Codeine in poppy capsules by Box-Behnken Design Method – Workshop on Plant Products Chemistry & International Symposium on Medicinal – Aromatic Plants 4-7 June, 2013, İzmir.
- Bulduk, İ., Gezer, B., Cengiz, M., 2014. Optimized of Ultrasonid-Assisted Extraction Morphine from Capsules of *Papaver somniferum* by Response Surface Methodology, Hindawi Publishing Corporation International Journal of Analytical Chemistry Volume 2014, Article ID 796349, 8 pages.
- Bulduk, İ., Gezer, B., Cengiz, M., 2014. Haşhaş Kapsülünden Noskapin Ekstraksiyonunun Response Surface Metadolojisi Kullanarak Optimizasyonu, 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi-Sözlü Sunum, 1-5 Eylül 2014, Kahramanmaraş.
- Bulduk, İ., Gezer, B., Cengiz, M., 2014. Ulusal Kromatografi Kongresi – Kromatografi 2014, Response surface metadolojisi ile haşhaş Kapsülünden Ultrasonik Destekli Tebain Ekstraksiyonu, Ege üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı 12-15 Mayıs 2014, İzmir.