ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Olea europaea L. BİTKİ YAPRAKLARINDAN SEKOİRİDOİD YAPIDAKİ POLİFENOLLERİN EKSTRAKSİYONU VE ANALİZİ İÇİN YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Nilüfer VURAL

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2017

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Nilüfer VURAL tarafından hazırlanan "***Olea europaea L.* Bitki Yapraklarından Sekoiridoid Yapıdaki Polifenollerin Ekstraksiyonu ve Analizi İçin Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi** "adlı tez çalışması 25/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. M. Abdülkadir AKAY
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Ayla ALTINTEN
Gazi Üniversitesi Mühendislik Fak. Kimya Müh. Bölümü

Üye : Prof. Dr. Adnan KENAR
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ertan ANLI
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. M. Abdülkadir AKAY
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN
Gazi Üniversitesi Fen Fak. Kimya Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. DrAtilla YETİŞEMEYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

25/01/2017



Nilüfer VURAL

ÖZET

Doktora Tezi

Olea europaea L. BİTKİ YAPRAKLARINDAN SEKOİRİDOİD YAPIDAKİ POLİFENOLLERİN EKSTRAKSİYONU VE ANALİZİ İÇİN YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Nilüfer VURAL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Abdülkadir AKAY

Bu çalışmada *Olea europaea L.* yaprağı gibi güçlü antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antihipertansif, antiflamatuar, antihipoglisemik vb. özellik gösteren değerli bir kaynaktan, sekoiridoid yapıdaki polifenollerin ekstraksiyonu ve analizi için, kemometrik yaklaşımla optimum şartları belirlenmiş, yöntemler geliştirilmiş ve önerilmiştir.

Zeytin yaprağından sekoiridoid yapıların ekstraksiyonu için, çözücü ekstraksiyonu ve ses ötesi prob ekstraksiyonu yöntemleri çalışılmış, bu yöntemlerde MeOH/H_2O ve EtOH/H_2O çözücü sistemleri kullanılmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarının deneysel tasarımı için Cevap Yüzey Yöntemlerinden, CCD ve D-optimal tasarım kullanılmış, çözücü ekstraksiyonunda çözücü oranı, sıcaklık, süre, çözücü/katı oranı, ses ötesi prob ekstraksiyonunda; genlik, SÖD uyg. süresi, çözücü oranı, prob pozisyonu, görev döngüsü bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin, Toplam Fenol (GAE ve OLE) ve oleuropein miktarına (HPLC) amaç fonksiyonları üzerindeki etkileri araştırılmış, önemli model parametreleri belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmasında sistemi karakterize eden tüm yanıt fonksiyonları birlikte ele alınmış, çok yanıtlı optimizasyon, çok amaçlı optimizasyon problemlerinin çözümlerini karakterize eden pareto bölgeler yardımı ile çözülmüş ve optimal girdi değişken değerleri istenebilirlik (desirability) fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenmiştir. Geliştirilen çözücü ekstraksiyonu ve ses ötesi prob ekstraksiyonu yöntemleri arasında, EtOH/H_2O çözücü sistemi ekstraksiyonunun optimum koşullarında, en iyi cevap fonksiyonu değerleri elde edilmiştir.

Zeytin yaprağından flavanoid ve basit fenolik maddelerin varlığında, sekoiridoid yapıların kromatografik ayırımı için, ters-faz sıvı kromatografi sistemi ile gradient elüsyonda yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntemde, optimizasyon metodolojisi ve kromatografik kalite değerlendirmesine temel olarak yeni kromatografik cevap fonksiyonu (NCRF) kullanılmıştır. Kullanılan NCRF'nin, asimetrik ve üst üste binmiş

pikler ile bilinmeyen çözeltilerin karışımlarına uygulanabilir olduğu ve ters faz kromatografide dağılma (partitisyon) kromatografisine uygun olarak, işlevsel olduğu gösterilmiştir. Doğrusal çözücü gücü modeli (LSSM) ve alıkonma modeli alıkonma zamanının ve gradient adımlarının belirlenmesinde NCRF ile birlikte kullanılmıştır. Ters faz düşük basınç sıvı kromatografisi gradient elüsyonu ile yapılan yöntem geliştirme çalışmaları için, çok amaçlı optimizasyona dayanan cevap yüzey yöntemleri ile Levenberg-Marquardt algoritması kullanılmıştır. Optimizasyon prosesinin temel adımları ve kullanılan algoritmalar için yeni başlatma parametreleri (t_R, $\Delta\varphi$ ve θ) sunulmuştur. LSSM modeli doğrusallaştırılarak, k ifadesini veren denklemler, t_R ve $\Delta\varphi$ değerlerine göre tanımlanmıştır.

Ocak 2017, 378 sayfa

Anahtar Kelimeler: Zeytin yaprağı, Sekoiridoidler, Oleuropein, Çözücü ekstraksiyonu, Ses ötesi dalga ekstraksiyonu, Ultrasonik prob, HPLC, Doğrusal çözücü gücü modeli, Yeni Kromatografik Cevap Faktörü, Optimizasyon, Modelleme, Kemometri

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DEVELOPMENT OF A NEW METHODOLOGY FOR THE EXTRACTION AND ANALYSIS OF SECOIRIDOID STRUCTURED POLYPHENOLS FROM *Olea europaea* L. LEAVES

Nilüfer VURAL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. M. Abdülkadir AKAY

In this study, the optimum conditions were determined by chemometric approach and new methods are developed and proposed for the extraction and analysis of secoiridoid polyphenols from a valuable source like *Olea europaea* L. which has strong antioxidant, antibacterial, antifungal, antihypertensive, anti-inflammatory, anti-hypoglycemic properties.

For the extraction of secoiridoid structures from the olive leave, solvent extraction and ultrasonic probe extraction methods were studied, and MeOH/H_2O and EtOH/H_2O solvent systems were used in these methods. In the experimental design of extraction studies, among the Response Surface Methodology, CCD and D-optimal design were selected, and the percentage of solvent, temperature, time, solvent/solid ratio in the solvent extraction, the amplitude, irridation time, the percentage of solvent, probe position and duty cycle in the ultrasonic probe extraction were studied as independent variables. The effect of these independent variables on the total phenolic content(GA and OLE) and oleuropein content (HPLC analysis) were studied leaf target functions were investigated and important model parameters were determined. In the optimization study, all the response functions characterizing the system were obtained together while solving the multi-response optimization with the help of pareto regions which characterize the solutions of the multi-purpose optimization problems, and optimal input variable values were determined with the desirability function approach. Among the developed solvent extraction and ultrasonic probe extraction methods, the best response function values were obtained from EtOH/H_2O solvent system extraction under the optimum conditions.

A new method for the chromatographic separation of secoiridoid structures from the olive leaf in the presence of flavanoid and simple phenolic substances was developed by reverse phase chromatography system and gradient elusion. In this method, the optimization and chromatographic quality evaluation, a new chromatography response function (NCRF) is used basically to be based on. It has been shown that NCRF is applicable to clear the asymmetric and overlaid peaks and the mixture of unknown solutions, and it has also been shown that NCRF is functional in accordance with reversed phase chromatography partition methodology. Linear solvent strength model (LSSM) and retention model were used together with NCRF in the determination of retention time and gradient steps. The Levenberg-Marquardt algorithm was used with response surface methods based on multi-objective optimization for the developing studies of the method with gradient elution in reversed phase low pressure liquid chromatography. The new initialization parameters (t_R, $\Delta\varphi$ ve θ) were presented for the basic steps of the optimization process and the algorithms used. The equations expressing the k statement was defined according to the values of t_R and $\Delta\varphi$ by the linearization of LSSM model.

January 2017, 378 pages

Key Words: Olive leaf, Secoiridoids, Oleuropein, Solvent extraction, Ultrasonic assisted extraction, Ultrasonic probe, HPLC, Linear solvent strength model, New Chromatographic Response factor, Modeling, Chemometry

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her an yardımını ve desteğini hissettiğim, kendisi ile çalışma fırsatı bulmaktan büyük mutluluk duyduğum danışman hocam Prof.Dr. M. Abdülkadir AKAY (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı)'a, öneri ve katkıları ile kemometri alanında ufkumu açan hocam Prof. Dr. Adnan KENAR (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı)'a, yıllardır arkadaşım, abim olan, her zaman desteğini gördüğüm, keyifli çalışmalara imza attığımız hocam Prof. Dr. Ertan ANLI (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı)'ya, doktora eğitimime başlamam konusunda Prof. Dr. Ertan ANLI ile birlikte beni yüreklendiren ve vesile olan hocam Prof. Dr. Orhan ATAKOL (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı)'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Bana tez çalışmam için laboratuvarının kapılarını açan ve çalışma desteği veren hocam, Prof. Dr. Afife GÜVENÇ (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı)'e teşekkür ederim.

Bu uzun yolculukta her zaman yanımda hissettiğim can dostum Yrd. Doç. Dr. Suna ERTUNÇ (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı)'a, Proses Kontrol Grubunun değerli hocaları Prof. Dr. Mustafa ALPBAZ ve Prof. Dr. Hale HAPOĞLU (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı)'na manevi desteklerini esirgemedikleri için müteşekkirim. Kimya Mühendisliği Bölümü'nü benim için çok değerli bir yer haline getiren, tüm hocalarıma ve çok değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, gönülden teşekkür etmek isterim. Benim gönlümde ayrı bir yere sahipler.

Her zaman ailem oldukları için gurur ve mutluluk duyduğum, beni duyduğundan emin olduğum babam Rıdvan CANLI'ya, annem Hatice CANLI'ya, sevgili kardeşlerim Ahmet ve Nilgün'e destekleri için teşekkür ederim. Değerli eşim Dr. Kim. Müh. İ.Halil VURAL, sevgili kızlarım İpek Tuğçe ve Buse VURAL iyi ki varsınız, siz olmasanız başaramazdım.

Nilüfer VURAL
Ankara, Ocak 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK..... i
ÖZET..... ii
ABSTRACT..... iv
TEŞEKKÜR.....
KISALTMALAR DİZİNİ..... xi
ŞEKİLLER DİZİNİ..... xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ..... xxvi
KROMATOGRAMLAR DİZİNİ..... xxxi
1. GİRİŞ..... 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI..... 4
2.1 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarının Kimyasal Bileşimi..... 4
2.1.1 Oleuropeositler..... 6
2.1.2 Flavon ve flavanoller..... 11
2.1.3 Diğer bileşenler..... 13
2.2 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarının Sağlık Açısından Önemi..... 16
2.3 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarının Farmakolojik Etkileri..... 18
2.3.1 Antihipertansif etki..... 18
2.3.2 Antihiperglisemik etki..... 19
2.3.3 Antioksidan etki..... 20
2.3.4 Antimikrobiyal etki..... 24
2.3.5 Antitümör ve antikanser etki..... 27
2.3.6 Antienflamatuar etki..... 30
2.3.7 Enzimler üzerine etki..... 30
2.3.8 Hormonlar üzerine etki..... 31
2.3.9 Kalp ve kalp-damar sistemi üzerine etkisi..... 31
2.3.10 Diğer etkiler..... 34
2.4 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarından Polifenollerin Ekstraksiyonu..... 35
2.4.1 Çözücü ekstraksiyonu..... 36
2.4.2 Ses ötesi dalga (Ultrasound) destekli ekstraksiyon..... 41
2.4.3 Süperkritik akış (SFE) ekstraksiyonu..... 43
2.4.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon..... 44
2.5 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarından Polifenollerin Analizi..... 45
2.6 Genel Kemometrik Uygulamalar..... 49
2.7 Sıvı Kromatografide Metod Geliştirme ve Optimizasyon..... 50
2.8 Metod Geliştirmede Ayırma Gücü (R) Yerine, Yeni Kromatografik Cevap Faktörü (CRF) Uygulamaları..... 54
2.9 Metod Geliştirmede Alıkonma Modeli Uygulamaları..... 56
3. KURAMSAL TEMELLER..... 60
3.1 *Olea Europaea* L. Bitkisinin Özellikleri ve Polifenolik Yapıları..... 60

3.1.1 *Olea Europaea* L. bitkisinde mevcut polifenolik yapılardan iridoitler ve özellikleri..... 65
3.1.2 *Olea Europaea* L. bitkisinde mevcut polifenolik yapılardan flavanoidler ve özellikleri..... 70
3.2 *Olea Europaea* L. Bitkisinden Polifenolik Yapıların Ekstraksiyonu..... 74
3.2.1 Çözücü ekstraksiyonu..... 77
3.2.2 Ses ötesi dalga ekstraksiyonu..... 81
3.3 Deney Tasarımları..... 85
3.4 Cevap Yüzey Modelleri..... 91
3.4.1 Cevap yüzey problemleri..... 95
3.4.1.1 Cevap yüzeyleri..... 95
3.4.1.2 Cevap yüzeyleri için ikinci derece model kavramı..... 98
3.4.1.3 İkinci derece modelleme için bazı deneysel tasarımlar..... 99
3.4.2 Çok cevaplı yüzey probleminin modellenmesi..... 101
3.4.3 Çok cevaplı yüzey problemlerinin optimizasyonu..... 103
3.4.4 Çok amaçlı optimizasyon..... 109
3.4.4.1 Çok amaçlı optimizasyon problemi..... 110
3.5 Öğrenme Algoritmaları..... 116
3.6 Ters Faz Sıvı Kromatografi'de Temel İfadeler ve Optimizasyon Parametreleri..... 118
3.6.1 Ters faz sıvı kromatografide temel ifadeler..... 118
3.6.2 Ters faz sıvı kromatografisi..... 124
3.7 Sıvı Kromatografide İzokratik ve Gradient Elüsyonda Alıkonma Modeli Teorisi..... 127
3.7.1 Alıkonma mekanizması için temel modeller..... 129
3.7.2 Tek-Mod Gradient Elusyonda Tahmin (Prediction)..... 133
3.7.3 1D veya 2D Kromatografik Verilerin Direkt Uygunlanması..... 134
3.7.4 Gradiet Elüsyonun Temel Alıkonma Modeli Denklemleri ile Çözümü..... 135
3.7.5 Doğrusal Çözücü Gücü Modeli (Linear Solvent Strength Model)..... 136
4. MATERYAL VE YÖNTEM..... 140
4.1 Materyal..... 140
4.2 Kullanılan Cihaz, Yazılım ve Kimyasallar..... 140
4.3 *Olea Europaea* L. Yapraklarından Polifenollerin Ekstraksiyonu için Kullanılan Yöntemler ve Koşulları..... 142
4.3.1 MeOH/H_2O ekstraksiyonu..... 142
4.3.2 EtOH/H_2O ekstraksiyonu..... 143
4.3.3 MeOH/H_2O, EtOH/H_2O çözücü karışımlarında ultrasonik banyo ile ekstraksiyon..... 144
4.3.4 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile ekstraksiyon..... 144
4.3.5 EtOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile ekstraksiyon..... 146
4.4 *Olea Europaea* L Yapraklarından Polifenollerin Analiz Yöntemleri..... 147
4.4.1 *Olea Europaea L.* yaprak ekstrelerinde FCR yöntemi ile toplam fenol tayini..... 147
4.4.1.1 Gallik asit kalibrasyon grafiğinin hazırlanması..... 148

4.4.1.2 Oleuropein kalibrasyon grafiğinin hazırlanması..... 149
4.4.2 *Olea Europaea* L. yaprak ekstraktlarında DPPH yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini..... 149
4.4.3 *Olea Europaea* L. yaprak ekstraktlarında polifenollerin tayini için kullanılan HPLC yöntemleri..... 151
4.4.3.1 HPLC Cihazı..... 151
4.4.3.2 Avrupa Farmakope 5.0 yöntemine göre polifenollere ait kalibrasyon standartlarının hazırlanması..... 152
4.4.3.3 Yeni geliştirilen HPLC yöntemine göre polifenollere ait kalibrasyon standartlarının hazırlanması ve kalibrasyon setinin tasarımı..... 153
4.4.3.4 Avrupa Farmakope 5.0 HPLC yönteminin kromatografik çalışma koşulları..... 154
4.4.3.5 Yeni geliştirilen (alternatif yöntem) HPLC yönteminin kromatografik çalışma koşulları..... 155
5. ARAŞTIRMA BULGULARI I..... 156
5.1 MeOH/H_2O Çözücü Ekstraksiyonu için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması..... 156
5.1.1 Cevap Faktörü 1: Toplam Fenol miktarı (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 159
5.1.2 Cevap Faktörü 2: Toplam Fenol miktarı (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 167
5.1.3 Cevap Faktörü 3: Oleuropein miktarı (HPLC) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 172
5.1.4 MeOH/H_2O çözücü ekstraksiyonu için optimizasyon çalışması..... 178
5.1.5 MeOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi..... 183
5.2 MeOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Prob Ekstraksiyonunda Üç Amaçlı Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması..... 187
5.2.1 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonunda üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım..... 189
5.2.1.1 Cevap Faktörü 1:Toplam fenol miktarı (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 190
5.2.1.2 Cevap Faktörü 2:Toplam fenol miktarı (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 198
5.2.1.3 Cevap Faktörü 3: Oleuropein miktarı (HPLC) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 206
5.2.1.4 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonda üç amaç fonksiyonlu optimizasyon çalışması..... 215
5.3 MeOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Prob Ekstraksiyonunda Toplam AntioksidanAktivite Cevap Faktörü için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması..... 217
5.4 EtOH/H_2O Çözücü Ekstraksiyonu için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması..... 228
5.4.1 Cevap Faktörü 1:Toplam fenol miktarı (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 231

5.4.2 Cevap Faktörü 2:Toplam fenol miktarı (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 237
5.4.3 Cevap Faktörü 3: Oleuropein miktarı (HPLC) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 243
5.4.4 EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonu için optimizasyon çalışması..... 250
5.4.5 EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi..... 251
5.5 EtOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Prob Ekstraksiyonunda Üç Amaçlı Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması..... 254
5.5.1 EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonunda üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım..... 256
5.5.1.1 Cevap Faktörü 1:Toplam Fenol miktarı (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 257
5.5.1.2 Cevap Faktörü 2:Toplam Fenol miktarı (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 264
5.5.1.3 Cevap Faktörü 3: Oleuropein miktarı (HPLC) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları..... 273
5.5.1.4 EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonda üç amaç fonksiyonlu optimizasyon çalışması..... 280
5.6 EtOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Probe Ekstraksiyonunda Toplam Antioksidan Aktivite Cevap Faktörü için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması..... 282
6. ARAŞTIRMA BULGULARI II..... 293
6.1 İzokratik Yöntem Optimizasyonu..... 296
6.1.1 İzokratik elüsyon yöntemi için ön optimizasyon çalışması..... 296
6.1.1.1 Cevap Faktörü 1: NCRF1 deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları (ön optimizasyon)..... 302
6.1.1.2 Cevap Faktörü 2: DCRF deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları (ön optimizasyon)..... 306
6.1.2 İzokratik elüsyon yöntemi için ara optimizasyon çalışması..... 312
6.1.2.1 Cevap Faktörü 1: NCRF1 deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları (ara optimizasyon)..... 315
6.1.2.2 Cevap Faktörü 2: DCRF deneysel tasarım sonuçları (ara optimizasyon)..... 319
6.2 Gradient Elüsyon Yönteminde Doğrusal Çözücü Gücü Modeli (*Linear Solvent Strenght Model-LSSM*) ve Alıkonma Modeli ile Metod Geliştirme Basamakları ve Optimizasyon Sonuçları..... 324
7. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 344
KAYNAKLAR..... 350
EKLER..... 369
EK 1 MeOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (GAE), toplam fenol (OLE), oleuropein miktarı (HPLC), toplam antioksidan aktivite cevap faktörleri için, t testi sonuçları..... 370

EK 2 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (GAE), toplam fenol (OLE), oleuropein miktarı (HPLC), toplam antioksidan aktivite cevap faktörleri için, t testi sonuçları..... 373

ÖZGEÇMİŞ..... 376

KISALTMALAR DİZİNİ

ANFIS	Adaptive Neuro Fuzzy Inference System
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
C18	Karbon18 (Oktadesil silika dolgu maddesi)
CRF	Kromatografik Cevap Fonksiyonu
CYY	Cevap Yüzey Yöntemi
3,4-DHPEA-EDA	Oleacein
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür
DPPH	2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl
DUSAE	Dinamik Ses Ötesi Dalga Destekli Ekstraksiyon
EC_{50}	Maksimum Etkinin %50'sini Oluşturan İlaç Konsantrasyonu
ESI-IT-MS^2	Elektrospray İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle-Kütle Spektrometresi
ESI-TOF-MS	Elektrospray İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
FA	Frontal Analiz
GA	Genetik Algoritma
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GC	Gaz Kromatografi
GC-MS	Gaz Kromatografi Kütle Spektrometrisi
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
HHPP	Yüksek Hidrostatik Basınç Prosesi
HPAEC-PAD	High Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection
HPLC	High Performance Liquit Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HPLC-DAD	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Array Dedektör
HPLC/DAD/MS-MS-ESI	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Diyot Array Dedektör-Kütle-Kütle-Elektrospray Iyonizasyon Sistemi

IC_{50}	The half maximal inhibitory concentration: In vitro testlerde %50 inhibisyon yaratan inhibitör konsantrasyonu
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
LC_{50}	Medium lethal concentration: Bir bileşiğin, test edilen popülasyon üyelerinin % 50'sini öldüren konsantrasyonu
LDA	Lineer Diskriminant Analizi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LOD	Limit of Detection, Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Limit of Quantitation, Belirlenebilirlik sınırı
LPLC	Düşük Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LSSM	Doğrusal Çözücü Gücü Modeli
MAE	Mikrodalga Ekstraksiyonu
MDA	Malondialdehit
MSD-API	Magnetik Sektör Dedeksiyon-Atmosferik Basınç İyonizasyon
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
OLE	Oleuropein
PCA	Temel Bileşen Analizi
PLE	Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu
PLS	Kısmi En Küçük Kareler Modeli
RP-DLLME	Ters Faz Dispersive Sıvı-Sıvı Mikro Ekstraksiyon
RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RR RP-HPLC	Hızlı Çözünürlük Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SFE-CO_2	Süper Kritik Karbondioksit Akış Ekstraksiyonu
SIMCA	Yumuşak Bağımsız Sınıf Benzetim Modelleme
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddesi
THF	Tetrahidrofuran
UAE	Ses Ötesi Dalga Destekli Ekstraksiyon
UMAE	Ses Ötesi Dalga Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 HIV-1 füzyon proteini gp41 için kullanılan zeytin yaprağı ekstraktı ile bağlanmalarını gösterir SEM görüntüsü……....26
Şekil 2.2 Oleuropeinin nöro-koruyucu rolünün şematik gösterimi ……...……..… 35
Şekil 3.1 Zeytin üretiminin yayılışı ……..……...……...61
Şekil 3.2 Türkiye'de yoğunluğuna göre zeytin dikili alanlar ……...……....61
Şekil 3.3 *Olea europaea* bitkisi yaprak, çiçek ve meyve görüntüleri…….…63
Şekil 3.4 Fenolik bileşenlerin oluşumunda izlenen metabolik yol izleri ……..……64
Şekil 3.5 İridoit ve sekoiridoit iskeletleri……66
Şekil 3.6 *Oleaceae* yapısında bulunan oleoropein için önerilen biyosentetik yolağı……...69
Şekil 3.7 Fenilalaninden, fenilpropanoid sentezi ile fenolik maddelerin sentezi ….....70
Şekil 3.8 Flavanoid sınıfları (Flavanol, flavanon, flavon ve hidroksisinamik asitler) için önerilen yolağları…….....71
Şekil 3.9 Flavanoidlerin kimyasal yapısı……72
Şekil.3.10 *Olea europaea L*. yapraklarının stoma ve trichomes SEM görüntüleri…….76
Şekil 3.11 Bitki hücre dokusunun şematik gösterimi……..78
Şekil 3.12 Ses ötesi dalga etkisinde kavitasyon kabarcıklarının oluşumu…….82
Şekil 3.13 Bir sistem yada sürecin genel modeli ……87
Şekil 3.14 Bilimsel çalışmalarda istatistiksel girdi düzeyi ……88
Şekil 3.15 Klasik metodoloji ile yapılan deney tasarımı ve ölçümü akış şeması……89
Şekil 3.16 a Merkezi bileşik tasarım (k=3), b. Merkezi bileşik tasarım ögeleri……...100
Şekil 3.17 a Maksimum nokta için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri, b Minimum nokta için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri, c Eyer noktası için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri…….……108
Şekil 3.18 İki değişkenli optimizasyonun kuadratik modelleri için üretilmiş bazı cevap yüzey profilleri (a. maksimum, b. plato, c. maksimum nokta deneysel bölgenin dışında, d .minimum, e. eyer noktası) ……..... 109
Şekil 3.19 a. Karar uzayı, b. amaç uzayı arasındaki ilişki ……111
Şekil 3.20 İki amaç fonksiyonu için olabilecek dört farklı durumda elde edilen pareto çözüm kümeleri……...113
Şekil 3.21 $\min\{f_1, f_2\}$ problemi için ideal, ütopik (Z^{**}) ve nadir (Z^{nad}) amaç vektörleri ……...……..114
Şekil 3.22 HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogram ……..118
Şekil 3.23 Pik genişliği ……...…. 120
Şekil 3.24 Ayırma gücünün piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi (σ: sabit)……..122
Şekil 3.25 Seçiciliğin ayırma gücü üzerine etkisi……..123
Şekil 3.26 Alıkonma faktörünün ayırma gücü üzerine etkisi……123
Şekil 3.27 HPLC'de metod geliştirmek için klasik strateji……..124

Şekil 3.28 Ters faz - İyon Değişimi Özelliği Gösteren Karma Mod Kolonların Sabit Fazlarının Yapıları……127
Şekil 3.29 Tek modlu doğrusal gradient elüsyon altında çözünür numunenin, alıkonma zamanının çeşitli yaklaşımlar kullanılarak tahminlenmesi…… 134
Şekil 4.1 Çözücü ekstraksiyonunda ses ötesi dalga uygulaması için kullanılan ultrasonik banyo ……..144
Şekil 4.2 Ultrasonik prob ekstraksiyon sistemi a. şematik gösterimi , b. resim gösterimi……...146
Şekil 4.3 FCR ile toplam fenol analizinde gallik asit standardı için kalibrasyon grafiği……148
Şekil 4.4 FCR ile toplam fenol analizinde oleuropein standardı için kalibrasyon grafiği……149
Şekil 4.5 Oleuropein için DPPH metoduna ait inkübasyon zamanının belirlenmesine ait grafik……..……..150
Şekil 5.1 Toplam Fenol miktarı (GAE) maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği……...162
Şekil 5.2 Box-Cox grafiği……..162
Şekil 5.3 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması ……..…….. 163
Şekil 5.4 Sıcaklık-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}=f(x)=$ +15,54+ 1,82A +1,86B +0,046AB +0,070A^2+0,11B^2 ……....164
Şekil 5.5 MeOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}=f(x)=$ +15.54+1.82A+2.60C +0.31AC +0.070A^2 -1.34C^2 .……164
Şekil 5.6 MeOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}=f(x)=$+15.54+1.82A +4.24D +0.76AD +0.070A^2 -0.56D^2 ….....164
Şekil 5.7 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}=f(x)=$ +15.54 +1.86B+2.60C +0.38BC +0.11B^2-1.34C^2 ……165
Şekil 5.8 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}=f(x)$=+15.54 +1.86B +4.24D +0.34BD +0.11B^2 -0.56D^2.....165
Şekil 5.9 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}=f(x)=$ +15,54 +2,60C +4,24D +1,48CD-1,34C^2-0,56D^2 ……165
Şekil 5.10 Toplam Fenol miktarı (OLE eşd.) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği……..……..….....169
Şekil 5.11 Box-Cox grafiği……169

Şekil 5.12 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması…… 169
Şekil 5.13 Sıcaklık-MeOH modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}=f(x)=7,46+ 0,91A+ 0,93B+ 0,025AB +0,035A^2+0,055B^2$……170
Şekil 5.14 MeOH-süre modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}=f(x)= 7,46+0,91A + 1,30 C+0,15AC+0,035A^2-0,67C^2$……...…….....170
Şekil 5.15 MeOH-çözücü/katı oranı modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}=f(x)=7,46+0,91A+1,95D +0,38AD +0,035A^2-0,28D^2$ ……...…..170
Şekil 5.16 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein} = f(x)=+7,46 +0,93B+1,30C +0,19BC +0,055B^2-0,67C^2$ ……..171
Şekil 5.17 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)=+7.46 +0.93B +1.95D +0.17BD +0.055B^2 -0.28D^2$ 171
Şekil 5.18 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole} =f(x)=+7,46 +1,30 C +1,95D +0,74CD -0,67C^2- 0,28D^2$ 171
Şekil 5.19 Oleuropein (HPLC) maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği……175
Şekil 5.20 Box-Cox grafiği……175
Şekil 5.21 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...175
Şekil 5.22 Sıcaklık-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{Oleuropein}=f(x)= +2,94 + 0,95A +0,15B -0,12 AB +0,043A^2 – 6,829\ 10^{-3}B^2$ ……..176
Şekil 5.23 MeOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}=f(x)=+2.94 + 0,95A+0,72C +0,31AC +0,043A^2– 0,047C^2$ ……...176
Şekil 5.24 MeOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç bo yutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole}= f(x)=+2,94 + 0,95 A +0.40 D +0,22 AD +0,043 A^2 +0,20 D^2$ ……176
Şekil 5.25 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole}=f(x)=+2.94 +0,15 B +0,72C + 0,13BC– 6,829\ 10^{-3}B^2 –0,047C^2$……..177
Şekil 5.26 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein} =f(x)= +2.94 +0,15B+0.40D-0,032BD–6,82910^{-3}B^2+0,20D^2$….177

Şekil 5.27 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein} = f(x) = +7.46 + 1.30C + 1.95\,D + 0.74CD - 0.67C^2 - 0.28D^2$ 177
Şekil 5.28 MeOH optimizasyonu için en dik çıkış yöntemi ile deneysel adımların yönünün belirlenmesi.....180
Şekil 5.29 Toplam Fenol miktarı (GAE) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği.....192
Şekil 5.30 Box-Cox grafiği.....192
Şekil 5.31 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması.....193
Şekil 5.32 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 1.33A + 0.62\,B + 0.89AB - 0.52A^2 - 0.027B^2$ 193
Şekil 5.33 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 1.33A + 1.03C - 0.54AC - 0.52A^2 + 1.70C^2$ 194
Şekil 5.34 Genlik-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 1.33A - 0.16D - 1.21AD - 0.52A^2 + 2.66D^2$ 194
Şekil 5.35 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 1.33\,A + 0.64E + 1.23AE - 0.52A^2 - 2.97\,E^2$ 194
Şekil 5.36 SÖD uygulama süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 0.62B + 1.03\,C + 0.67B\,C - 0.027B^2 + 1.70\,C^2$ 195
Şekil 5.37 SÖD uygulama süresi-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 0.62B - 0.16\,D + 0.53B\,D - 0.027\,B^2 + 2.66D^2$ 195
Şekil 5.38 SÖD uygulama süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 0.62\,B + 0.64\,E + 0.40\,B\,E - 0.027\,B^2 - 2.97\,E^2$ 195
Şekil 5.39 MeOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 0.62\,B + 0.64\,E + 0.40\,B\,E - 0.027\,B^2 - 2.97E^2$ 196
Şekil 5.40 MeOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +2.94 + 0.62B + 0.64E + 0.40\,B\,E - 0.027B^2 - 2.97\,E^2$ 196

Şekil 5.41 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/G\ A}=f(x)= +2.94 -0.16\ D+0.64\ E+0.5D\ E +2.66\ D^2-2.97E^2$……196
Şekil 5.42 Toplam Fenol (OLE eşd) miktarı maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği……200
Şekil 5.43 Box-Cox grafiği……201
Şekil 5.44 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...201
Şekil 5.45 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/ole}$ $= +1.18+0.59A+ 0.36\ B+0.40AB-0.19\ A^2-0.023B^2$ ……..202
Şekil 5.46 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropeint}$ = $f(x)= +1.18+0.59\ A+0.44C -0.24\ AC -0.19\ A^2+0.69\ C^2$ ……..... 202
Şekil 5.47 Genlik-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}$= $f(x)= +1.18+0.59\ A-0.056D -0.52AD -0.19\ A^2+1.22\ D^2$……202
Şekil 5.48 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/ole}=f(x)=+1.18+0.59\ A +0.34\ E +0.57AE -0.19\ A^2 -1.27\ E^2$…….203
Şekil 5.49 SÖD uyg. süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/ole}$ $=f(x)= +1.18+0.36\ B +0.44\ C +0.30BC -0.023B^2 +0.69C^2$ …. …….....203
Şekil 5.50 SÖD uyg. süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}=f(x)=+1.18+0.36\ B -0.056\ D+0.24\ B\ D-0.023\ B^2$ $+1.22D^2$……...203
Şekil 5.51 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}=f(x)=+1.18+0.36\ B +0.34E +0.22B\ E -0.023$ $B^2 -1.27E^2$.....204
Şekil 5.52 MeOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)$ $= +1.18+0.44C-0.056\ D -0.32CD+0.69\ C^2+1.22\ D^2$…….....…204
Şekil 5.53 MeOH- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}=f(x)=+1.18 +0.44\ C +0.34E -0.11CE +0.69C^2$ $-1.27\ E^2$……...204
Şekil 5.54 Prob pozisyonu- görev döngüsü iki faktörlü modeli için,kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x=+1.18-0.056D+0.34\ E+0.22D\ E +1.22D^2-1.27E^2$……..…205

Şekil 5.55 Oleuropein (HPLC) miktarı maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği……209
Şekil 5.56 Box-Cox grafiği……209
Şekil 5.57 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...209
Şekil 5.58 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{ole/HPLC}$= + 0.54 +0.38 A+0.25B +0.27 AB-0.014 A^2-2.345.$10^{-3}B^2$…….210
Şekil 5.59 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole/(HPLC)}$ =*f(x)* = +0.54+0.38 A +0.19C -0.21AC-0.014 A^2 +0.28C^2……..210
Şekil 5.60 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole\ (HPLC)}$ = *f(x)*=+0.54+0.38 A -0.035D-0.27 AD-0.014A^2 +0.87D^2……211
Şekil 5.61 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole/HPLC}$ =*f*(*x*)=+0.54+0.38 A +0.23 E+0.37 A E-0.014 A^2- 0.83E^2….. ……211
Şekil 5.62 SÖD uyg. süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole/(HPLC)}$ =*f*(*x*)=+0.54 +0.25 B +0.19 C+0.13B C-2.345.$10^{-3}B^2$+0.28C^2……..211
Şekil 5.63 SÖD uyg. süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$ =*f*(*x*)=+0.54 +0.25 B -0.035 D+0.19BD-2.345.10^{-3} B^2 +0.87D^2……...212
Şekil 5.64 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$=*f*(*x*)=+0.54+0.25B +0.23E+0.21BE-2.345.10^{-3}B -0.83E^2…....212
Şekil 5.65 MeOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{/Ole(HPLC)}$ = *f(x)* =+0.54 +0.19 C-0.035D -0.26 CD+0.28C^2+0.87D^2…….....212
Şekil 5.66 MeOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$ = *f(x)*= +0.54 +0.19 C+0.23E -0.13CE+0.28C^2+0.83E^2……...213
Şekil 5.67 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$=*f(x)*= +0.54 -0.035 D+0.23E+0.18 D E +0.87D^2-0.83E^2…….....213
Şekil 5.68 Toplam Antioksidan Aktivite maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği……221
Şekil 5.69 Box-Cox grafiği……221
Şekil 5.70 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması…….....221

Şekil 5.71 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant\ Akt}$= +94.77+4.04A+4.36B -3.28AB -3.88A^2-10.04 B^2……..222
Şekil 5.72 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant.Akt}$=+94.77+ 4.04A+0.25C-4.767.10^{-4}AC- 3.88A^2 +10.87C^2……..222
Şekil 5.73 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant.\ Akt}$= +94.77 +4.04A -3.99D-1.43AD -3.88A^2 -2.73D^2-9.24E^2……...223
Şekil 5.74 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.AntAkt}$=+ 94.77 +4.04A-0.89E +0.51AE -3.88A^2 -9.24E^2……..223
Şekil 5.75 SÖD uyg. süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.AntAkt}$=+ 94.77 +4.36B+0.25C +0.36BC -10.04B^2+10.87C^2……..……...223
Şekil 5.76 SÖD uyg. süresi-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için,kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant\ Akt}$=+94.77+4.36B -3.99D +3.88BD -10.04B^2 -2.73D^2……..…224
Şekil 5.77 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu ve kontür yüzey grafiği, $Y_{T.Ant\ Akt}$ =+94.77 +4.36 B -0.89 E -0.6BE -10.04B^2 -9.24E^2……....224
Şekil 5.78 MeOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant.Akt.}$=+94.77 +0.25 C-3.99 D -0.73 CD +10.87C^2-2.73D^2.....224
Şekil 5.79 MeOH- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.AntAkt}$=+ 94.77 +0.25 C -0.89 E -0.51 C E +10.87C^2 -9.24E^2……....225
Şekil 5.80 Prob pozisyonu- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant.\ Akt.}$=+94.77 -3.99 D-0.89 E -0.20DE -2.73D^2-9.24 E^2…….…..225
Şekil 5.81 Toplam Fenol (GAE) miktarı maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği…….……...234
Şekil 5.82 Box-Cox grafiği……...….234
Şekil 5.83 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...234
Şekil 5.84 Sıcaklık-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$ = +13,98 +2.31A +0.47B +0.52AB -0.30A^2+0.84B^2……..235
Şekil 5.85 EtOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=+13,98 + 2.31A +2.24C +0.90AC-0.30A^2 -0.83C^2…….235

Şekil 5.86 EtOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$ = +13,98+ 2.31A +4.35 D+0.34AD -0.30A^2 +1.16D^2…….……235
Şekil 5.87 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$= + 13,98 +0.47B +2.24C +0.30BC +0.84B^2-0.83C^2……..……...236
Şekil 5.88 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$= +13,98 +0.47B +4.35D+0.25BD +0.84B^2+1.16D^2……...236
Şekil 5.89 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=+13,98 +2.24C+4.35D +1.09CD -0.83C^2+1.16D^2……236
Şekil 5.90 Toplam Fenol (OLE) miktarı maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği……...239
Şekil 5.91 Box-Cox grafiği……240
Şekil 5.92 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...240
Şekil 5.93 EtOH, sıcaklık iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)=$ +6.16+ 1.59A+0.17B -0,011AB +0.016A^2+0.74B^2 …….……241
Şekil 5.94 EtOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)=$ +6.16 +1.59A+ 1.80C+ 1,21AC +0.016A^2 -0.064C^2 ……..241
Şekil 5.95 EtOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}$ = $f(x)$=+ 6.16+1.59A+2.90 D+0.72AD +0.016A^2 +0.96 D^2 …….….241
Şekil 5.96 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)=$ +6.16 +0.17B+1.80C +0.36BC +0.74B^2-0.064C^2 ……..…..….242
Şekil 5.97 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)$=+6.16 +0.17B +2.90D +0.43BD+0.74B^2 +0.96 D^2 ….…242
Şekil 5.98 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}$= $f(x)$=+6.16+1.80C+2.90D +1.56CD -0.064C^2 +0.96D^2……..…242
Şekil 5.99 Oleuropein (HPLC) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği……245
Şekil 5.100 Box-Cox grafiği……..246
Şekil 5.101 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...246

Şekil 5.102 EtOH, sıcaklık iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole} = f(x) = +\ 5{,}65 + 1.44A + 0.17B + 0.13AB + 0.12A^2 + 0.81B^2$……..247
Şekil 5.103 EtOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole} = f(x) = +\ 5{,}65 + 1.44A + 1{,}47C + 0.95AC + 0.12A^2 + 0.073C^2$……...247
Şekil 5.104 EtOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole} = f(x) = +\ 5{,}65 + 1.44A + 2.79D + 0.81AD + 0.12A^2 + 1.00D^2$……..……..….247
Şekil 5.105 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole} = f(x) = +\ 5{,}65 + 0.17B + 1{,}47C + 0.32B\ C + 0.81B^2 + 0.073C^2$……...248
Şekil 5.106 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole} = f(x) = +5{,}65 + 0.17B + 2.79D + 0.28BD + 0.81B^2 + 1.00D^2$……...248
Şekil 5.107 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole} = f(x) = +5{,}65 + 1{,}47C + 2.79D + 1.71CD + 0.073C^2 + 1.00D^2$……...248
Şekil 5.108 Toplam Fenol miktarı (GAE) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği…….259
Şekil 5.109 Box-Cox grafiği……..259
Şekil 5.110 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması…….260
Şekil 5.111 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +4.21 + 1.32\ A + 0.62\ B + 1.14\ AB + 0.37\ A^2 + 0.18\ B^2$…….. ……260
Şekil 5.112 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +4.21 + 1.32\ A + 0.79C - 0.21\ A\ C + 0.37A^2 + 1.23C^2$.....260
Şekil 5.113 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +4.21 + 1.32\ A + 0.44\ D - 2.02\ AD + 0.37A^2 + 2.95D^2$……...261
Şekil 5.114 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +4.21 + 1.32\ A + 1.08\ E + 1.76\ A\ E + 0.37A^2 - 2.88E^2$…….....261
Şekil 5.115 SÖD uyg.süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit} = f(x) = +4.21 + 0.62B + 0.79\ C + 0.89B\ C + 0.18B^2 + 1.23C^2$…….….261

Şekil 5.116 SÖD uyg.süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}=f(x)= + 4.21 +0.62\ B +0.44DC- 0.014BD +0.18\ B^2 +2.95D^2$……..262
Şekil 5.117 SÖD uyg.süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.F/G.Asit}=f(x)=+4.21 +0.62\ B +1.08\ E +0.75B\ E +0.18B^2 -2.88\ E^2$……...262
Şekil 5.118 EtOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GA}=$ $f(x)= +4.21 +0.79\ C+0.44D -0.67\ C\ D +1.23C^2+2.95D^2$……..….262
Şekil 5.119 EtOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}=f(x)=+4.21 +0.79\ C +1.08\ E +0.19\ CE+ +1.23C^2 -2.88\ E^2$……..…263
Şekil 5.120 Prob pozisyonu- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/\ GA}= f(x)=+2.94 -0.16\ D+0.64\ E+0.50\ DE +2.66\ D^2-2.9E^2$.....263
Şekil 5.121 Toplam Fenol (OLE) miktarı maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği……..267
Şekil 5.122 Box-Cox grafiği……..267
Şekil 5.123 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……268
Şekil 5.124 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/ole}=$ $+1.54+0.56A+0.40B +0.49AB+0.32A^2+0.072B^2$……..268
Şekil 5.125 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropeint}$ $=f(x)=+1.54+0.56\ A +0.27C-0.050\ A\ C +0.32\ A^2 +0.29\ C^2$…….....269
Şekil 5.126 Genlik-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=$ $f(x)= +1.54+0.56A +0.14D -0.79\ AD +0.32A^2 +1.14\ D^2$……...269
Şekil 5.127 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.Fenol/ole}=$ $f(x)=+1.54+0.56A +0.55E +0.79\ AE +0.32A^2 -1.02E^2$…….….269
Şekil 5.128 SÖD uyg. süresi-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/ole}=$ $f(x) =+1.54+0.40B+0.27C +0.3BC +0.072B^2+0.29C^2$…….....270
Şekil 5.129 SÖD uyg. süresi - prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x =+1.54+0.40B+0.14D -0.071BD+0.072B^2 +1.14D^2$…....270
Şekil 5.130 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)=+1.54 +0.40B +0.55E +0.42BE +0.072B^2 -1.02E^2$…..….270

Şekil 5.131 EtOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x)$=+1.54 +0.27C+0.14D -0.26 C D +0.29C^2+1.14D^2……...271
Şekil 5.132 EtOH- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}$= $f(x)$= +1.54+0.27C +0.55E +014 CE +0.29 C^2 -1.02 E^2…….....271
Şekil 5.133 Prob pozisyonu- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Ole}=f(x$=+1.54+0.14D+0.55E -0.045D E+1.14D^2-1.02E^2……...271
Şekil 5.134 Oleuropein(HPLC) maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği……...275
Şekil 5.135 Box-Cox grafiği……..275
Şekil 5.136 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...275
Şekil 5.137 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{ole/HPLC}$= f(x)=+0.58+0.29A+0.22B +0.23 AB +0.16A^2+0.026B^2……276
Şekil 5.138 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole/(HPLC)}$ =f($x_)$=+0.58+0.29A +0.016C -0.088AC +0.16A^2 -0.12C^2…….276
Şekil 5.139 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$ = f(x)= +0.58 +0.29 A +0.24 D -0.25 A D +0.16 A^2 +0.86 D^2…….....276
Şekil 5.140 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole/HPLC}$ =f(x)=+0.58+0.29 A +0.29E+0.41AE +0.16 A^2 -0.46E^2……..…….277
Şekil 5.141 SÖD uyg. süresi-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$= f(x)= +0.58 +0.22 B +0.016 C +0.078 B C +0.026 B^2-0.12C^2……..…277
Şekil 5.142 SÖD uyg. süresi-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$= f(x) = +0.58 +0.22B +0.24D +0.027B D +0.026 B^2 +0.86D^2……...277
Şekil 5.143 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}=f(x)$=+0.58 +0.22 B +0.29 E +0.28B E^2+0.026 B^2 - 0.46E^2…….278
Şekil 5.144 EtOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{/Ole\ (HPLC)}$ =f(x)= +0.58 +0.016C+0.24 D -0.22CD -0.12C^2+0.86 D^2…….278

Şekil 5.145 EtOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$ = f(x) = +0.58 +0.016 C +0.29 E -0.021C E -0.12C^2 -0.46E^2…….……278
Şekil 5.146 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Ole(HPLC)}$ =f(x)=+0.58 +0.24D+0.29 E +0.037 D E +0.86D^2-0.46E^2….…279
Şekil 5.147 Toplam Antioksidan Aktivite maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği…….286
Şekil 5.148 Box-Cox grafiği……..286
Şekil 5.149 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……..….……286
Şekil 5.150 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.AntAktivite}$ = +72.24-0.75 A+17.73 B -8.13* A B+7.75A^2-6.51 B^2……287
Şekil 5.151 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.AntnAktivite}$=+ 72.24 -0.75A -1.65C+5.48AC +7.75A^2 +2.29C^2……..…..287
Şekil 5.152 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.AntAkt}$=+ 72.24-0.75A -21.30 * D-3.95AD +7.75A^2 -44.66D^2……....287
Şekil 5.153 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant\ Akt}$=+ 72.24-0.75 A +9.23E-5.38AE +7.75A^2 +6.14E^2……..…….288
Şekil 5.154 SÖD uyg. süresi-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 +17.73 * B-1.65 * C+2.55*B*C-6.51 * B^2+2.29* C^2…….288
Şekil 5.155 SÖD uyg. süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant.Akt}$ =+72.24 +17.73 B -21.30 D-2.50BD -6.51B^2 -4.66D^2…….….288
Şekil 5.156 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$ =+72.24 +17.73 B +9.23 E-2.16BE -6.51 B^2 +6.14E^2……...289
Şekil 5.157 EtOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 -1.65C-21.30 D+5.29CD +2.29C^2-44.66* D^2……..…289
Şekil 5.158 EtOH- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 -1.65 C +9.23 E+4.78CE +2.29C^2 +6.14E^2…….....289
Şekil 5.159 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Ant.\ Akt.}$ =+72.24 -21.30 D+9.23 E-4.58DE -44.66D^2+6.14E^2……..…290

Şekil 6.1 1D kromatogramın, Carle (1972)'den uyarlanmış, pik çiftleri arasında ayırma kriteri parametrelerinin şematik gösterimi……294
Şekil 6.2 NCRF1 çalışma aralığında artık değer- normal olasılık (probability) grafiği……..……..304
Şekil 6.3 Box-Cox grafiği……..304
Şekil 6.4 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması…….304
Şekil 6.5 MeOH oranı-asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)= $+ 3.83 +0.83A+0.092 B +0.66 AB +1.15A^2+0.22B^2$……..…305
Şekil 6.6 MeOH oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x) = $+ 3.83 +0.83A +0.0283 C -0.42A C+1.15A^2 +0.55 C^2$…….....305
Şekil 6.7 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)= $+3.83 +0.092 B+0.028C +0.13BC +0.22B^2+0.55C^2$…….....305
Şekil 6.8 DCRF çalışma aralığında artık değer-normal olasılık (probability) grafiği.. ……..308
Şekil 6.9 Box-Cox grafiği…….308
Şekil 6.10 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……..……...308
Şekil 6.11 MeOH oranı-Asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}=f(x)= $+9.17-0.87A+0.058B-1.16AB -1.21A^2-0.37B^2$…….....309
Şekil 6.12 MeOH oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}=f(x)= $+9.17-0.87A-0.30C +0.037AC -1.21A^2 -0.56C^2$……..309
Şekil 6.13 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}=f(x)= $+9.17+0.058B-0.30C- 0.60BC -0.37B^2-0.56C^2$…….....309
Şekil 6.14 NCRF1 çalışma aralığında artık değer- normal olasılık (probability) grafiği……..316
Şekil 6.15 Box-Cox grafiği……....317
Şekil 6.16 NCRF1 için deneysel sonuçların 2FI modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...317
Şekil 6.17 Analiz süresi-Asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)= +4,36-0,95A-0,64B+1,07AB……..318
Şekil 6.18 Analiz süresi-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)= +4,36-0,95A -0,51C +0,78AC ……...318

Şekil 6.19 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)= +4,36 -0,64B-0,51C +0,38BC…….318
Şekil 6.20 DCRF çalışma aralığında artık değer-normal olasılık (probability) grafiği…….320
Şekil 6.21 Box-Cox grafiği……321
Şekil 6.22 Deneysel sonuçların 2FI modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması……...321
Şekil 6.23 Analiz süresi-asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}=f(x)= +8,73-0,89A+0,66B-1,09AB……..322
Şekil 6.24 Analiz süresi-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle Eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{DCRF}=f(x)$= +8,73-0,89A+0,44C-0,73AC ……322
Şekil 6.25 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrili içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}=f(x)= +8,73+0,66B+0,44C-0,45BC…….. 322
Şekil 6.26 D-optimal fraksiyon tasarım ile katagorik faktörlerin cevap değişkenine göre değişimi……...329
Şekil 6.27 %20-80 gradient aralığı ve 15 dak. analiz süresi için olası lineer ve basamaklı gradient adımlarının simülasyon sonuçları……332

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *Olea europaea* bitkisinde bulunan temel fenolik bileşikler……..….. ….5
Çizelge 3.1 Zeytin bitkisindeki temel bileşik sınıfları……..……...65
Çizelge 3.2 Bir girdi değişkeninin kodlanmış ve gerçek değerleri arasındaki ilişki……101
Çizelge 3.3 N; Kolon Etkinliği Hesaplama Metodları……..120
Çizelge 3.4 Literatürde mevcut alıkonma modeli örnekleri……..138
Çizelge 4.1 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrileri için kullanılan doğrusallık ve çalışma aralıkları…….152
Çizelge 4.2 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrisi denklemi, LOQ ve LOD değerleri …….153
Çizelge 4.3 Polifenollerin kalibrasyon seti tasarımı……..153
Çizelge 4.4 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrileri için kullanılan doğrusallık aralığı ……154
Çizelge 4.5 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrisi denklemi, LOQ ve LOD değerleri ……154
Çizelge 5.1 Üç bağımlı değişken için dört faktörlü CCD tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı.....157
Çizelge 5.2 MeOH/H_2O ekstraksiyonu deneysel tasarım noktaları ve deneysel sonuçlar ……..158
Çizelge 5.3 MeOH ekstraksiyonu: Toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…….160
Çizelge 5.4 MeOH ekstraksiyonu Toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…….167
Çizelge 5.5 MeOH ekstraksiyonu oleuropein (HPLC) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…….173
Çizelge 5.6 MeOH ekstraksiyonunda dört değişkenin gradient adımlarının belirlenmesi ……...181
Çizelge 5.7 MeOH/H_2O ekstraksiyonunda sesötesi dalga (ultrasonik banyo) uygulamasının üç cevap faktörü üzerine etkisi……..184
Çizelge 5.8 Ses ötesi dalga uygulanmış ve uygulanmamış MeOH/H_2O çözücülü ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite değişimi ……186
Çizelge 5.9 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı……..188
Çizelge 5.10 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonu üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları……189
Çizelge 5.11 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…….....190

Çizelge 5.12 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları……198
Çizelge 5.13 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda, oleuropein (HPLC) miktarı cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…..207
Çizelge 5.14 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı……217
Çizelge 5.15 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonu tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları……218
Çizelge 5.16 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda, toplam antioksidan aktivite cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları....219
Çizelge 5.17 Üç bağımlı değişken için dört faktörlü CCD tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı……..229
Çizelge 5.18 EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonu için kodlanmış ve gerçek değerlerle deneysel tasarım noktaları ve sonuçları……...230
Çizelge 5.19 EtOH/H_2O ekstraksiyonu Toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları……..232
Çizelge 5.20 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda Toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları……238
Çizelge 5.21 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda oleuropein (HPLC) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları……..244
Çizelge 5.22 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ses ötesi dalga (ultrasonik banyo) uygulamasının cevap değişkenleri üzerine etkisi……...251
Çizelge 5.23 Ses ötesi dalga uygulanmış ve uygulanmamış EtOH'lü ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite değişimi…….253
Çizelge 5.24 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı……...255
Çizelge 5.25 EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonunda üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları……..256
Çizelge 5.26 EtOH/H_2O çözücüsünde ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda Toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları……..257
Çizelge 5.27 EtOH/H_2O çözücüsünde ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları……265
Çizelge 5.28 EtOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda oleuropein (HPLC) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…….……...273
Çizelge 5.29 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı…….……..282

Çizelge 5.30 EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonu tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları……283
Çizelge 5.31 EtOH/H_2O çözücü sisteminde ultrasonik prob ile yapılan tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda, toplam antioksidan aktivite cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları……284
Çizelge 6.1 İzokratik elüsyon yöntem optimizasyonu için, üç faktörlü CCD tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı……..297
Çizelge 6.2 İzokratik elüsyon yöntem optimizasyonu deneysel tasarım noktaları…...297
Çizelge 6.3 İzokratik elüsyon yöntem optimizasyonu deney tasarımı noktalarında elde edilen kromatogramlardan sağlanan, ayırımı yapılan bileşiklerin alıkonma zamanları……298
Çizelge 6.4 İzokratik yöntem optimizasyonu deney tasarımı noktalarından elde edilen kromatogramlardan sağlanan, $\theta_{s,l}$ tanımlamasında kullanılan veriler ve hesaplanmış $\theta_{s,l}$ değerleri……...299
Çizelge 6.5 İzokratik yöntem optimizasyonu deney tasarımı noktalarında cevap değişkenlerinin (NCRF, DCRF) değerleri……..301
Çizelge 6.6 İzokratik yöntem optimizasyonu NCRF1 cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…….302
Çizelge 6.7 İzokratik yöntem optimizasyonu DCRF cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları…….306
Çizelge 6.8 Çok amaçlı izokratik yöntem optimizasyonu için çözüm kümesi…….….311
Çizelge 6.9 İzokratik optimizasyon (ara tasarım) üç faktörlü Box-Behnken tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı…….314
Çizelge 6.10 İzokratik optimizasyonu ara deneysel tasarım noktaları ve cevap değerleri……314
Çizelge 6.11 İzokratik yöntem optimizasyonu (ara tasarım) NCRF1 cevap faktörü için tanımlanan 2FI modelin ANOVA sonuçları…….315
Çizelge 6.12 İzokratik yöntem optimizasyonu (ara tasarım) DCRF cevap faktörü için tanımlanan 2FI modelin ANOVA sonuçları…….319
Çizelge 6.13 Çok amaçlı izokratik yöntem optimizasyonu (ara tasarım) için çözüm kümesi……..323
Çizelge 6.14 Başlangıç gradient adımında elde edilen log k_w ve S değerleri……326
Çizelge 6.15 Gradient optimizasyonuna ait tasarım noktaları ve cevap değerleri……328
Çizelge 6.16 Gardient yöntem optimizasyonu için çözüm kümesi……...328
Çizelge 6.17 MeOH mobil fazlı lineer gradient yöntem optimizasyonu için LSSM modelinde kullanılan, hesaplanmış ve kromatogramlardan ölçülmüş veriler……330
Çizelge 6.18 MeCN ve MeOH mobil fazlı, basamaklı gradient yöntem optimizasyonu için kromatogramlardan elde edilen ve hesaplanan veriler……334

Çizelge 6.19 *Levenberg- Marquardt* Algoritması optimizasyonu çalışmasında kullanılan veriler……..337
Çizelge 6.20 Gradient yöntemin *Levenberg- Marquardt* Algoritması ile optimizasyon sonuçları…….339
Çizelge 6.21 Farmokope 2005 ve geliştirilen alternatif yönteme ait kromatografik tanımlama ve cevap fonksiyonu değerleri……343
Çizelge 6.22 Farmokope 2005 ve geliştirilen alternatif yöntem ile ayrılan polifenolik maddelerin alıkonma zamanları……..343
Çizelge 6.23 Standart ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında iki analiz yöntemi için cevap değişkeni sonuçları …….343

KROMATOGRAMLAR DİZİNİ

Kromatogram 6.1 İzokratik yöntem optimizasyonu, optimum nokta1 için
kromatografik koşullar: %24,30MeOH; %4.8 Asetik Asit;
Akış hızı: 1.00mL ……311
Kromatogram 6.2 İzokratik yöntem optimizasyonu, optimum nokta2 için
kromatografik koşullar: %MeOH: 52.50 %Asetik Asit:4.8
Akış hızı: 1.38mL…….312
Kromatogram 6.3 İzokratik yöntem optimizasyonu, optimum nokta3 için
kromatografik koşullar: %MeOH: 80.74 %Asetik Asit:4.8
Akış hızı: 1.00mL……..312
Kromatogram 6.4 Gradient yöntem optimizasyonu, optimum noktada
standart polifenol karışım kromatogramı……..340
Kromatogram 6.5 Gradient yöntem optimizasyonu, MeOH/H_2O çözücülü
bitki ekstrakt kromatogramı…….……...340
Kromatogram 6.6 Farmakope2005 analiz yöntemi, standart polifenolik
karışım kromatogramı…….341
Kromatogram 6.7 Farmakope 2005 analiz yöntemi, MeOH/H_2O çözücülü
bitki ekstrakt kromatogramı……...……...342

1. GİRİŞ

Zeytin bitkisi (*Olea europaea* L.) Akdeniz ülkelerinin en önemli doğal ürünlerinden biridir. Dünya çapında zeytin ağaçları sekiz milyon hektardan fazla bir alanda yetiştirilmekte ve Akdeniz havzası bu ağaçların yaklaşık % 98'sini barındırır. *Olea europaea* L. yaygın olarak beslenme için kullanılmakta olup, meyvesi ve bundan elde edilen yağı günlük beslenmede yer alan önemli bileşenleridir.

Zeytin ağaçları önemli miktarda, yetiştirilmesi, hasat dönemi ve zeytinyağı ekstraksiyonu aşamasında, genellikle "zeytin yan ürünü" olarak bilinen ürünleri üretir. Zeytin yaprakları, zeytin tarımının en önemli yan ürünlerinden biridir ve atık olarak değerlendirilir. Yapraklar zeytin ağaçlarının budanması sırasında (ince dallar ve yan yapraklardan) yılda ağaç başına yaklaşık 25 kg kadar ve zeytinyağı işleme sırasında (yaklaşık meyve ayrıldıktan sonra ağırlığının % 10' u kadar) büyük miktarlarda elde edilir (Abaza vd. 2015).

Yaprak; bitki metabolizmasının temel yapısında bulunan hem birincil hem de ikincil metabolitlerin ve biyolojik olarak aktif olan bileşiklerin potansiyel kaynağı olarak düşünülebilir. Pek çok çalışma, faydalı bileşiklerin zenginliği göz önüne alınarak, zeytin yapraklarının bileşiminde bulunan fenolik bileşiklere odaklanmıştır. Bu ilginç ve katma değeri yüksek olan bileşenleri elde etmek mümkün ve önemli olmakla birlikte, yapraklar genellikle atık, gıda sanayi yan ürünü, hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Zeytin yaprağı ile ilgili insan ve hayvan çalışmalarında, *Olea europaea* L. yapraklarından elde edilen fenolik bileşiklerin, bazı kronik hastalıkların şiddetini ve riskini azaltarak insan sağlığına katkı sağladığı, anti-oksidan, anti-inflamutar, anti-allerjenik, anti-HIV, anti-proliferatif, anti-hipertansif, anti-aterojenik, kardiyoprotektif, hipokolesterolemik, hipoglisemik, anti-viral, insan lösemi hücrelerine karşı koruyucu, lipid düşürücü aktivite ve apoptotik etki gibi pek çok fizyolojik-biyolojik etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir.

Zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktlardaki, biyoaktif bileşenlerin içeriği hakkında farklı araştırma sonuçları bulunmaktadır. Bu farklılığa, ekim alanlarının çeşitliliği, hasat dönemleri, iklim koşulları, stres koşulları, örnekleme çeşitliliği, kullanılan ekstraksiyon metodları, yıkama, kurutma, işleme ve saklama koşulları gibi pek çok koşul etki etmektedir. Bu nedenle zeytin bitkisinin doğru fenolik profilinin ortaya konulması için doğal şartların dışında toplama, saklama ve kurutma koşulları ile birlikte ekstraksiyon ve analiz aşamalarının optimum koşullarının belirlenmesi oldukça önemli bir konudur.

Zeytin yaprağının majör etken maddesi olan oleuropeinin, insan sağlığı üzerine etkileri umut vericidir. Sağlıklı beslenmeye olan talebin artması ile gıdalarda biyoaktif maddeler olarak, doğal antioksidanların kullanılması ve fonksiyonel gıdaların üretimi giderek önem kazanmaktadır. Son yıllarda bitkisel veya mantar içerikli doğal besinlerin ilaç olarak kullanımının artması fitoterapi, alternatif ve tamamlayıcı terapiye olan ilgiyi arttırmıştır. Pek çok ülkede ticari önem kazanmasından dolayı geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Dünya marketlerinde bu tip ilaç pazarının 60 milyon dolara, yıllık büyüme hızının % 5-15 düzeyine ulaştığı bilinmektedir. ABD'de son 50 yılda halkın doğal içerikli ilaçlara olan ilgisi % 34-42 oranında arttığı bildirilmektedir (Roybyrne vd. 2005). Ülkemizde de zeytin yaprağının çay, kapsül, iksir ve tentür olarak kullanımı son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır.

LDL oksidasyonu yapay antioksidan maddelerin kullanımıyla engellenebilmekle birlikte, doğal antioksidan maddelerin sağlık açısından toksisitesinin daha az olması, bu maddelerin kullanım talebini artırmaktadır. Zeytin yaprağı bu konuda iyi bir alternatif sunmaktadır. Zeytin ağacı yan ürünlerinin ekstraktları, oksidatif parçalanmaları önleyebilen fenolik bileşikler gibi önemli antioksidanları içermesi nedeni ile kozmetik, tıp, farmosetik ve gıda endüstrisinde kullanılabilmektedir. Bunun yanında, gıda ürünlerinin duyusal ve besinsel özelliklerindeki kayıpları önleyerek raf ömrünü uzatma özelliğine sahiptir. Zeytin yaprakları verimli bir kaynak olarak kullanıldığında sağlıklı, güvenli, ucuz, etkili ve alternatif bir antioksidan kaynağıdır.

Polifenolik bileşiklerin saf formlarının kimyasal ve enzimatik yollarda üretilmesi mümkün olmasına rağmen üretim maliyeti oldukça yüksektir. Bu nedenle, bu kadar

önemli bir potansiyele sahip olan sekoiridoid yapıdaki oleuropein molekülü ve türevlerinin, etkili ve çevreye duyarlı yöntemlerle ekstrakte edilmesi önem kazanmaktadır. Yapılan literatür araştırmaları sonucu zeytin yaprağının katma değer sağlamayacak şekilde kullanıldığı, optimum koşulları belirlenmiş çevre dostu bir ekstraksiyon uygulamasının ve analiz yönteminin olmadığı tespit edilmiştir. Tarımsal atık olan zeytin yaprağından, uygun ekstraksiyon yöntemleri geliştirerek polifenolleri ektstrakte etmek, biyoaktif bileşenlerin verimini arttırmak için önemli bir adımdır. Bu amaçla tez kapsamında, geleneksel çözücü ekstraksiyonu yönteminin optimum koşullarının belirlenmesi yanında, yenilikçi, çevre dostu ekstraksiyon tekniklerinden ses ötesi dalga ekstraksiyonu yöntemi geliştirilmiş, modellenerek optimum koşulları tespit edilmiştir. Deneysel tasarımlar, farklı parametre etkileri ve istatistiksel çalışmalar kemometrik metodoloji ile verilmiştir.

Aynı zamanda, zeytin yaprağında mevcut polifenollerin kromatografik olarak belirlendiği, farklı koşullarda pek çok kromatografik yöntem bulunurken, önemli bir sekoiridoid olan oleuropein ve türevlerinin diğer polifenolik yapılardan etkin bir şekilde ayrıldığı, analiz süresi kısa, basit bir yöntem bulunamamıştır. Bu nedenle klasik yaklaşımdan farklı olarak, kemometrik metodoloji ile kromatografik gradient bir yöntem geliştirilmiştir. Bilgisayar destekli gradient kromatografik metod geliştirme literatürde oldukça yeni bir konudur ve araştırma-geliştirmeye çok açıktır. Bu amaçla ters faz sıvı kromatografide, kullanılan organik çözücünün gücüne dayanan, *Doğrusal Çözücü Güç Modeli (Linear Solvent Strength Model)* ve *Alıkonma Modeli* kullanılmıştır. Aynı zamanda klasik ayırma gücü yaklaşımı yerine, literatürde önerilen *yeni kromatografik cevap fonksiyonu (NCRF)* temel bağımlı değişken olarak alınmıştır. Ekstraksiyon sonrası, ekstrakt içindeki bileşenleri tanımlanması; *Levenberg-Marquardt algoritması* ve *Pareto* çözüm bölgeleri ile model tanımlanması ve optimizasyonu yapılan, gradient HPLC-PDA sistemi ile yapılmıştır. Analiz metodları bilgisayar destekli metod geliştirme yöntemleri uygulanarak optimize edilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarının Kimyasal Bileşimi

Olea europaea yaprağı bazı element, vitamin ve yağlar gibi mikro besinler dahil yüz kadar farklı kimyasal madde içermektedir. Bu maddeler arasında özellikle fenolik bileşikler ve türevlerinin, zeytin yaprağının biyolojik etkilerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. *Olea europaea* yapraklarının kimyasal bileşimi, zeytin ağacının türü, yetiştiği bölge, iklim, dalların ağaca oranı, zeytin yaprağının yapısal karbonhidrat ve azot içeriği toplama tarihi ve kurutma koşulları gibi çeşitli şartlara bağlı olarak değişir. Ayrıca, hasat zamanı, uygulanan kültürel tedbirler, saklama şartları, nem içeriği, toprak ve yağlar ile kontaminasyonun derecesi gibi faktörlerden de etkilenir (Delgado-Pertinez 2000, Martin-Garcia ve Molina-Alcaide 2008, El ve Karakaya 2009).

Olea europaea yaprağında başlıca beş grup fenolik bileşik bulunur; sekoiridoit alt grubu oleuropeositler (oleuropein ve verbascoside), flavonlar (luteolin-7-glukozit, apigenin-7-glukozit, diosmetin-7-glukozit, luteolin ve diosmetin), flavonoller (rutin), flavan-3- oller (kateşin) ve substitue fenoller (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilik asit ve kafeik asit) (Benavente-Garcia vd. 2000).

Olea europaea yaprağında en bol, sekoiridoit yapılardan oleuropein ve türevleri bulunurken, hidroksitirozol, luteolin, apigenin-7-glikozit, luteolin-7-glikozit ve verbaskozit onu izlemektedir. Flavonoidler kayda değer miktarlarda meydana gelirken, basit fenolik bileşikler ve asitler daha düşük miktarlarda oluşmaktadır. *Olea europaea* bitkisinin yaprak, çekirdek bölümleri ile işlem sonrası pulp ve zeytin yağı kısmında bulunan, bazı temel fenolik bileşikler çizelge 2.1'de özetlenmiştir (Ryan ve Robards 1998).

Çizelge 2.1 *Olea europaea* bitkisinde bulunan temel fenolik bileşikler

Fenolik Bileşik	Yaprak	Çekirdek	Pulp	Zeytin yağı	Molekül Kütlesi
Apigenin	✦		✦		270
Apigenin-7-glikozit	✦		✦		
Dimetiloleuropein	✦		✦		526
Elenolik asit	✦		✦	✦	242
Elenolik asit glukozit			✦	✦	
Ferulik asit			✦	✦	194
Gallik asit			✦	✦	170
Hesperidin	✦		✦		610
Homovanilik asit				✦	182
p-Hidroksibenzoik asit				✦	138
p- Hidroksifenilasetik asit			✦	✦	152
(p-Hidroksifenil)etanol				✦	138
Hidroksitirozol	✦		✦	✦	154
Kafeik asit	✦		✦	✦	180
Klorojenik asit	✦				343
Kornosit			✦		316
o-Kumarik asit			✦	✦	164
p-Kumarik asit	✦		✦	✦	164
Kuarsetin	✦		✦		302
Kuarsetin-3-rutinozit (rutin)	✦		✦		610
Ligstrosit	✦		✦		524
Luteolin	✦		✦		286
Luteolin-7-glikozit	✦		✦		448
Luteolin-7-rutinozit	✦				
Nüzhenit		✦			
Nüzhenit oleosit		✦			
Oleuropein	✦		✦	✦	540
Oleosit ve Oleurosit	✦				
Protokateşik asit				✦	154
Salidrozit		✦			
Sinapik asit				✦	224
Sinnamik asit				✦	148
Siyanidin-3-glukozit	✦		✦		
Şirincik asit			✦	✦	198
Tirozol	✦		✦	✦	138
Tirozol glikozit			✦		300
Vanilik asit			✦	✦	168
Veratrik asit			✦		
Verbaskozit			✦		624

2.1.1 Oleuropeositler (Sekoiridoitler)

Özellikle suda çözünen bileşenler grubunda değerlendirilen iridoit fraksiyonlarının içeriğinde bulunan temel iridoit glikozit yapıları, farklı türlerin kemotaksonomik açıdan yeniden sınıflandırılmasında önem taşımaktadır. Literatürde iridoit alt grubu sekoiridoit yapılarla ilgili çalışmalar kemotaksonamik sınıflandırmaya yön verecek ilgi çekici ve oldukça yeni çalışmalardır. *Olea europaea* türünde mevcut en önemli grup olan sekoiridoitleri oluşturan oleuropeositlerin, teşhisi ve tayini kemotaksonomik sınıflandırma açısından önemlidir.

Bu konu ile ilgili yapılan iki ayrı çalışmada, *Olea europaea* bitkisinin yapraklarından hazırlanan MeOH'lü ekstraktlardan; oleuropein, ligstrosit, oleosit ve oleurosit izole edilmiş, yapıları IR spektroskopisi, kütle spektroskopisi, 1H NMR ve 13C NMR teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Ayrıca bitkinin yapraklarında sekoiridoit bir yapı olan dimetiloleuropeinin bulunduğu belirtilmiştir **(Gariboldi vd. 1986, Kuwajima vd. 1988)**.

Ruiz-Gutierrez vd. (1995) yaptıkları çalışmada, taze zeytin yaprak ve meyvelerinden oleuropein ve ligstrosit bileşikleri izole edilmiş, meyve ve kuru yaprak ekstraktlarındaki oleuropein miktarı ise 20-100 mg/g olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, Portekiz'de yetişen *Olea europaea* yapraklarının (400 g) MeOH'lü ekstraktından, antioksidan etkili non-glukozidik bir sekoiridoit olan 3,4-dihidroksifeniletil 4-formil-3-formilmetil-4-hekzenoat (hidroksitirozolün, elenolik asitin dialdehidik formuyla oluşturduğu ester 3,4- DHPEA-EDA) bileşiğinin % 0,16'lık verimle izole edildiği belirtilmiştir **(Paiva-Martins ve Gordon 2001)**.

2001 yılında yapılan bir çalışmada, Fransa'da 14 farklı yerde yetişen *Olea europaea* kültür bitkilerinin yapraklarındaki oleuropein ve oleurosit miktarı HPLC yöntemi ile tayin edilmeye çalışılmıştır. Yapraklar % 60'lık MeOH ile ultrasonik banyoda ekstrakte edilmiş, HPLC'de mobil faz olarak kullanılan H_2O (pH'ı o-fosforik asit ile 3'e

ayarlanmış)-MeCN (79:21) karışımı ile seyreltildikten sonra, C18 kolonda analizlenmiştir. 280 nm'de yapılan ölçümler sonucu yapraklardaki oleuropein miktarı % 9,04–14,32, oleurosit miktarı ise % 0,43– 0,79 olarak hesaplanmıştır **(Savournin vd. 2001)**.

Bitkinin yapraklarında bir feniletanoid glukozit olan verbaskozit bileşiğinin bulunduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir **(Savournin vd. 2001, Servili vd. 2004).**

Verbaskozitin elde edilmesi için, Fransa'da toplanan zeytin yaprakları, etüvde kurutulmuş ve toz edilmiştir. Toz halindeki yapraklar (500 g), % 50'lik sulu MeOH'le ektrakte edildikten sonra MeOH uçurulmuş ve kalan sulu faz, kloroformla muamele edilip NaCl ile doyurulduktan sonra süzülmüştür. Fenolik bileşikler bu çözeltiden etil asetatla ekstraksiyon sonucu alınmış ve etil asetatlı faz uçurularak 23 g kuru ekstrakt elde edilmiştir. Bu ekstraktın 5 g'ı, LPLC (düşük basınçlı sıvı kromatografisi) ile analiz edilmiştir. Mobil faz olarak MeOH-H_2O kullanılmış ve 100 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanan elüat daha sonra İTK ile analiz edilmiştir. % 40 MeOH'lü fraksiyonda verbaskozit ^{13}C ve ^{1}H NMR teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Verbaskozitin HPLC ile tayini için toz halindeki yapraklar (5 g) ultrasonik banyoda, 30 ml % 60'lık MeOH'le 15 dk boyunca ekstrakte edilip süzülmüştür. Mobil faz olarak % 79 0,1 M (ortofosforik asitle asitlendirilmiş (pH 3)) H_2O ve % 21 (o-fosforik asitle asitlendirilmiş) MeCN kullanılmış, akış hızı 1 mL/dk, analiz süresi 35 dk olarak belirlenmiştir. Verbaskozit piki 280 nm'de gözlenmiştir. Yapraklarda ki verbaskozit % 0,12–0,53 olarak bulunmuştur **(Savournin vd. 2001)**.

Briante vd. (2004) tarafından, kitosan üzerine tutturulmuş (immobilize edilmiş) termofilik β-glikosidaz ile zeytin yaprağında büyük oranlarda bulunan oleuropeinin hidroksitirozole basit ve hızlı bir teknikle biyodönüşümünün yapıldığı çalışmada, bitkisel doğal bir kaynaktan daha kuvvetli antioksidan kapasitesi ile karakterize edilen basit fenollerin ticari olarak gıda ve sağlık sektörlerinde kullanılabileceği, oleuropeinin bu amaçla kullanılabilecek doğal bir madde olduğu belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan *cv. Moraiolo* zeytin yaprağı ekstraktının 25,6 mg'lık kısmında 9,692 mg oleuropein bulunmuş, biyoreaktörde biyodönüşümle 2,533 mg hidroksitirozol elde edilmiştir.

2004 yılında yapılan çalışmada, İspanya'da yetişen *Olea europaea* bitkisinin yapraklarından (500 g), % 1,6 (a/a) verimle oleanolik asit izole edilmiş ve bu bileşiğin hipoglisemik, hepatoprotektif, antienflamatuvar, antibakteriyal, anti-HIV ve antioksidan etkileri gösterdiği çeşitli araştırıcılar tarafından rapor edilmiştir **(Guinda vd. 2004)**.

2004 yılında yapılan bir başka çalışmada, Afrika kaynaklı *Olea europaea subsp. africana* bitkisinin yaprakları (1,5 kg) sırasıyla hekzan, etil asetat, MeOH ve % 80 MeOH ile ekstrakte edilmiş ve etil asetatlı 13,9 g ekstraktdan kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak, oleanolik asit, ursolik asit, uvaol bileşikleri izole edilmiştir. Aynı çalışmada, Afrika'da yetişen *Olea europaea cape cul.* bitkisinin yaprakları (518 g), petrol eteri, diklorometan, etil asetat ve MeOH ile ekstrakte edilmiş, 2,0 g etil asetatlı ekstrakttan oleanolik asit (0,79 g) ve metil maslinat (80 mg) bileşiklerinin izole edildiği bildirilmiştir **(Somova vd. 2004)**.

2005 yılında, Yunanistan'ın 10 farklı yerinde yetişen *Olea europaea* bitkisinin yapraklarından hazırlanan dekoksiyonun, oleuropein, elenolik asit, tirozol ve hidroksitirozol içeriğinin belirlendiği çalışmada, kaynar su ekstraksiyonundan (dekoksiyon) sonra, HPLC ve LC-MS ile elde edilen verilerden yapraklardaki miktarlar, oleuropein % 0,24, elenolik asit %0,066, tirozol % 0,041, hidroksitirozol için % 0,047 bulunmuştur **(Agalias vd. 2005)**.

Bouaziz ve Sayadi (2005) tarafından; Tunusta topladıkları *Chemlali* tipi *Olea europaea* bitki yapraklarından oleuropein 6.8 g/100 g olarak belirlenmiş, monomerik fenollere ise eser miktarda rastlanmıştır. Bunun yanında oleuropeinle birlikte flavanoid yapılardan altısı (luteolin 7-O-glukosit, luteolin 7-O-rutinosit, apigenin 7-O-glukosit, rutin, luteolin ve apigenin) LC-MS yöntemi ile belirlenmiştir. Aynı çalışmada 100 g taze zeytin yaprağından asit hidroliz reaksiyonu ile C18 silikajel kolon kullanılarak, 2.3 g hidroksitirozol izole edilmiştir. Bu çalışma ile zeytin yaprağına asidik hidroliz uygulamasında en önemli etkinin oleuropein miktarının tamamen azalması ve hidroksitirozol miktarındaki önemli artış olduğu vurgulanmıştır. Oleuropeinin kimyasal yapısı oleosit 11-metil ester ile 3,4-dihidroksifenil etanol (hidroksitirozol)' den oluşur ve degredasyonu sonrası temel bileşeni hidroksitirozoldür.

Altınyay ve Altun (2006) çalışmasında, doğal (*Olea europaea L. var. sylvestris*) ve kültüre alınmış (*Olea europaea L. var*.e*uropaea*) zeytin ağaçlarının yaprak ve dallarında bulunan oleuropein'in kantitatif analizi için basit ve duyarlı bir yöntem geliştirilmiştir. Oleuropein miktar tayini, ters faz HPLC ile C18 kolonunda su: MeCN-formik asit (84,6:15:0.4) mobil fazı kullanılarak yapılmıştır. Oleuropein miktarı, *Olea europaea L. var. europaea* bitkisi için farklı örneklerde, yapraklarında % 3,506-% 4,020 dallarında % 1,438-% 1,097 aralığında saptanırken *Olea europaea* L. *var. sylvestris* bitkisi için yapraklarında % 5,197, dallarında ise % 1,462 olarak belirlenmiştir.

Bianco vd. (2006) yapılan bir başka çalışmada, ligstrosit aglikonunun metil asetali izole edilmiş ve yapısı ^{1}H ve ^{13}C NMR teknikleri ile aydınlatılmıştır.

İspanya'da yapılan bir çalışmada, zeytin yaprağı (1g), ses ötesi dalga etkili ekstraksiyon ile, % 59'luk EtOH kullanılarak ekstrakte edilmiş ve analizi, DAD-HPLC sistemi (280, 330, 340 ve 350 nm) ile yapılmıştır. Analizde, C18 (15 × 4.6 mm, 5 μm) kolon ve mobil faz olarak % 6 asetik asit-su (2mM sodyum asetat içeren) ve MeCN karışımı içeren gradient sistem kullanılmıştır. Analiz sonucu yapraklardaki oleuropein, 22,6 g/kg olarak belirlenmiştir **(Japón-Luján vd. 2006a).**

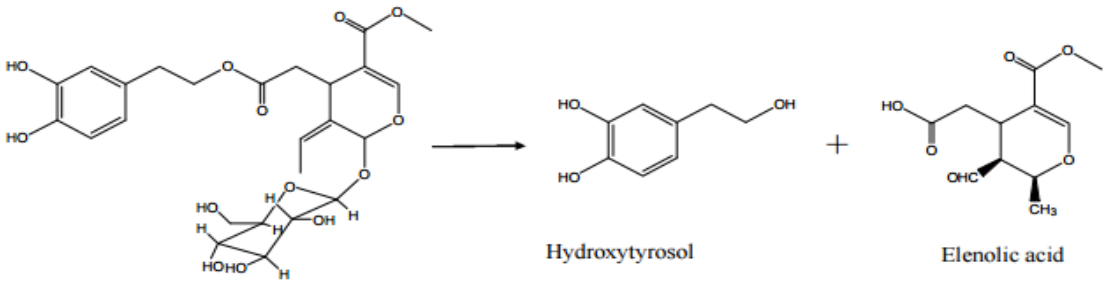
Karioti vd. (2006) çalışmasında, bor eksikliği olan *Olea europaea* yapraklarından % 80 MeOH/H_2O çözücü sistemi ekstraksiyonu ile 6'-E-p-coumaroylsecologanoside ve 6'-O-[(2E)-2,6-dimethyl-8-hydroxy-2-octenoyloxy]-secologanoside ve bilinen üç sekoiridoit glikozitten, oleuropein, oleosit dimetil ester ve secologanoside birlikte izole edilmiştir. İzole edilmiş tüm bileşiklerin yapısı, NMR ve HPLC-DAD (240, 254, 280, 330 ve 350 nm) MS (MSD API-elektro spray) ile analiz edilmiştir. Belirlenen yeni sekoiridoitlerin, besin stresine karşı fizyolojik tepki olarak, bitki tarafından sentezlendiği belirtilmiştir.

Öztunca vd. (2011), bazı türlerde mevcut suda çözünen bileşiklerden, majör iridoit glikozitlerin kemotaksonomik incelemesini yaptıkları çalışmada, bitki ekstraklarındaki iridoit yapıları tespit etmek için HPLC, kolon kromatografisi ve İTK tekniklerini kullanmıştır. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş bitki örnekleri MeOH ile ekstrakte edilmiş ve bitkinin sulu ekstraktlarından polimit fraksiyonları hazırlanmıştır. Bitki

örneklerinde iridoit yapıların belirlenmesinin, kemotaksonomik açıdan bitki türünün yeniden sınflandırılmasında önemli olduğu belirtilmiştir.

Hashmi vd. (2015) derlemelerinde; oleuropeinin, *Olea europaea'*nın bor eksikliği olan yapraklarından, meyve ve pulpundan, çekirdeğinden, ağaç kabuğundan MeOH ekstraksiyonu ile elde edildiğini belirtmiştir. Oleuropein ve diğer sekoiridoidlerden sekologanosit, oleoside 6-E-p-coumaroyl-secologanosid (comselogoside), 6-O-[(2E)-2,6-dimethyl-8-hydroxy-2-octenoyloxy]-secologanosid bor eksikliği olan yapraklardan MeOH ekstraksiyonu ile izole edilmiştir. Oleosid ise yine *Olea.europaea* yapraklarından su ekstraksiyonu ile izole edilmiştir. Hidroksitirozol-elenolat, elenolik asit metil ester, ligstrosid yapraklardan kloroformda çözünen fraksiyon olarak izole edilmiştir. Zeytin yapraklarından etil asetat ekstraksiyonu ile iki yeni sekoiridoid glikozit oleuricin A ve oleuricin B izole edilmiştir. Oleurosid ve 3,4-DHPEA-EDA (oleasin) zeytin yapraklarının sulu ekstraktından izole edilmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktının ana polifenolik bileşeni oleuropein; ışık, asit, baz ve yüksek sıcaklık etkisi altında, hidroksitirozol ve elenolik asite ayrışmaktadır.



Oleuropein

Hydroxytyrosol

Elenolic acid

Yuan vd. (2015) 'nin çalışmasında, zeytin yaprağı ekstraktında mevcut oleuropeinden, enzimatik reaksiyonla hidroksitirozolün yüksek verimle elde edilmesi için, optimum koşullar belirlenmiştir. Enzimatik proseste, oleuropein miktarı ve enzimin anahtar faktörler olduğu bildirilmiştir. Taraması yapılan 10 enzim arasında en yüksek oleuropein bozunma oranına sahip enzim belirlenmiştir. Tek faktör optimizasyon süreci (pH, sıcaklık, zaman, enzim miktarı) ve Box-Behnken tasarım % 81,04 oleuropein içeren

zeytin yaprağı ekstraktının enzimatik hidrolizi için çalışılmıştır. Ayrıca, farklı substratlarda (% 38.6 ve % 81,04 OLE) enzimatik hidroliz sonuçları karşılaştırılıp, antioksidan özellikleri (DPPH) de değerlendirilmiştir. Sonuçta hidroliz basamaklarının performansı için en iyi biyo-katalizör olarak, hemisellülozun kullanılabilir olduğu gösterilmiştir ve zeytin yaprağı ekstraktının oleuropeinden yüksek saflıkta hidroksitirozole biyodönüşümü için uygun olduğu bildirilmiştir. Hidroksitirozolü maksimum verim ile elde etmek için en uygun enzimatik koşullar; pH 5, sıcaklık 55 °C ve enzim miktarı 55 mg olarak belirlenmiştir.

2.1.2 Flavon ve Flavanoller

Olea europaea'nın yaprakları ve tomurcuklarından hazırlanan ekstraktların HPLC sistemiyle incelenmesi sonucu, bir flavanon heteroziti olan hesperetol-7-rutinozit yanında flavonol heterozitlerinden rutozit (kersetol-3-rutinozit), flavon heterozitlerinden ise luteolol-7-glukozit saptanmıştır. HPLC için ters-faz C18 kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25ºC, akış hızı 1,3 ml/dk olarak saptanmıştır. Dedektör olarak UV dedektör kullanılmış ve bileşikler 340 nm dalga boyunda gözlenmiştir. Mobil faz % 2 asetik asitli su ve MeCN karışımından oluşmuş, analiz gradient elüsyonla yapılmıştır. Bileşiklerin alıkonma zamanları rutozit, luteolol-7-glukozit ve hesperetol-7-rutinozit için sırası ile 42,4, 43,9 ve 52,9 dk. olarak belirlenmiştir **(Ficarra vd. 1991)**.

Pieroni vd. (1996) yaptıkları çalışmada, İtalya'da yetişen *Olea europaea* bitkisinin yapraklarından hazırlanan MeOH'lü ekstraktının etil asetat fraksiyonundan 8 tane flavonoit yapısında bileşik izole edilmiş, yapıları ise 1H NMR, 13C NMR, MS ve UV spektroskopi yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır. 600 g yapraktan izole edilen bileşiklerin, apigenol (15 mg), krisoeriol (15 mg), luteolol (290 mg), apigenol-4'-ramnozilglukozit (9 mg), luteolol-4-glukozit (6 mg), krisoeriol-7-glukozit (10 mg), apigenol-7-glukozit (13 mg), luteolol-7-glukozit (290 mg), kersetol-3-ramnozit (6 mg) olduğu belirlenmiştir.

Benavente-Garcia vd. (2000), *Olea europaea* yaprak ekstraktının ve ekstraktın içerdiği fenolik yapılı bileşiklerin antioksidan özelliklerini araştırdıkları çalışmada, yapraklarda, flavon yapısında olan diosmetol ve diosmetol-7-glukozit ile flavanol yapısındaki kateşol bileşiğinin bulunduğunu rapor etmişlerdir .

Olea europaea yapraklarının flavonoit içeriğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, kurutulmuş yapraklar (1g), toz edilmiş ve 100 ml MeOH ile 40ºC'de ultrasonik banyoda 2 saat boyunca muamele edilmiş, bu sürenin sonunda çözücü kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Flavon ve flavonollerin HPLC ile analizi için kuru ekstrakt, suda çözülmüş, 6 M HCl ve EtOH eklenerek geri soğutucu altında 90ºC'de belirli bir süre hidrolizlenmiştir. Elde edilen çözelti soğutulup sonra analizi gerçekleştirilmiştir. C18 kolon ve % 2 fosfat tamponu ile MeOH den oluşan çözücü sisteminin kullanıldığı HPLC analizinde apigenol (28,4 mg/kg), luteolol (277 mg/kg), kersetol (62,4 mg/kg) ve mirsetol (14,30 mg/kg) bileşiklerinin varlığı 367 nm'de saptanmıştır **(Skerget vd. 2005)**.

Meirinhos vd. (2005) yaptıkları çalışmada, 18 farklı Portekiz zeytin yaprağı kültüründen 23 örnekte, ters faz HPLC-DAD sistemi ile sekiz flavanoid bileşik tanımlanmıştır. Luteolin 7-4'-O-diglukozit, luteolin 7-O-glikozit, rutin, apigenin 7-O-rutinozit, luteolin 4-O-glikozit, luteolin, apigenin ve diosmetin tanımlanan ve miktar tayini yapılan bileşiklerdir. Luteolin 7-4'-O-diglukozit ve luteolin 4'-O-glikozit HPLC/DAD/MS-MS-ESI sistemi ile tanımlanmıştır. Çalışılan tüm zeytin yapraklarının profilinde, luteolin 4'-O-glikozit ortak ana bileşik olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bu çalışmada, zeytin yaprağının kimyasal olarak % 6-9 kuru madde oranında oleuropein ve diğer ilgili sekoiridoidlerin varlığı ile karakterize edildiğini, ancak triterpen ve flavanoid gibi diğer bileşik sınıflarının da izole edildiğini bildirmiştir. Zeytin yaprağının gözlenen pek çok aktivitesinin sekoiridoit yapılara atfedilmesine rağmen, birçok araştırmacının yapıdaki diğer bileşiklerinde aktiviteye dahil edilmesi gerektiği sonucuna ulaştıklarını bildirmiştir. Flavanoidlerin zeytin yaprağının belirtilen çok sayıdaki özelliklerinden yani, antioksidan, antihipertansiyon, anti-aterojik, anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-kanserojen, hipoglisemik, hipokolesterolemik, antibakteriyel ve antimantar ve ayrıca en azından sinerjetik etki kısmından sorumlu olabileceği belirtilmiştir.

Goulas vd. (2010) araştırmalarında oleuropein ve türevlerinin bilinen en iyi kaynağı olan zeytin yaprağının, flavonoidler açısından genel radikal süpürücü aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Flavonoid içeriği, kolorimetrik yöntemle tayin edilmiş ve deneyleri kapalı hat ve açık hat HPLC-DPPH • sistemleri ile yapılmıştır. Flavonoid kompozisyonun her bir bileşeni, DAD ve floresan dedektör birleşik sisteminde, RP-HPLC ile değerlendirilip, LC-MS sistemi ile doğrulanmıştır. Araştırmacılar tarafından zeytin yaprağının; zeytin çeşidi, yaprak yaş veya örnekleme tarihi gibi örnekleme parametrelerine bakılmaksızın, flavonoidler için sağlam bir doğal kaynak olduğu bildirilmiştir. Toplam flavonoid miktarı radikal süpürücü aktivite ile değerlendirildiğinde %13-27 miktarında, luteolin 7-O-glukozit baskın flavanoid olarak % 8-25 miktarında katkı sağladığı belirlenmiştir. Luteolinin katkısı ise % 3-13 ile önemli kabul edilmiştir. Bulgular zeytin yaprağının oleuropein ve türevleri hariç, aynı zamanda biyoaktif flavonoidlerin istikrarlı bir kaynağı olduğunu desteklemektedir.

Rambla-Alegre vd. (2011) yaptıkları çalışmada, hidroksitirozolin zeytin yaprağı ekstraktlarından analitik belirlenmesinde; miseller sıvı kromatografi sistemi ve bu sistemde metod olarak C18 kolon, 280 nm dalga boyu, mobil faz olarak 0,05 M, pH 3 SDS (sodyum dodesil sülfat) ve pH 7'de %4 MeOH'lü tampon çözeltisi kullanılmıştır. Hidroksitirozolün amphifilik karakter sergilediği ve en uygun ayırımın %44 MeOH'lü ortamda pH 3,5' da gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir.

2.1.3 Diğer bileşenler

Olea europaea yaprak ve dallarının glusit içeriği, dedektör olarak refraktif indeks dedektör içeren HPLC ile araştırılmış ve bu dokuların sakkaroz, glukoz, galaktoz, fruktoz, glukuronik asit ve mannitol içerdiği saptanmıştır **(Romani vd. 1994)**.

Olea europaea yaprakları üzerinde yapılan başka bir çalışmada İtalya kaynaklı, 6 farklı *Olea europaea* kültür bitkisinin yapraklarının, mevsimsel değişimler gözönünde tutularak alkolde çözünebilir şeker, şeker alkolleri, organik asit, yağ asitleri ve toplam protein değişimleri incelenmiş ve gaz-sıvı kromatografisi sistemi kullanılarak yapraklarda glukoz, sakkaroz ve galaktozun yanında mannitol, inozitol ile eser miktarda rafinoz,

fruktoz, trehaloz ve ksiloz bileşiklerinin bulunduğu belirlenmiştir Aynı çalışmada, yağ asiti bileşimi araştırılmış ve yaprakların doymuş yağ asitlerinden palmitik asit, stearik asit, behenik asit, lignoserik asit, doymamış yağ asitlerinden ise linolenik asit, linoleik asit, oleik asit, palmitoleik asit ve daha az miktarda erusik asit, araşidonik asit ile dokosatetrenoik asit içerdiği saptanmıştır **(Bartolozzi vd. 1999)**.

Olea europaea bitkisinin yaprak ve kökleri üzerinde yapılan bir çalışmada miyo-inozitol, mannitol, glukoz, fruktoz, sakkaroz, galaktoz, rafinoz ve stakinoz bileşiklerinin varlığı, HPAEC-PAD (High Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection) yöntemi kullanılarak saptanmıştır **(Cataldi vd. 2000)**.

İtalya'da üç farklı yerde yetiştirilen *Olea europaea* yapraklarının içerdiği uçucu bileşenlerin belirlenmesi için, taze yapraklar (200 g) 2 saat boyunca Clevenger cihazı kullanılarak distillenmiş ve uçucu bileşikler n-hekzan içinde toplanarak GC ile analiz edilmiştir. Analizler sonucu, farklı yerde yetiştirilen bitkilerin içerdiği uçucu bileşenlerin birbirinden farklı olduğu ve bu şekilde ayrımlarının yapılabileceği sonucuna varılmıştır. Bitkilerin yapraklarındaki majör uçucu bileşikler ise (E,E)-α-farnesen, kongol, teaspiranlar, hekzenal, (E)-β-damaskon, β-karyofilen, nonanal, (E)-2-hekzen-1-ol olarak belirlenmiştir **(Campeol vd. 2001).**

Yapılan çalışmada, İtalya'da üç farklı yerde yetiştirilen *Olea europaea* bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağın kimyasal kompozisyonu GC ve GC-MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Analizlerin sonucunda, her üç kültür formunun da ana bileşenler olarak doymuş ve doymamış nonterpenik aldehitler yanında çok sayıda monoterpen ve seskiterpen içerdiği saptanmıştır. Bitkilerdeki temel bileşikler (E)-2-hekzenal, (E)-2-dekenal, nonanal, (E)-β-damassenon, selin-11-en-4-α-ol, 3- etenilpiridin ve tiaspiran olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada, yüksek oranlarda bulunduğu saptanan alifatik aldehitlerin, özellikle mikrobiyal patojenlere karşı geliştirdiği savunma mekanizmasında önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir **(Campeol vd. 2003)**.

Yapılan bir başka çalışmada ise, *Olea europaea* yapraklarından, daha önce bitkiler aleminde hiç rastlanmamış olduğu belirtilen anhidroalditol yapısındaki 1,5-anhidrolitol'ün izole edildiği rapor edilmiştir **(Campeol vd. 2004)**.

Olea europaea yapraklarından hidrodestilasyon yöntemi ile uçucu yağların toplanıp, GC-MS yöntemi ile analiz edildiği bir başka çalışmada, uçucu yağ bileşimi % 99,23 oranında tespit edilmiş ve 21 bileşik tanımlanmıştır. En bol bulunan bileşenler, α-pinen (%52,70), 2.6-dimetiloktan (%16,57), 2-metoksi-3-isopropilprazin (%6,01), tetrakosan (%4,38) ve dokosan (3,58%) , eser miktarda oluşan bileşenler ß-pinen (% 2,46), Z-3-hekzanol (% 1,51), (E,Z)-2,6-nonadiyenal (%1,45), α-iyonon (%1,45) ve (E)-2-hekzenol (% 1,26) **(Haloui vd. 2010)**.

Bir başka çalışmada Tunus'un (*Neb Jemel, Chemchali* ve *Chemlali*) üç *Olea europaea* L. çeşitinin taze ve kurutulmuş yapraklarından, uçucu fraksiyonların kimyasal bileşimi, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri incelenmiştir. Uçucu bileşenler hidrodestilasyon ile elde edilmiş ve GC-MS ile analiz edilmiştir. Ana bileşenleri (E)-3-heksenol, 3-etenilpiridin, (E)-β-damasenon ve feniletil alkol olarak tespit edilmiş, uçucu yağ fraksiyonunun önemli derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir **(Brahmi vd. 2012)**.

Olea europaea L. yapraklarından yapılan analizde, uçucu yağın toplam % 94,1'ini temsil eden 38 bileşik tespit edilmiştir. Bu uçucu yağın kimyasal bileşimi, palmitik asit (% 14,71), Z-nerolidol (% 9,45), oktakozan (% 6,32), karyofillen oksit (% 4,77), tetrakozan (% 4,06) ve 4- hidroksi-4-metil-2-pentanon (%4,04)'dan oluşmaktadır **(Boukhebti vd. 2015)**.

Brahmi vd. (2015) çalışmasında *Olea europaea* L. yapraklarından elde edilen toplam 32 uçucu bileşikten, 4 alkol, 3 terpenenoid, 14 aldehit, 4 keton, 2 oksijenli monoterpen, 1 oksijenli seskiterpen, 3 doymuş hidrokarbon ve 1 piridin bileşeni tespit edilmiştir. Belirlenen bileşikler, toplam uçucu yağın % 92,1'ini aydınlatmıştır. Çalışılan çeşitlerde kantitatif olarak alkollerin, uçucu bileşenlerin en önemli grubu olduğu bulunmuştur.

Alkollerin en önemli bileşeni ise feniletil alkoldür (% 6,1). Belirlenen ikinci önemli uçucu grup olan aldehitler, nonanal, benzaldehid ve (E)-2-dekenal olarak tespit edilmiştir.

2.2 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarının Sağlık Açısından Önemi

Olea europaea bitkisinin farklı kısımlarının ülkemizde ve yurt dışında kullanımı oldukça yaygındır. İtalya'da yapraklardan hazırlanan dekoksiyonun ateş düşürücü olarak kullanıldığı rapor edilmiştir **(Capasso vd. 1982)**.

Ziyyat vd. (1997), Fas'ta yaptıkları çalışmada, *Olea europaea* yapraklarının halk arasında hipotansif, hipoglisemik, kolagog, anthelmentik, antiseptik olarak, ayrıca ağız hijyeninin sağlanması ve saç dökülmesine karşı etkili olduğunu ve kullanıldığını belirlemişlerdir.

Ülkemizde *Olea europaea* yaprakları ve gövde kabuğundan hazırlanan %5'lik infüzyon, halk arasında iştah açıcı, idrar arttırıcı, kabızlık giderici, ateş düşürücü ve şeker hastalığına karşı kullanılmaktadır. Haricen ise cerahatli yaraların temizlenmesinde ve pansumanında faydalanılmaktadır. Ayrıca yapraklarından hazırlanan dekoksiyon, yüksek tansiyona karşı, vücuttaki yağ bezelerinin yok edilmesi amacıyla, kan şekeri vekolesterol düşürücü olarak kullanılmaktadır **(Baytop 1999)**.

Buna ilaveten, zeytin yaprağı ekstraktının bağırsaklardaki ritim bozukluklarını azaltıp kas kasılmalarını önlediği bilinmekte ve tümör nekrosis faktörünü önleyici etkisinden dolayı alerji tedavisinde kullanımı önerilmektedir **(Nishibe vd. 2001).**

Olea europaea yapraklarından hazırlanan dekoksiyonun halk tıbbında hipertansiyon, aritmi, intestinal kas spazmıı, adrenalin ile ilişkili olarak kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu ve prostat ilekolon kanseri tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca alerjik hastalıklarda kullanımı önerilmiş, anti-diyabetik etkisiile enflamatuar hastalıkların tedavisinde terapötik bir potansiyele sahip olabileceği de belirtilmiştir **(Agalias vd. 2005, Erbay ve İçier 2010)**.

Olea europaea yapraklarından hazırlanan dekoksiyon, yüksek tansiyona karşı, vücuttaki yağ bezelerinin yok edilmesi amacıyla, kan şekerini düşürmek için, kolesterol düşürücü olarak kullanılmaktadır. Meyvelerinden, çekirdeği ile birlikte ezildikten sonra haricen, romatizma tedavisi ile ağrı ve şişliklerin giderilmesinde faydalanılmaktadır **(Tuzlacı 2006)**.

Khan vd. (2007), *Olea europaea* 'nın geleneksel kullanımında diüretik, hipotansif, yumuşatıcı, müshil, ateş düşürücü ilaç ve cilt temizleyici, etki gösterdiğini ve aynı zamanda üriner enfeksiyonlar, safra taşı, bronşiyal astım ve ishal tedavisinde kullanıldığını bildirmiştir.

Zeytin yaprağından elde edilen ekstraktın kalp damarlarındaki kanın akışını arttırdığı, kanın pıhtılaşmasını düzenlediği, kan dolaşımını rahatlattığı ve bundan dolayı kalp rahatsızlıklarını ve krizlerini önleyici etkiye sahip olduğu aynı zamanda düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu engelleyerek kalp-damar hastalıklarının önlenmesinde etkin olduğu ve adrenalin üzerine etki ederek kan basıncını düzenleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir **(Singh vd. 2008)**.

El ve Karakaya (2009), zeytin yapraklarından izole edilen oleuropein, hidroksitirosol ve tirosol gibi polifenollerin biyoyararlanım ve etki mekanizmalarını tam açıklayacak, yeterli veri olmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte oleuropeinin büyük bir molekül ve düzlemsel konfigürasyonda olması nedeniyle zayıf emilimi olduğu bilinmektedir. Ayrıca; oleuropein glikosit formunda olması sebebiyle ince bağırsak epitel hücreleri üzerinde bulunan, sodyum-bağımlı glikoz taşıyıcısı (SGLT1) gibi bir glukoz taşıyıcı potansiyelindedir. Bu sayede hücreler içine giriş sağlayıp, erişebilir olduğu farzedilmektedir.

Kendall vd. (2012); zeytin yaprağı takviyesinin akut ve kronik alımını takiben biyofenollerin vücuttan idrarla atılımının rastgele seçimli, kontrollü çalışmasında, genç erişkinlere 28 gün boyunca günlük 3 doz zeytin yaprağı takviyesi verilmiştir. Ekstraktın temel bileşeni olan oleuropein ve metabolitlerinin analizleri HPLC, LC-MS ve LC-QTOF-MS sistemleri kullanılarak yapılmış, zeytin yaprağı biyofenolleri metabolizma

son ürünlerinin idrar atılımı sonrası ölçümlerinde, ne oleuropeine ne de hidroksitirozele rastlanmadığı vurgulanmıştır. Ancak akut ekstrakt ağızdan alımını takiben 6 saat içinde, bütün idrar örneklerinde oleuropein aglikondan türevlenen glukuronik asit konjugatları tespit edilmiştir. Bu veriler oleuropeinin biyoaktivite için gerekli ön koşul sağladığını yani biyoyararlanılabilir olduğunu göstermektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Olea europaea* yapraklarının hipotansif, koroner dilatatör, antiaritmik, antioksidan, antikomplementer, antimikrobiyal, antiviral, antitümör-anti kanser ve anti-HIV etkileri belirlenmiştir. Yapraklarda majör olarak bulunan ve bir sekoiridoit olan oleuropeinin ise antienflamatuar, hipoglisemik, antioksidan, antimikrobiyal, antimikoplazmal, antiviral, nöro-koruyucu, antitümör aktiviteleri yine yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Yurtdışında bitkinin yapraklarından hazırlanan ve oleuropeine göre standardize edilmiş pek çok tıbbi preparat bulunmasına rağmen ülkemizde böyle bir preparat bulunmamaktadır.

2.3 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarının Farmakolojik Etkileri

2.3.1 Antihipertansif etki

Riberio vd. (1986), yaptıkları çalışmada hipertansif olan sıçanlar üzerinde, *Olea europaea*'nın da içerisinde bulunduğu 32 bitkinin antihipertansif etkisi incelenmiştir. Taze *Olea europaea* yapraklarının EtOH-su (50:50 v/v) içinde %5'lik çözeltisi hazırlanmış, karıştırıcıda homojenize edilerek 3-7 gün bekletildikten sonra süzülüp 1/3'ü kalana kadar yoğunlaştırılmış ve uygulama öncesi EtOH'ü tamamen uçurulan ekstrakt, oral olarak hipertansif sıçanlara 40 ml/kg dozda verildiğinde, ekstraktın kan basıncını düşürdüğü gözlenmiştir.

Cherif vd. (1996), yaptıkları klinik çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan sulu ekstraktın antihipertansif etkisi, hipertansiyon rahatsızlığı olan iki grup hasta üzerinde araştırılmıştır. 15 günlük plasebo tedavisinden sonra, *Olea europaea* yapraklarının sulu ekstraktı hastalara, 3 ay boyunca günde dört kez, 400 mg'lık dozda

verilmiştir. Tedavi sonucu her iki gruptaki hastaların kan basıncında anlamlı bir düşüş gözlenirken herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır.

Khayyal vd. (2002), yaptıkları bir başka çalışmada, % 80'lik EtOH ile ekstrakte edilip patentli bir prosedürle saflaştırılan ve EFLA 943 ismi verilen *Olea europaea* yaprak ekstraktının kan basıncını düşürücü etkisi, NG-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ile indüklenen hipertansif ratlar üzerinde araştırılmıştır. 4 hafta boyunca, oral olarak günlük 50 mg/kg'lık dozda L-NAME verilerek hipertansif hale getirilen ratlar, sonraki 4 hafta boyunca L-NAME ile eş zamanlı olarak EFLA 943 ile beslenmiştir. EFLA 943, 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg'lık dozlarda denenmiş ve 100 mg/kg'lık dozda L-NAME ile indüklenen kan basıncı artışını tamamen yok ettiği gözlenmiştir.

Somova vd. (2003) yaptıkları bir çalışmada, Afrika'da yetişen *Olea europaea subsp. Africana* yapraklarından izole edilen oleuafriceinin (1:1 oleanolik ve ursolik asit karışımı), Yunanistan ve Kuzey Afrika'da yetişen *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan etil asetatlı ekstraktların ve oleanolik asit ile ursolik asitin, tuza duyarlı ve insüline dirençli ratlar üzerindeki antihipertansif etkileri araştırılmıştır. Deney sonucu, tedavi edilmeyen ratlarda kendiliğinden hipertansiyon geliştiği ve kalp ritm hızının anlamlı olarak attığı gözlenirken, 4 hafta boyunca günde 60 mg/kg dozda test numuneleri enjekte edilen ratlarda, tüm numunelerin hipertansiyon gelişimini önlediği ve belirgin bradikardi oluşturduğu belirtilmiştir.

2.3.2 Antihiperglisemik etki

Somova vd. (2003) yaptığı çalışmada, tuza duyarlı ve insüline dirençli ratların, 4 hafta boyunca, oleuafrisein, oleanolik asit, ursolik asit ile *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan etil asetatlı ekstraktların, günde 60 mg/kg doz ile tedavi uygulanmayan sıçanlarda gelişen, % 26'lık kan glukoz seviyesindeki artışı, düzenlediği tespit edilmiştir.

Olea europaea yapraklarından izole edilen oleuropeinin hipoglisemik etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 850-1000 g ağırlığındaki 3 grup erkek tavşandan, birinci

grup sağlıklı hayvanlardan, ikinci grup tedavi almayacak olan diyabetli hayvanlardan ve üçüncü grup oleuropein verilecek diyabetli tavşanlardan oluşturulmuştur. Tavşanların diyabetli hale getirilmesi 150 mg/kg dozda alloksan enjeksiyonuyla sağlanmıştır. 16 hafta boyunca ikinci gruptaki diyabetli tavşanlara plasebo tedavi uygulanırken, üçüncü gruptaki tavşanlar günlük 20 mg/kg oral dozda oleuropein ile tedavi edilmiştir. 16 haftanın sonunda, oleuropein verilen tavşanlarda kan glukoz seviyesinde anlamlı düşüş gözlenirken kontrol grubundaki diyabetli tavşanlarda böyle bir düşüşe rastlanmamıştır **(Al-Azzawie ve Alhamdani 2006)**.

Jemai vd. (2009) çalışmasında, zeytin yaprağı, oleuropein ve hidroksitirozolün antidiyabetik ve antioksidan aktiviteleri test edilmiştir. Diyabetli Wistar ratları, alloksanın intraperitoneal enjeksiyonu ile uyarılmıştır. Tiyobarbitürik asit reaktif maddesi (TBARS) ile karaciğer ve serum antioksidan sistemin bileşenleri, glukoz, kolesterol ve hepatik glikojen incelenmiştir. Diyabetik ratlar; hiperglisemi, hiperkolesterolemi, lipid peroksidasyonu artışı ve antioksidan enzim aktivitesinde azalma göstermiştir. Araştırmada ratlara 4 hafta boyunca, her bileşik 8 ve 16 mg/kg vücut ağırlığı ölçüsünde olacak şekilde oleuropein ve hidroksitirozolce zengin ekstraktların uygulanması ile serum glukoz ve kolesterol seviyelerinin azaldığı ve antioksidan düzensizliklerinin onarıldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak, oleuropein ve hidroksitirozolün antidiyabetik etkisinin, yaygın diyabet patolojileri ve komplikasyonları ile ilişkili oksidatif stresi frenleyici antioksidan faaliyetleri nedeniyle olabileceği ileri sürülmüştür.

2.3.3 Antioksidan etki

Tutour ve Guedon (1992)'ın yaptıkları çalışmada, *Olea europaea* yapraklarının MeOH'lü ekstraktının içerdiği bileşiklerden oleuropein, hidroksitirozol ve tirozolün antioksidan aktiviteleri, metil linoleatın 2,2'-azo-bis-izobutironitril ile indüklenen oksidasyonunu geciktirme güçleri saptanarak araştırılmıştır. İndüksiyon periyotunun genişletildiğinde MeOH'lü ekstraktda, oleuropein ve hidroksitirozolün etkisi bilinen antioksidanlar olan BHT ve vitamin E'ye göre daha yüksek bulunurken tirozolün, antioksidan veya pro-oksidan aktivite göstermediği saptanmıştır. En yüksek aktivite ise ekstraktda gözlenmiştir.

Visioli vd. (1998)'nin çalışmasında, oleuropein ve hidroksitirozolün DPPH radikali, süperoksit anyon oluşumu, solunum patlaması ve hipoklöröz asit oluşumu üzerindeki süpürücü aktiviteleri araştırılmıştır.Hidroksitirozol ve oleuropeinin $2,6.10^{-7}$M ve $3,63.10^{-5}$M olarak belirlenen, EC_{50} değerleri ile standart antioksidanlar olan BHT ($EC_{50}=1,05.10^{-4}$ M), vitamin C ($EC_{50}=1,31.10^{-5}$ M) ve vitamin E ($EC_{50}=5,04.10^{-6}$ M)'den yüksek veya onlarla kıyaslanabilir oranda radikal süpürücü aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca her iki bileşiğin de solunum patlamasını doza bağlı olarak önlediği, süperoksit anyon ve hipoklöröz asiti süpürücü etkileri olduğu saptanmıştır.

Benavente-Garcia vd. (2000) yaptıkları çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktının ve ekstraktın içerdiği fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, $ABTS^{+}$ radikali kullanılarak araştırılmıştır. Standart antioksidan olarak troloksun kullanıldığı çalışmada en yüksek aktiviteyi rutozitin gösterdiği ve bunu sırasıyla kateşol, luteolol, yaprak ekstraktı, hidroksitirozol, diosmetol, kafeik asit, verbaskozit, oleuropein, luteolol-7-glukozit, vanilik asit, diosmetol-7-glukozit, apigenol-7-glukozit, tirozol ve vanillinin takip ettiği belirtilmiştir.

Gutierrez vd. (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmada, rat karaciğer mikrozomlarının enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu üzerine tirozol, hidroksitirozol ve oleuropein etkisi araştırılmıştır. İn-vitro olarak gerçekleştirilen deneyde, ratların karaciğerlerinin mikrozomal fraksiyonu, oleuropein ve hidroksitirozol bileşikleri varlığında ve bu bileşik bulunmadan askorbat-Fe^{+2} karışımı ile inkübe edilmiş ve kemiluminesans değerleri ölçülmüştür. Hidroksitirozol ve oleuropein varlığında kemiluminesans değerinde fazla artış görülmezken, tirozol varlığında bu değerin arttığı saptanmıştır. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunun önlenmesinde hidroksitirozolün, oleuropeine göre 6 kat fazla etkili olduğu, tirozolün ise etki göstermediği belirlenmiştir.

LDL, kanda kolesterol transferi yapan bir lipoproteindir ve okside formları agrege olan trombositlerle birlikte aterom plaklarının gelişmesinde rol oynar. Yapılan in-vitro çalışmada, oleuropeinin, 10 µM konsantrasyonda LDL oksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir **(Andrikopoulos vd. 2002)**.

2002 yılında yapılan bir başka çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından EtOH/H_2O (1:1) karışımıyla elde edilen liyofilize ekstraktın antioksidan etkisi DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür) radikali kullanılarak araştırılmış ve ekstraktın antioksidan etkisi olduğu belirlenmiştir **(Briante vd. 2002)**.

Olea europaea yaprakları, meyvesi ve meyve sıkıldıktan sonra kalan posa, EtOH'le ekstrakte edildikten sonra serbest fenoller, çözünebilir fenolik esterler ve serbest olmayan fenolik asitler içeren 3 fraksiyona ayrılmış ve bu fraksiyonların ayçiçeği yağının stabilitesi üzerine etkileri, BHT ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Serbest fenolleri içeren fraksiyonun, ayçiçek yağının stabilizasyonunun sağlanmasında, en yüksek antioksidan etkiyi gösterdiği, bu etkinin BHT'nin etkisinden de yüksek olduğu belirlenmiştir. Esterleşmiş ve serbest olmayan fenolik asitleri içeren fraksiyonlarda ise antioksidan etkinin çok düşük olduğu saptanmıştır **(Farag vd. 2003)**.

Somova vd. (2003)'nin, tuza duyarlı ve insüline dirençli sıçanlar üzerinde yaptıkları deneyde, ursolik asit, oleanolik asit, oleuafricein (1:1) ursolik asit ve oleanolik asit karışımı) ile Afrika ve Yunanistan kaynaklı *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan etil asetatlı ekstraktların, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim miktarını tedavi görmeyen ratlardakine göre %22 ve %24 oranında azaltarak antioksidan etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Olea europaea yapraklarından MeOH ile elde edilen ekstraktın ve içerdiği flavonoit yapısındaki bileşiklerin antioksidan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ayçiçek yağının peroksit değerinin tayini ve β-karoten ve linoleik asitten meydana gelen sulu emülsiyon sisteminde oluşan oksidasyonun tayini olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Yaprak ekstraktsıı yağda çözünmediği için peroksit sayısının tayini sadece saf flavon ve flavonol bileşiklerine uygulanabilmiştir. Ayçiçek yağının oksidasyona karşı korunabilmesinde sadece mirsetol etkili olurken, kersetol, luteolol, kemferol ve apigenin'in pro-oksidatif etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca flavanoit bileşiklerinin antioksidan etkilerinin yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısı ile doğru orantılı olduğu, hidroksil gruplarının sayısı arttıkça antioksidan etkilerinin arttığı belirtilmiştir. Emülsiyon sisteminde ölçülen antioksidan aktivite çalışmalarında ise, β-karoten'in

oksidasyonunu sadece apigenin'in arttırdığı, kersetol, mirsetol, kemferol ile *Olea europaea* yaprak ekstraktının oksidasyonu inhibe ettiği saptanmıştır. Buna dayanılarak 3. konumda serbest hidroksil grubu taşıyan flavanoitlerin emülsiyon sisteminde antioksidan etki gösterdikleri sonucuna varılmıştır **(Skerget vd. 2005)**.

Diabetes mellitus'lu hastalarda, oksidatif stres ve serbest radikal çokluğuna bağlı olarak retinopati, nefropati ve nöropati gibi komplikasyonların görülebildiği ve antioksidanlarla tedavi sonucu bu hastalıklarda gözlenen komplikasyonların azaltılabildiği bilinmektedir. *Olea europaea* yaprak ekstraktının temel aktif bileşiği olan oleuropeinin alloksanla indüklenen diyabetli tavşanlardaki antioksidan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 3 aylık erkek tavşanlar, intra-venöz olarak 150 mg/kg dozda alloksan verilerek diyabetli hale getirilmiş ve 16 hafta boyunca günlük oral 20 mg/kg oleuropein ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonucu, plazma ve eritrosit malondialdehit (MDA) seviyesi ile enzimatik ve non-enzimatik antioksidan miktarlarının normal seviyelerine ulaştığı görülmüştür. Tedavi edilmeyen grupta ise oksidatif stres markerı olan MDA ve antioksidan parametrelerinde (glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, α-tokoferol, askorbik asit, β-karoten) kalıcı değişiklikler gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak,oleuropein kullanımının, oksidatif strese bağlı diyabetik komplikasyonlardan korunmada avantajlı olabileceği sonucuna varılmıştır **(Al-Azzawie ve Alhamdani 2006)**.

Jemai vd. (2008) yaptıkları çalışmada, zeytin ağacının yapraklarından saflaştırılmış doğal bileşik hidroksitirozol ve triasetillenmiş hidroksitirozolün lipid düşürücü ve antioksidan etkileri karşılaştırılarak test edilmiştir. Wistar ratlarına 16 hafta boyunca, standart laboratuar diyeti ve/veya kolesterol açısından zengin bir diyet uygulanmıştır. Serum lipid düzeyleri, tiyobarbitürik asit reaktif maddesi (TBARS) seviyesi (lipid peroksidasyonunun göstergesi) ve süperoksit dismutaz (SOD) yanısıra katalaz (CAT) aktivitesi ölçülmüştür. Kolesterol açısından zengin bir diyetten kaynaklı, toplam kolesterol (TC), trigliserit (TG) ve düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-C) yükselmesi, hiperkolesterolemiyi indüklemiştir. Hidroksitirozol ve triasetillenmiş hidroksitirozolün (3 mg/kg vücut ağırlığı) uygulanması belirgin şekilde TC, TG ve LDL-C serum seviyelerini azaltmış ve yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-C) serum seviyesini artırmıştır. Ayrıca, kolesterol açısından zengin bir diyetle beslenen

farelere hidroksitirozol, triasetillenmiş hidroksitirozol türevlerinin oral yolla uygulanması, karaciğer, kalp, böbrek ve aortta TBARS içeriğini önemli ölçüde azalmıştır. Buna ek olarak, triasetillenmiş hidroksitirozol ve hidroksitirozol'ün karaciğerde CAT ve SOD aktiviteleri artmıştır. Bu sonuçlardan triasetillenmiş hidroksitirozol ve hidroksitirozolün hipolipidemik etkisinin, lipid peroksidasyonunun sürecini engelleyen antioksidan faaliyetlerinin yanı sıra, serum TC, TG, LDL-C seviyelerinin düşmesine bağlı olabileceği öne sürülmüştür.

2.3.4 Antimikrobiyal etki

Bisignano vd.(1999) yaptığı çalışmada, *Olea europaea* bitkisinin majör bileşiklerinden olan oleuropein ve hidroksitirozolün in-vitro antimikrobiyal etkileri standart ATCC bakteri türleri (*Haemophilus influenza, Moraxella catarrhalis, Salmonella typhi, Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus*) ve klinik izolatlar (*Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Salmonella* türleri, *Vibrio cholerae, Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus*) üzerinde araştırılmıştır. Hidroksitirozolün MIC değerleri, ATCC bakterileri için 0,24-7,85 µg/ml, klinik izolatlar için 0,97-31,25 µg/ml olarak saptanırken olöropein için MIC değerleri ATCC bakterilerinde 62,5-500 µg/ml, klinik izolatlarda ise 31,25-250µg/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca, oleuropeinin *Haemophilus influenza* ve *Moraxella catarrhalis*'e karşı etkili olmadığı görülmüştür. Çalışmada referans olarak ampisilin ve eritromisin kullanıldığı belirtilmiştir.

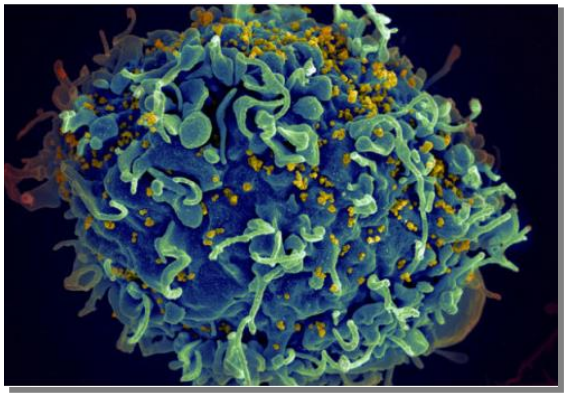
Furneri vd. (2002) çalışmasında, oleuropeinin *Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma pneumoniae* ve *Mycopasma pirum*'a karşı etkisi in-vitro olarak incelenmiştir. Oleuropeinin tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu saptanmış, *Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma pneumoniae* ve *Mycopasma pirum*'a karşı MIC değerleri sırasıyla 20, 20, 160 ve 320 mg/L olarak belirlenmiştir. Antimikoplazmal etkiden, oleuropeinin yapısında bulunan o-difenol grubunun sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

2003 yılında yapılan bir çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan sulu ekstraktın antimikrobiyal etkisi, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,*

Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Klebsiella pneumoniae bakterileri ve *Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis, Tricohophyton rubrum* ile *Candida albicans* mantarlarına karşı araştırılmıştır. Çalışmalar sonucu, *B.subtilis* dışındaki tüm bakterilerin 3 saat içinde % 0.6 (g/mL)'lık yaprak ekstraktıyla öldüğü, *B. subtilis* inhibisyonunun ise % 20 (g/mL)'lik ekstrakt ile 24 saatte gerçekleştiği görülmüştür. Bakteriler için MIC değerleri, *P.aeruginosa, K. pneumoniae, E. coli* ve *S. aureus* için sırası ile % 0,13 , 0,3 , 0,3 , 0,6 (g/ml) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ekstrakt ile 24 saat inkübasyon sonucu test edilen tüm mantarların öldüğü gözlenmiştir. MIC değerleri, *C. albicans, M. canis, T. mentagrophytes* ve *T. rubrum* için sırasıyla % 15 1,25 , 1,25 , 1,25 (g/mL) olarak saptanmıştır **(Markin vd. 2003)**.

Del Rio ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, İspanya'da yetişen *Olea europaea* bitkisinin yaprakları, dalları, dal kabuğu, kökleri ile dalların öz kısmından dimetilsülfoksit ile hazırlanan ekstraktların antifungal aktiviteleri, *Phytophthora* türlerine karşı araştırılmıştır. Mantar gelişiminin önlenmesinde, dallardan, köklerden, yapraklardan, dal kabuklarından ve dalların öz kısmından hazırlanan ekstraktların sırasıyla % 61, % 61, % 50, % 61 ve % 55 oranında inhibisyon yaptığı saptanmıştır. Bu ekstraktlarda bulunan etkili bileşiklerin IC_{50} değerleri ise tirozol, kateşol ve oleuropein için sırasıyla 2,7 ± 0,3; 3,3 ± 0,2 ve 4,0 ± 0,2 g/L olarak belirlenmiştir **(Del Rio vd. 2003)**.

Olea europaea yapraklarından hazırlanan sulu ekstraktın anti-HIV etkisinin araştırıldığı in-vitro çalışmada, sulu ekstraktın HIV-1 akut aktivitesinin enfeksiyonunu ve replikasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği, enfekte olmayan hücrelerde ise herhangi bir toksik etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada bitkinin yapraklarından hazırlanan sulu ekstraktın, AIDS hastaları tarafından immün sistemin kuvvetlendirilmesi, kronik yorgunlukların giderilmesi, anti-HIV tedavisinin etkilerine yardımcı olmak amacıyla, ayrıca HIV ile bağlantılı Kaposi's sarkomasında ve HSV enfeksiyonlarında kullanılmaya başlandığı rapor edilmiştir **(Lee-Hung vd. 2003).**



Şekil 2.1 HIV-1 füzyon proteini gp41 için kullanılan zeytin yaprağı ekstraktı ile bağlanmalarını gösterir SEM görüntüsü

2005 yılında yapılan bir çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan ekstraktın ve onun majör bileşeni olan oleuropeinin, özellikle genç balıklarda sistemik hastalıklar ve hemorajik lezyonlar oluşturarak % 90 oranında ölüme neden olan Viral Hemorajik Septisemi Rabdovirüs (VHSV)'üne karşı etkisi araştırılmıştır. Hem yapraklardan hazırlanan ekstraktın hem de oleuropein'in, VHSV'nin etkisini in-vitro olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Virüsün enfeksiyondan önce ekstrakt veya oleuropein ile inkübe edilmesi sonucu viral hastalığın bulaşıcılığının % 10 ve % 30 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca ekstraktın, doza bağlı olarak virüsidal etki gösterdiği saptanmıştır. Yine aynı çalışmada, oleuropein'in herpes mononucleosis (Epstein-Barr virüsü), hepatit virüsü, rotavirus, bovine rhinovirus, canine parvovirus, feline leukaemia virüs, respiratuar sinsityal virüs ve parainfluenza tip 3 virüsüne karşı potansiyel antiviral aktivite gösterdiğinin çeşitli araştırıcılar tarafından saptandığı belirtilmiştir **(Micol vd. 2005)**.

Pereira vd. (2007) yaptıkları bir çalışmada, toz haline getirilmiş zeytin yapraklarının sulu ekstraktında bulunan fenolik bileşikler, HPLC/DAD kullanarak analiz edilmiş ve antimikrobiyel özellikleri incelenmiştir. Elde edilen ekstraktın farklı derişimlerinin mikroorganizmalar üzerindeki inhibe edici etkisi incelendiğinde, değişim sırası ile; *Bacillus cereus ~ Candida albicans > Escherichia coli > Staphylococcus aureus > Cryptococcus neoformans ~ Klebsiella pneumoniae ~ Pseudomonas aeruginosa > Bacillus subtilis* olarak bulunmuştur.

Sudjana vd. (2009) yaptıkları çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan ticari bir özütün geniş bir yelpazede (n=122) mikroorganizmalara karşı aktivitesi araştırılmıştır. Agar dilüsyon ve mikrodilüsyon teknikleri kullanılarak yapılan çalışmada zeytin yaprağı ekstraktının *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus'* a (metisilin-duyarlı *S. aureus* (MRSA) içeren) karşı oldukça aktif olduğu ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) % 0,31-0,78 (v/v) olarak bulunmuştur. Buna karşın zeytin yaprağı ekstraktı diğer (n=79) test organizmalarına karşı çok az aktivite göstermiş ve MIC değerleri % 6,25- % 50 (v/v) aralığında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, zeytin yaprağı ekstraktı sadece *H. pylori, C. jejuni, S. aureus* ve MRSA karşı kayda değer aktivite göstermiş ve etkisinin geniş spektrumlu olmadığı belirlenmiştir. Bu spesifik aktivite göz önüne alındığında, zeytin yaprağı ekstraktının seçici olarak *H. pylori* ve *C. jejuni* düzeylerini azalttığı, mide florasının bileşimini düzenleyen bir role sahip olabileceği belirtilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından elde edilen fenolik bileşiklerin tümünün birlikte gösterdiği antimikrobiyel etkinin, saf haldeki oleuropeinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Araştırıcılar, zeytin yaprağının EtOH'lü ekstraktındann elde ettikleri fenolik bileşikler ile oleuropeinin antioksidan ve antimikrobiyel etkisini inceledikleri çalışmalarında, oleuropeinin *Salmonella enteritidis*'e karşı güçlü bir inhibe edici etkiye sahip olduğunu ve zeytin yaprağından elde edilen fenolik karışımın (oleuropein, rutin, vanilin ve kafeik asit) sinerjetik etki göstererek, *Salmonella enteritidis*'e ek olarak *Bacillus cereus*'a karşı da antimikrobiyel etki gösterdiğini saptamışlardır **(Lee ve Lee, 2010)**.

2.3.5 Antitümör ve antikanser etki

2005 yılında yapılan bir çalışmada, toksik olmadığı belirtilen oleuropein bileşiğinin farelerde *in-vivo* olarak, antitümör etki gösterdiği, insan tümör hücrelerinin çoğalmasını ve yayılımını ise inhibe ettiği saptanmıştır. Kendiliğinden yumuşak doku sarkomaları geliştiren fareler üzerinde yapılan deneyde, farelerin içme suyuna % 1 oranında katılan oleuropeinin, tümör iyileşmesi geliştirdiği ve 9-12 gün içinde 11 fareden 10 tanesinde tamamen, 1 tanesinde ise kısmen iyileşme sağladığı gözlenmiştir. *in-vitro* insan tümör

hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ise oleuropeinin, hücre gelişimini ve yayılımını inhibe ettiği belirlenmiştir. Oleuropeinin yapısında bulunan glukoz molekülü kaldırıldığı zaman antiproliferatif etkinin azaldığı saptanmıştır **(Hamdi ve Castellon 2005)**.

Han vd. (2009) çalışmasında, zeytin yaprağının ana bileşeni olan oleuropein ve hidroksitirozolün, çoğalma (MTT ölçümü), hücre canlılığı (Guava Via Count ölçümü), hücre apoptosis, hücre döngüsü (flow sitometri) analizleri kullanılarak, MCF-7 insan göğüs kanseri hücrelerinin gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Oleuropein ve hidroksitirozolün, hücresel apoptoza neden olan MCF-7 hücrelerinde, hücre canlılığını azalttığı, hücre gelişimini ve yayılımını inhibe ettiği rapor edilmiştir. MTT analizleri, 200 µg/ml oleuropein veya 50 µg/mL hidroksitirozolün farkedilir derecede MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. Hücre apoptozu indüklenmesi ve hücre çoğalması oranının inhibisyonu ile MCF-7 hücrelerinin sayısındaki azalma oleuropein veya hidroksitirosol tarafından sağlanır. Ayrıca hidroksitirozol ve oleuropein G1 için, G0/G1 fazında hücre sayısı artışıyla kendini gösteren S faz geçişi ile istatistiksel olarak anlamlı bir blok sergilemiştir.

Fu vd. (2010) çalışmasında terazolyum tuz (MTT) ölçümlerine dayanan, insan tümör türevi hücrelerinin gelişimine zeytin yaprağı ekstraktının etkisi belirlenmiştir. Bu çalışmada zeytin yaprağı ekstraktında mevcut sekoiridoit ve flavanoitlerin önemli izomerlerinin teşhisi ve ekstraktın kesin profili belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktlarının in-vitro koşullarda üç meme kanseri modelinin metabolik durumu ile doza bağlı inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bouallagui vd. (2011) yaptıkları çalışmada zeytin yaprağının, majör polifenolleri oleuropein ve hidroksitirozole bağlı olarak, hipertansiyon, karsinogenaz, diyabet aterosklerok gibi sorunların tedavisinde terapatik olarak kullanıldığı belirtilmiş ve zeytin yaprağının anti-tumoral aktivite potansiyeli incelenmiştir. MTT ve nötral kırmızı test kullanılarak MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı in-vitro sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksite ölçüm sonuçları, MCF-7 hücrelerinin doza bağlı inhibe olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar tarafından zeytin yaprağı ekstraktının kanser önleyici bir gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir olduğu belirtilmiştir.

Bulotta vd. (2011), zeytin yaprağı ekstraktlarının polifenollerin tabii bir kaynağı olduğunu, özellikle oleuropeinin insan sağlığı için potansiyel olarak geniş bir aralıkta yararlı olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada, iki meme kanseri hücresi hatlarına karşı, 'yeşil kimyasal' tanımlaması ile elde edilen bazı oleuropein perasetile türevlerinin, anti-tümöral faaliyetlerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. MCF-7 ve T-47D hücreleri, oleuropein, perasetile oleuropein, perasetile aglikonu ve perasetile hidroksitirozol ile muamele edilmiş, büyüme ve canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Antioksidan etkiler, hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra analiz edilmiştir. Perasetile bileşikler, hücre döngüsü ilerlemesinde tutuklanma ile oleuropeinden daha yüksek antiproliferatif etki göstermiş, bu etki güçlü bir antioksidan aktivite ile birleşmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada, bir zeytin üretim ürünü olan zeytin yaprağının perasetilasyon ile elde edilebilen oleuropeinin kimyasal türevleri için değerli bir kaynak olduğunu, insan sağlığı için yararlı özellikler sağlayabileceğini belirtmiştir.

Farklılaşma tedavisi, geri döndürülebilir tümör ve kanser hücrelerindeki tekrar çalıştırılabilir endojeniz farklılaşma programlarını aktive etmeyi amaçlayan, ilginç bir yaklaşımdır. **Samet vd. (2014)** çalışmasında, zeytin yaprağı ekstraktında bilinen antioksidan aktivitenin, çeşitli kanser hücrelerindeki apoptisisi teşvik ettiği gösterilmiştir. Ancak farklılaşmayı uyaran özellikler ve ilgili mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada çok yetili K562 lösemi hücrelerinin üzerinde, zeytin yaprağı ekstraktının potansiyel farklılaşma etkisi incelenmiştir. Sonuçta zeytin yaprağı ekstraktının K562 hücrelerinin tomurcuklanarak üremesini ve G0/G1 için hücre döngüsünde ve tedavi süreci aşımında G2/M fazında, K562 hücrelerinin çoğalmasını engellediği bulunmuştur. Analizlerle zeytin yaprağı ekstraktının K562 hücreleri boyunca monocyte kökeninde farklılaşmayı ve apoptozu teşvik ettiği ortaya çıkarılmıştır. Mikrodizi analizi, zeytin yaprağının farklılaşmayı teşvik ettiği etkisinin altında yatan mekanizmayı anlamak amacı ile kullanılmış ve IFI16, EGR1, NFYA, FOXP1, CXCL2, CXCL3ve CXCL8 gibi farklılaşması açıklığa kavuşan genler, K562 hücreleri için monocyte/makrofaj kökenin bağlantısını onaylamıştır. Bu çalışma apoptoza ek olarak kanser hücrelerinde, zeytin yaprağının muhtemel iyileştirici etkilerinden birinin farklılaşmayı indükleyici etkisi olduğuna kanıt sunmaktadır.

Doz ve etki mekanizması çeşitli kanser hücrelerinde araştırılmış olan zeytin yaprağının majör etken maddesi oleuropeinin, SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında, hücre proliferasyonuna, invazyonuna ve koloni oluşumuna etkisi, hücre siklusu, sağkalımı veya ölümü ile ilişkili hangi mekanizmalarla etki gösterdiği ve bu yolaklardaki gen ve protein düzeyindeki ekspresyon değişimlerini araştırıldığı çalışmada, oleuropeinin nöroblastoma hücre hattında terapötik etkinliğinin olduğu ve bu etkinliğin altında yatan moleküler mekanizmalar belirlenmiştir. Oleuropein SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde; hücre proliferasyonunu azalttığı, IC_{50} dozunun 48.saate 350µM olduğu, hücre proliferasyonunu, hücre döngüsünde Siklin D1/CDK4/CDK6 yolağındaki genlerin ekspresyonlarını down regüle edip p53 ve p21'in genlerinin ekspresyonunu upregüle ederek durdurduğu bulunmuştur. Tunel testi yöntemi ile apoptotik etkinlik teyit edildiğinde, oleuropein muamele edilen grupta apoptotik etkinliğini BAX/BCL-2 oranını değiştirerek kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün upregülasyonunu indükleyerek, gösterdiği tespit edilmiştir. Oleuropeinin hücre invazyonun ve koloni oluşumunun azaltılmasında da etkili olduğu gösterilmiştir **(Seçme 2014)**.

2.3.6 Antienflamatuar etki

Pieroni vd. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, İtalya'da yetişen *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan MeOH'lü ekstraktın ve bu ekstraktın etil asetat fraksiyonunun içeriğinin, klasik yolağını güçlü biçimde inhibe ederek antienflamatuar etki gösterdiği saptanmıştır. Etil asetatlı fraksiyondan izole edilen 8 flavonoit içinden luteolol, apigenol, luteolol-7-glukozit ve apigenol-7-glukozitin etkiden sorumlu temel bileşikler olduğu bildirilmiştir.

2.3.7 Enzimler üzerine etki

Hepatik mikrozomal sitokromlar olan Sitokrom P450 enzimleri, endojen bileşiklerin ve ksenobiyotiklerin metabolizması için önemlidir. İnsan Sitokrom P450 3A enzimleri ise birçok ilacın ve lipoproteinin oksidasyonunda yer alan önemli katalistlerdir. Stupans ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, oleuropeinin Sitokrom P450 3A belirleyicisi

olan androstenedion 6β-hidroksilaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir **(Stupans vd. 2000)**.

Yine Stupans ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, oleuropeinin aynı zamanda Sitokrom P450 3A enziminin mekanizmaya dayalı inaktivasyonunda etkili olduğu belirlenmiştir. Oleuropeinin, LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin bu aktiviteden ileri gelebileceği, ayrıca ilaçlarla birlikte oleuropein alınımının bu ilaçların metabolize edilmesini geciktirebileceği ve tedavide olumsuz etkiler yaratabileceği rapor edilmiştir **(Stupans vd. 2001)**.

2.3.8 Hormonlar üzerine etki

Yapılan bir çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından elde edilen liyofilize ekstraktların tiroid ve/veya hipofiz bezi üzerine etkisi, sıçanlar üzerinde in-vivo olarak araştırılmıştır. Sıçanlar 4 gruba ayrılmış, kontrol grubuna 14 gün boyunca günlük oral dozda distile su, 2. gruba 100 µg, 3. gruba 250 µg, 4. gruba ise 500 µg dozda yaprak ekstraktı verilmiştir. 14 günün sonunda sıçanlardan kan örnekleri alınarak serum TSH (Tirotropik Hormon), T4 (Tiroksin) ve T3 (Triiyodotironin) seviyeleri araştırılmıştır. Serum TSH seviyesinin, kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı, T3 seviyesinin ise anlamlı biçimde arttığı görülmüştür. T4 seviyesinin ise kontrol grubuna göre arttığı fakat bu artışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir. *Olea europaea* yapraklarından elde edilen sulu ekstraktının tiroidi uyaran etkisi olduğu, farklı araştırmacılar tarafından belirlenen hipolipidemik ve hipoglisemik aktivitelerin bu etkiden kaynaklanabileceği belirtilmiştir **(Al-Qarawi vd. 2002)**.

2.3.9 Kalp ve kalp-damar sistemi üzerine etkisi

Occhiuto vd. (1990) çalışmasında, anestezi altındaki köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada, 20 ve 30 mg/kg dozda *Olea europaea* yapraklarının gliserol-EtOH (1:1) karışımıyla hazırlanan ekstraktlarının ve 2 mg/kg dozda oleuropeinin, sinoatriyal ve atriyoventriküler nodlar üzerinde, kalsiyum influksunu inhibe ederek bradikardi

oluşturduğu ve antiaritmik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ekstraktın ve oleuropeinin aynı zamanda intra-atriyal ve intra-ventriküler ileti yollarında sodyum influksunu inhibe ederek kalp hızı üzerinde depresif etki yarattığı gözlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, *Olea europaea* yapraklarından hazırlanan %30'luk EtOH'lü ekstraktın, tavşanlardan izole edilen ve K^+-depolarizasyonuyla indüklenmiş aortik kasılmalar üzerinde Ca^{2+}antagonist etki göstererek inhibisyon yarattığı belirlenmiş ve bu etkinin fenolik yapılı bir bileşik olan hidroksitirozolden kaynaklandığı rapor edilmiştir **(Rauwald vd. 1994)**.

Andrikopoulos vd. (2002) yaptıkları çalışmada, oleuropeinin, 10 µM konsantrasyonda, araşidonik asit, adenozin difosfat ve platelet aktive edici faktörlerce indüklenmiş trombosit agregasyonunu engellediği, bu etki ve LDL oksidasyonunu inhibe edici etkisi nedeniyle ateromatik plak oluşumunu önlemede rol oynadığı bildirilmiştir.

2004 yılında yapılan bir çalışmada, Afrika kaynaklı *Olea europaea* bitkisinin (*subsp. africana* ve *Cape* kültürü) yapraklarının etil asetatlı ekstraktından izole edilen oleanolik asit, ursolik asit, metil maslinat ve uvaol bileşiklerinin kardiyotonik ve antidisritmik etkileri sıçanlar üzerinde in-vivo olarak araştırılmıştır. Bileşiklerin tümünün, uygulamadan 20 dk. sonra maksimuma ulaşan, belirgin, doza bağlı vazodepresör etki ve sinüs bradikardisi oluşturduğu, etkinin 60 dk'dan uzun sürdüğü saptanmıştır. En etkin aktiviteyi, oleanolik asit ve metil maslinatın gösterdiği belirlenmiştir. Tüm bileşiklerin, izoprenalin ve adrenalinin etkilerini bloke eden β-adrenerjik antagonistler gibi davrandığı rapor edilmiştir. Ayrıca oleanolik asit ve metil maslinatın belirgin pozitif inotropik ve dromotropik etki gösterdiği saptanmıştır. Oleanolik asit, ursolik asit, metil maslinat ve uvaol bileşiklerinin antidisritmik etkileri, adrenalinle indüklenmiş aritmide ve iskemik-reperfüzyon aritmisinde değerlendirilmiş, oleanolik asit ve uvaolün 40 mg/kg'lık dozda her iki tip aritmide de belirgin antidisritmik aktivite gösterdiği ve etkinin propranolol ile kıyaslanabilir düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çalışmalar sonunda, bu bileşiklerin, belirlenen vazodepresör, kardiyotonik ve antidisritmik etkileri göz önünde tutulduğunda, yapraklardan hazırlanan ekstraktın veya oleanolik asit ve uvaolün, stenokardi ve kalp

yetmezliği ile komplike olmuş hipertansiyonun geleneksel tedavisine yardımcı olmak amacıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır **(Somova vd. 2004)**.

Poudyal vd. (2010), bu çalışmadaki amaçları polifenollerce zenginleştirilmiş *Olea europaea L.* yapraklarından elde edilen ekstrakt ve ana bileşen oleuropeinin yüksek karbonhidrat oranlı (HCHF) diyet (% 52 karbonhidrat, % 24 yağ, % 25 fruktoz çözeltisi) uygulanan ratlarda kardiyovasküler, hepatik ve metabolik belirtilerin zayıflatılabilmesindeki etkisini araştırmaktır. Erkek Wistar ratları16 hafta boyunca, mısır nişastası diyeti (CS) veya HCHF diyet ile beslenmiş, bu tedavi grupları [CS + zeytin yaprağı ekstraktı (OLE içerir) ve HCHF + OLE] 8 hafta boyunca CS veya HCHF diyetleri ile beslenip, 8 hafta sonra % 3 oleuropein (OLE) ile takviye edilmiştir. 16 hafta sonra HCHF diyet uygulanan metabolik sendrom belirtileri gelişmiş ratlarda, yüksek abdominal ve karaciğer yağ birikimi, kalp ve karaciğerde kolajen birikimi, kardiyak sertlik ve oksidatif stres belirteçleri (plazma malondialdehit ve ürik asit konsantrasyonları) da dahil olmak üzere aort halka reaktivitesi ile gelişen anormal plazma lipid profili (bozulmuş glikoz toleransı) ve hipertansiyonu iyi yönde geliştirmiştir. HCHF + OLE grubuna göre daha iyi veya normalize kardiyovasküler, hepatik ve yüksek kan basıncı dışında metabolik işaretleri gelişen HCHF'li ratların sonuçlarına, oleuropein ve hidroksitirozol içeren polifenollerin, kan basıncını değiştirmeksizin diyetle uyarılmış obez ve diyabetli fare modelinde kardiyovasküler, hepatik ve metabolik semptomlarını indüklediğine, kronik inflamasyon ve oksidatif stresi tersine çevirdiğine işaret etmektedir.

Efentakis vd. (2015) derlemesi; zeytin yaprağı bileşenlerinin kardiyak disfonksiyon önlenmesinde ve terapatik kardiyo-koruyucu maddeler olarak kullanılmalarının gelecekteki perspektifini vurgulayan bir çalışmadır. Zeytin yaprakları *(Olea europaea* L.*)* bulaşıcı hastalıklara karşı, diyabet ve hipertansiyon tedavisi için kullanılan, önemli bir geleneksel bitkisel ilaç olarak kabul edilir. Ayrıca, zeytin yaprağı bileşenleri hücresel redoks modüle etkileri ve bu etkilerin birleşimi ile muhtemelen kardiyoproteksiyon ile ilişkilendirilir ve kalp-damar sistemi de dahil olmak üzere, belirli ortak hastalıkların patojenezi, oksidatif stres ve doku inflamasyonu etkileri içerir. Çeşitli in-vitro ve in-vivo çalışmaların gösterdiği gibi oleuropein, hidroksitirozol ve tirozol gibi zeytin polifenolik

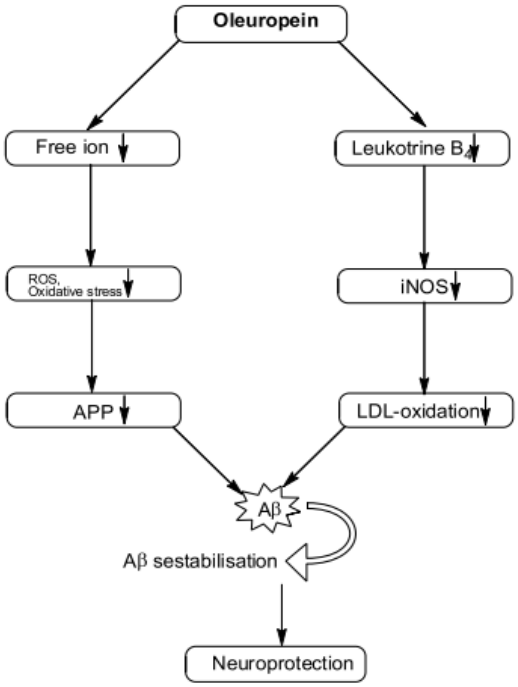
bileşikleri, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-aterosklerotik, anti-ischemic ve hipolipidemik etkilere sahiptir.

2.3.10 Diğer etkiler

Fehri vd. (1995) tarafından yapılan çalışmada, sıçandan izole edilen ve önceden kasılmış trake ve ileum üzerine % 3,2 oleuropein içeren *Olea europaea* sulu yaprak ekstraktı (suyundan kurtarılmış) uygulandığında, verapamil ve diltiazem gibi kalsiyum antagonistleri ile değiştirilemeyen doza bağlı gevşeme etkisi gözlenmiştir. Deneyler sonunda yaprak ekstraktının kalsiyum kanallarını bloke edici etkisi olmadığı, dilatasyon etkisinin, hücre içi cAMP konsantrasyonunu arttırarak kalsiyum hareketlerini değiştirmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir.

Omar S.H. (2010 a,b) zeytin yaprağındaki ana glikozit olan oleuropein ve temel bozunma ürünü hidroksitirozolün koroner kalp hastalığı ve bazı kanser hastalıklarının azalmasıyla bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalarda açıklanması ve araştırılması gereken pek çok kilit konunun bulunması ile birlikte, son yıllarda en ilgi çekici ve en ilginç gelişmeler zeytin yaprağı ekstraktlarının ve özellikle oleuropeinin Demans (Dementia), Parkinson, Alzheimer ve Şizofreni (Schizophrenia) gibi hastalıklardaki nöro-koruyucu (neuroprotective) rolüdür. Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli dejeneratif hastalıkların belirleyici bir özelliği olan Aβ-peptid ile kovalent olmayan kompleks oluşturarak nöro-koruyucu etki gösterir. Bazı çalışmalarda Alzheimer hastalığına karşı anti-enflamatuar maddelerin, koruyucu bir etki gösterdiği epidemiyolojik kanıtlar ile birlikte sunulmuştur, Alzheimer hastalığının klinik çalışmaları enflamatuar süreçlerin önemini göstermekte ve vurgulamaktadır ki, oleuropein gibi polifenolik doğal ekstraktler, yaşa bağlı hastalıklara karşı etkili olabilecektir. Şekil 2.2'de oleuropeinin nöro-koruyucu rolü temsili olarak gösterilmiştir.

.



Şekil 2.2 Oleuropeinin nöro-koruyucu rolünün şematik gösterimi

Son çalışmalar, zeytin yaprağı ekstraktlarının inflamasyonu baskıladığı ve oksidatif stres hasarını azalttığını göstermektedir. **Mohagheghi vd. (2012)** yaptıkları in-vivo çalışmada ilk olarak, ratlarda serebral iskemi-reperfüzyon yaralanması sonrası gözlem yapmışlar ve bu konuda yapılmış gözlemleri genişletmişlerdir. Dört grup rata, biri (kontrol) grubu olmak üzere, bu gruba distile su verilmiş ve diğer üç tedavi grubuna oral yolla zeytin yaprağı ekstraktı sırasıyla 50, 75 ve 100 mg/kg/gün olacak şekilde verilmiştir. Her bir grup incelendiğinde, zeytin yaprağının oral yolla alımının ratlarda infarkt hacmi, beyin ödemi, kan-beyin bariyeri geçirgenliğini azalttığı ve sıçanlarda geçici orta serebral arter tıkanıklığı sonrası nörolojik dezavantaj puanlarını geliştirdiği belirtilmiştir.

2.4 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarından Polifenollerin Ekstraksiyonu

Bitkisel kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu, ekstraksiyon sonrası elde edilen fitokimyasallardan diyet takviyeleri ya da nutrisötiklerin, gıda takviyeleri, ilaç ve kozmetik ürünlerin hazırlanmasında ilk adımdır. Dünya çapında tüketicilere, yüksek kaliteli bitkisel ürünler sunmak ve sağlamak genel çabası ile geleneksel numune hazırlama teknikleri yanında, daha önemli avantajlara sahip modern tekniklerin

geliştirilmeside önemlidir. Ancak bütün fenolik bileşiklerin optimum ekstraksiyonu için tek bir metod geliştirmek, önemli ölçüde farklı polaritede fenolik maddenin bulunması yüzünden oldukça zordur. Zeytin yaprağından polifenollerin ekstraksiyonu için yapılan çalışmalarda su, MeOH, EtOH, aseton ve alkol/su karışımları gibi çözücü sistemlerinin kullanıldığı rapor edilmiştir.

2.4.1 Çözücü ekstraksiyonu

Gariboldi vd. (1986), yaptığı çalışmada, İtalya'dan toplanan *Olea europaea* bitkisinin taze yaprakları (2 kg) 5:l MeOH ile 1 hafta boyunca oda sıcaklığında masere edilmiş, süzüldükten sonra vakum altında yoğunlaştırılmış ve kalan artık 500 ml aseton-su (1:1) karışımında çözülmüştür. Sulu ekstrakt, sırasıyla n-pentan, kloroform ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Etil asetatlı ekstrakt vakum altında yoğunlaştırılarak silikajel kolonuna uygulanmış ve 1:l kloroform-MeOH (9:1) ve 400 ml kloroform-MeOH (4:1) karışımı ile elüe edilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlardan 5,9 g oleuropein izole edilmiştir. Kolondan toplanan ilk fraksiyonlar yoğunlaştırıldıktan sonra tekrar silikajel kolonuna uygulanmış ve sırasıyla 900 ml kloroform-MeOH (99:1) ve 400 ml kloroform-MeOH (9:1) ile elüe edilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlardan 50 mg oleosit ve 120 mg ligstrosit izole edilmiştir.

Kuwajima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, Japonya'dan toplanan taze yapraklar parçalanarak, MeOH ile ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlar yoğunlaştırılmış, su eklenerek çalkalanmış ve süzülmüştür. Süzüntü 100 ml'ye yoğunlaştırıldıktan sonra HP-21 kolonuna uygulanarak H_2O ve MeOH ile elüe edilmiştir. MeOH ile elüe edilen fraksiyonun yoğunlaştırılmasıyla elde edilen artık (23,2g), silikajel kolonuna uygulanmış, kloroform-MeOH karışımı ile MeOH miktarı arttırılarak elüe edilmiştir. (92,5:7,5) ve (9:1) oranında kloroform-MeOH karışımı ile elüe edilen fraksiyonlar birleştirilip yoğunlaştırılarak elde edilen artığın 1,95 g'ı preparatif HPLC yöntemi kullanılarak MeOH/H_2O (1:1) ile elüe edilmiş ve 6 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonlardan, preparatif İTK yöntemi kullanılarak oleuropein (140,2 mg), ligstrosit (10,1 mg) ve oleurosit (90,9 mg) izole edilmiştir **(Kuwajima vd. 1988)**.

Olea europaea yapraklarının flavonoit içeriğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, kurutulmuş yapraklar (1g), toz edilmiş ve 100 mL MeOH ile 40ºC'da ultrasonik banyoda 2 saat boyunca ekstrakte edilmiş, daha sonra çözücü kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Flavon ve flavonollerin HPLC ile analizi için 50 mg kuru ekstrakt 20 ml suda çözülmüş, 16 mL'sinin üzerine, 5 mL 6 M HCl ve 24 mL saf EtOH eklenerek geri soğutucu altında 90ºC'de hidroliz işlemi yapılmıştır. Elde edilen çözelti soğutulup 50 mL'ye tamamlandıktan sonra analizlenmiştir. C18 kolon ve % 2 fosfat tamponu ile MeOH'den oluşan çözücü sisteminin kullanıldığı HPLC analizinde apigenol (28,4 mg/kg), luteolol (277 mg/kg), kersetol (62,4 mg/kg) ve mirsetol (14,30 mg/kg) bileşikleri 367 nm'de saptanmıştır **(Skerget vd. 2005)**.

Japón-Luján vd. (2006c) yaptıkları çalışmada, süper ısıtılmış sıvı ekstraksiyonu (SHLE) metodu kullanılmış ve bağımlı değişken olarak sıcaklık, statik ve dinamik ekstraksiyon zamanı, akış hızı ve çözücü kompozisyonu parametreleri belirlenmiştir. Çok değişkenli optimizasyon uygulaması sonrası 1g yaprak örneğinde 6 bar basınç, 70:30 EtOH/H_2O, 140 °C sıcaklık, 6 dk. dinamik mod + 7 dk. ekstraksiyon çözücüsü ile olmak üzere toplam 13 dk. ekstraksiyon zamanı, 1mL/dk akış hızı optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 23 g/kg oleuropein, 665 mg/kg verbascoside, 1046 mg/kg apigenin-7-glucoside, 998 mg/kg luteolin-7-glucoside yapraktan özütlenmiştir. Hedef polifenollerin analizi HPLC–DAD (280, 330, 340 ve 350 nm) sistemi, RP18 (250 × 4 mm,5 μm), C18 (15 × 4.6 mm, 5 μm) analitik kolonları, % 6 asetik asit çözeltisi, 2 mM sodyum asetat tamponu ile MeCN mobil fazı kullanılan gradient elüsyon uygulaması ve 0.8 mL/dk akış hızında yapılmıştır.

Altıok vd. (2008) bildirdikleri çalışmada, zeytin yaprağından polifenollerin ekstraksiyonu için EtOH, MeOH ve her iki çözücünün %10-90 oranlarında karışımları kullanılmıştır. Zeytin yaprağından fenolik madde miktarının ve ekstraktlardaki antioksidan kapasitenin yüksek miktarda belirlendiği ekstraksiyon koşullarının, %70 EtOH ve 24 saat ekstraksiyon süresi olduğu belirtilmiştir. Bu koşullarda oleuropein % 13,4 ve rutin % 0,18 olarak belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktlarından oleuropein ve rutinin saflaştırılması için ipek fibroin, umut verici bir adsorban olarak bulunmuştur.

Lee vd. (2009) bildirdiğine göre, son çalışmalar zeytin yaprağının, biyoaktif fenolik bileşikler için zeytinyağı ve zeytin meyvesi ile karşılaştırılabilir ölçüde önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir. Tarımsal atık olan zeytin yaprağından, uygun ekstraksiyon yöntemleri geliştirerek polifenolleri özütlemek, biyoaktif bileşenlerin verimini arttırmak için önemli bir adımdır. Araştırmacıların çalışmasında fenolik içeriği çeşitli çözücü ekstraksiyonu yöntemleri kullanılarak özütlenen zeytin yaprağı fraksiyonlarının, farklı radikal süpürücü sistemleri kullanılarak, antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Toplam flavonoid ve fenolik madde içeriği, % 80 EtOH, butanol, hekzan, kloroform, etilasetat ve sulu fraksiyonlarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Oleuropeinin üç fraksiyonda, yüksek antioksidan ve radikal süpürücü etki ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada oleuropein sulu ekstraktlarda hiç gözlenmezken, %80 EtOH'lü ekstraktda 102,11±0,02; hekzanda 2,47±0,001; kloroformda 7,66 ± 0,001; etilasetatta 152,71 ± 0,03; butanolde 173,35 ± 0,03 mg/100g olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, zeytin yaprağında oleuropein ve fenolik maddeleri esas alarak geliştirilecek farklı ekstraksiyon yöntemlerinin, antioksidan kapasite değerlerinin artırılabilmesi için önemli faktörler olduğunu göstermektedir.

Hashemi vd. (2010) yaptıkları çalışmada, ters faz dispersiv sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (RP-DLLME) metodu, zeytin yaprağı ektraktlarından ve zeytinyağı proses atıklarından oleuropeinin doğrudan HPLC ile belirlenmesi ve ön-zenginleştirme basamakları için geliştirilmiştir. Geleneksel dispersive sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonda, ters faz sıvı kromatografi ile uyumlu olmayan klorlu organik çözücünün mikro damlası sediment fazıdır. Bu nedenle çözücü buharlaştırma ve uygun bir çözücü ile yeniden oluşum gerekmektedir. DLLME deki bu sorun, RP-DLLME'de organik çözücü ile suyun değiştirilmesi ve çözücü polaritesinin dengelenmesi ile çözülmüştür. Merkezi kompozit kemometrik tasarım, ekstraksiyon yönteminin çok değişkenli optimizasyonu ve ekstraksiyon yönteminin etkinliğinde söz sahibi, beş farklı parametrenin (Siklohekzan hacmi, etilasetat hacmi, su hacmi, suyun pH değeri, santrifüj zamanı) etkilerini incelemek için kullanılmıştır. Optimizasyon koşullarında,1,4 mL etilasetatlı örnek, 40 µL su (pH 5) hızlıca 5.3 mL siklohekzan içine eklenmiştir. Zenginlestirilerek elde edilen ve kısmen saflaştırılmış analiti ihtiva eden faz, doğrudan analiz için RP-HPLC kolonuna enjekte

edilmiştir. Araştırmacılar tarafından, RP-DLLME tekniğinin, hızlı, pratik, HPLC ile direkt kullanılabilir, gelecek vaat eden bir teknik oluğu bildirilmiştir.

Stamatopoulos vd. (2012), zeytin yaprağından oleuropein ve ilgili biyofenollerin ekstraksiyonu ve ön işlemlerinde, buhar etkisi, sıcak su ile muamele ve UV-C ışın etkisini araştırmıştır. Ayrıca, zeytin yapraklarına parçacık boyut etkisi ve buhar etkisi süresi cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Tam faktöriyel tasarımda, EtOH ekstraktlarının oleuropein içeriği ve antioksidan aktivite bağımsız değişkenler olarak, buhar etkisi sürecini optimize etmek için seçilmiştir. Zeytin yaprağı fraksiyonunda oleuropein içeriği ve antioksidan aktivite için optimum koşullar; 10 dk buhar etkisinde, sırasıyla 20-11 ve 3-1mm' dir. Sonuçlar buhar ekstraksiyon prosedürüne bağlı olarak verilmiş, optimum koşullarda, ekstraksiyon öncesi buhar etkisindeki örneklerde, buhar uygulanmayan örneklerden, oleuropein verimi 25-30, antioksidan aktivite 4-13 kez, daha yüksek bulunmuştur. UV-C etkisi, oleuropein içeriği ve antioksidan aktivite üzerinde anlamlı etki göstermemişken, sıcak su etkisi, işlenmemiş örneklere göre önemli ölçüde daha yüksek oleuropein verim ve antioksidan aktivite göstermiştir.

Taamalli vd. (2012b), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) kullanarak yaptıkları çalışmada 1g öğütülmüş zeytin yaprağı EtOH veya su ile 100 bar basınçta, 150 °C sıcaklıkta, 20 dakika ekstraksiyon süresince, ekstrakte edilmiştir. Polifenollerin analizi için HPLC-ESI-TOF/IT-MS sistemi, C18 (4.6 × 150 mm, 1.8 μm) analitik kolon, 25 °C, asetik asit (% 0.5) ve MeCN mobil faz ve gradient elüsyon kullanılmıştır. Akış hızı 0.8 mL/dk. ve MS sistemi negatif modda çalışılmıştır. Araştırmacılar basınçlı sıvı ekstraksiyonu çalışmasında, EtOH'ün çözücü sistemi olarak kullanıldığı şartların oleuropein ekstraksiyonu için en yüksek verimi ürettiğini, ancak suyun kullanıldığı çözücü sisteminin herhangi bir etkinlik göstermediğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların farklı ekstraksiyon tekniklerinin karşılaştırıldığı bu çalışmasında, her bir ekstraksiyon tekniğinin polifenolik gruplardan belirli bir bileşik sınıfının ekstraksiyonu için diğerlerinden daha yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Mikrodalga (MAE) ve geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin oleuropein, oleuropein türevleri, apigenin rutinozit ve luteolin glikozit gibi daha polar bileşiklerin, ekstraksiyonu için daha tercih edilebilir olduğu, süper kritik akış ekstraksiyonu (SFE-CO_2) için modifiyer olarak EtOH kullanıldığında ve

PLE'nin çözücü olarak su kullanıldığı durumlarının oleuropein ekstraksiyonu için iyi bir ekstraksiyon tekniği olmadığı, süper kritik ekstraksiyonun apigenin ve diosmetin ekstraksiyonu için en iyi ekstraksiyon yöntemi olduğu bildirilmiştir.

Quirantes-Piné vd. (2013), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) ile zeytin yaprağından EtOH (150°C) ve su (200 °C) çözücü sistemleri ile polifenolleri özütledikleri çalışmada, ekstraksiyon süresi 20 dk., olarak tespit edilmiştir. Bu koşullarda ilk kez zeytin yaprağı ekstraktlarında lusidiumoside C tespit edilmiştir. Araştırmacılar, sulu ekstraktların hidroksitirozol ve EtOH'lü ekstraktların ise flavanoidlerce zengin olduğunu bildirmiştir. Polifenollerin analizi için, HPLC–ESI–QTOF–MS sistemi, negatif MS modu, C18 (3 μm, 2 × 150 mm) analitik kolon, 25 °C kolon sıcaklığı, gradient elüsyon programı, 0.2 mL/dk. akış hızı ve % 0.5 asetik asit ve MeCN kullanılmıştır.

Talhaoui vd. (2014), kurutulmuş zeytin yapraklarının 0.5 g da Ultra Turrax ile 10 mL MeOH / H_2O (80/20) sisteminde, ultrasonik banyo ile 10 dk süresince ekstrakte edilmiş, 30 fenolik bileşik tespit edilmiştir. Ekstraktların spektroskopik metodla belirlenen toplam fenolik madde miktarı, 52,12-60,64 mg/kg olarak ölçülmüştür. Fenolik bileşikler HPLC-DAD-ESI-TOF- MS sisteminde, C18 (4.6 × 100 mm, 2.7 μm) analitik kolonu ile, %1 asetik asit-su ve MeCN mobil fazında gradient elüsyonla, 0.8 mL/dk akış hızında analizlenmiştir.

Xynos vd. (2014), öğütülmüş zeytin yaprağı (6 g) basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) yöntemi ile optimum çalışma koşullarının belirlendiği çalışmada, sıcaklık, statik zaman, ekstraksiyon döngüsü, ve EtOH konsantrasyonu (%) bağımlı değişkenler olarak alınmıştır. Çok değişkenli optimizasyon sonrası, ekstraksiyon veriminin başlıca sıcaklık, statik zaman, ve ekstraksiyon döngüsü tarafından, pozitif etkilendiği ve 1500 psi basınçta çalışıldığı bildirilmiştir. Bu koşullarda oleuropein % 26.1 tespit edilmiştir. Polifenol analizleri HPLC-DAD (248 nm) sisteminde, C18 (250 × 4.6 mm, 5.0 μm) analitik kolon, 25°C kolon sıcaklığı, %1 asetik asit- MeOH mobil fazı ile gradient elüsyon koşulları kullanılarak, 1 mL/dk. akış hızında yapılmıştır.

Yateem vd. (2014) çalışmasında; West Bank/ Palestina bölgesinden topladıkları zeytin yaprağı örneklerinden oleuropeinin ekstraksiyonu için optimum koşullar belirlenmiştir. Çözücü ekstraksiyonunda çözücü tipinin, çözücü kompozisyonunun, pH ve sıcaklığın etkisi ile ekstraksiyon metodlarından maserasyon ve soksiletin oleuropeinin miktarı üzerine etkisi incelenmiştir. Oleuropeinin en yüksek değeri, 60°C'de (6,84 mg/g oleuropein) %80 EtOH, soksilet metodu için 19 mg/g oleuropein, maserasyon metodu için 13mg/g oleuropein olarak belirlenmiştir. En önemli ekstraksiyon parametresi, yüksek sıcaklık ve asidik pH olarak bulunmuştur. Oleuropein ölçümleri C18 kolonda %1 asetik asit ile aistlendirilmiş 80/20 oranında H_2O/MeCN mobil fazında 240 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Sifaoui vd. (2015) yaptıkları çalışmada, zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu; su, EtOH, MeOH ve bunların karışımlarının kullanıldığı üçlü sistemlerden oluşan bağımlı değişkenlere karşı, cevap yüzey yönteminde on noktalı genişletilmiş simplex ağırlık merkezi tasarım yapılarak, birinci dereceden polinomel model ile formüle edilmiştir. Cevap değişkeni olarak, fenolik madde ve flavanoid içeriği, 2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) yöntemine dayalı antioksidan aktivite, oleuropein ve luteolin-7-O-glikozit miktarları kullanılmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları; % 12,7 H_2O, %14,8 EtOH ve %72,5 MeOH olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda kurutulmuş zeytin yaprağında verim, toplam fenol 163,69±6,35 mg GAE, flavanoid içeriği 114,69± 3,56 mg rutin eşdeğeri, oleuropein 858,29 µg g^{-1}, luteolin-7-O-glikozit 21,04 µg g^{-1} olarak verilmiştir. Antioksidan kapasite ise 238,71 ± 4,35 mM Troloks eşdeğeridir. Araştırmacılar zeytin yaprağından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon işleminde, optimum koşulları tahmin etmek için genişletilmiş simpleks ağırlık merkezi tasarımının yeterli bir model tasarımı olduğunu belirtmiştir.

2.4.2 Ses ötesi dalga (Ultrasound) destekli ekstraksiyon

Japón-Luján vd. (2006a) zeytin yapraklarından dinamik ses ötesi dalga destekli ekstraksiyonu (DUSAE) için, 20 kHz frekans, 450 W güç, 0–4 cm prob pozisyonu, %10–%50 ultrasonik radyasyon genlik aralığı, %30–%70 görev döngüsü, 6–30 dk. SÖD uygulama süresi 4–6 mL/dk çözücü akış hızı, % 50–% 90 EtOH oranı, 25–40 °C su

banyosu sıcaklığı bağımlı değişkenlerini kullanarak, çok değişkenli metod optimizasyonu çalışılmıştır. 1 g parçalanmış yaprak örneğinde, 59:41 EtOH-H_2O çözücü karışımı, 40°C sıcaklık, 25 dk. ekstraksiyon zamanı, SÖD uyg. süresi 0.7 s, görev döngüsü %30, uygulanan güç 450 W olarak optimizasyon noktaları belirlenmiştir. Bu koşullarda hedef bileşiklerden oleuropein 22610 ± 632 mg/kg, verbaskozit 488 ± 21 mg/kg, apigenin-7-glukozit 1072 ± 38 mg/kg, luteolin-7-glukozit 970 ± 43 mg/kg elde edilmiştir.

Şahin ve Samlı (2013), çalışmasında zeytin yaprağından ses ötesi dalga destekli ekstraksiyon (USAE) sonrası, Folin-Ciocalteu metodu ile toplam fenolik madde analizi yapılmıştır. Toplam fenolik madde cevap değişkeni olarak kullanılmış, çözücü konsantrasyonu % 0–100 EtOH, katı/çözücü oranı (25–50 mg/mL), ekstraksiyon zamanı 20-60dk., frekans 50Hz bağımlı değişkenler olarak belirlenmiştir. Çok değişkenli optimizasyon sonrası, optimum koşullar, %50 EtOH, 500 mg kuru yaprak/10 mL çözücü, 60dk ekstraksiyon zamanı olarak belirlenmiştir. Modelin en önemli parametresi çözücü konsantrasyonudur.

Zun-Qiu vd. (2015) yaptıkları çalışmada, zeytin yaprağından oleuropeinin elde edilmesi için ses ötesi dalga destekli ekstraksiyon ve saflaştırma için silika jel kolon kullanılmıştır. 1g toz edilmiş zeytin yaprağı, 1/25 (k/h) oranında, %80'lik MeOH/H_2O karışımı ile 40 dk. ekstraksiyon süresince, 40 kHz frekans, 180W güç uygulanarak ekstrakte edilmiştir. Bu koşullarda zeytin yaprağından % 13,52 saf oleuropein, % 96,54 saflıkta, % 78,4 verimle elde edilmiş ve oleuropein HPLC sistemi ile analizlenmiştir.

Xie vd. (2015) çalışmasında zeytin yapraklarından oleuropeinin ekstraksiyonu için basınç azaltılmış kaynayan çözücü ekstraksiyonu ile ses ötesi dalga etkili ekstraksiyon birlikte kullanılmıştır. Dört önemli faktör, ekstraksiyon sıcaklığı, ultrasonik güç, EtOH konsantrasyonu ve sıvı katı oranı, yüksek oleuropein verimi için cevap yüzey yönteminde (RSM) kullanılmıştır. Box-Behnken tasarımı dört faktörün verim üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Sonuçlar katı-sıvı oranının oleuropein verimi üzerinde en etkin parametre olduğunu göstermiştir. Optimum çalışma koşulları EtOH oranı % 75 (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 53^0C, ultrasonik güç 600W ve sıvı -katı oranı:

1:31 olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında oleuropein veriminin %7,08 olduğu bildirilmiştir.

2.4.3 Süperkritik akış (SFE) ekstraksiyonu

Floch vd. (1998), yaptıkları çalışmada zeytin yaprağındaki fenolik maddelerin izolasyonu için oldukça seçici olan süperkritik akışkan ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Süperkritik akışkan olarak karbondioksit ve ko-solvent olarak MeOH kullanılmıştır. 334 bar'da, 100 ºC de 2mL/dk akış hızında, 140 dk süre ile çalışılmıştır. Modifiyerin içeriği, basınç, sıcaklık, akış hızı ve ekstraksiyon süresi bağımsız değişkenlerinin, ekstraksiyona etkisi incelenmiştir. Süperkritik akışkan ekstraktındaki karboksilik asitler ve fenolik maddeler, Elektrospray-MS ile belirlenmiş, SFE ile hekzan, dietileter ve etilasetat gibi sıvı çözücülerle ses ötesi dalga yardımı ile yapılan ekstraksiyondan daha fazla fenolik madde geri kazanıldığı belirtilmiştir. Dietileter, hekzan, etilaset ve MeOH ekstraksiyonu ile elde edilen toplam biyofenol miktarı sırası ile 1,1; 0,18; 1,6 ve 16,8 mg/g olarak belirlenmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyon yönteminde karbondioksite %10 MeOH katılarak yapılan ekstraksiyonda, toplam fenol miktarı 7,6 mg/g olarak gözlenmiştir. Sadece MeOH kullanılarak yapılan ekstraksiyonda, ürünün, süperkritik akışkan ekstraksiyon ürününden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda, MeOH gibi polar bir çözücünün ko-solvent olarak kullanılmadığı sürece, biyofenolik maddelerin tamamen alınamayacağı gözlemlenmiştir.

Şahin ve Bilgin (2012), çalışmasında zeytin yaprağından oleuropeinin özütlenmesi için yeni ve gelişmekte olan bir yöntem üzerinde durulmuştur. Kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yapraklarına, süper kritik sıvı olarak CO_2, ko-solvent olarak H_2O ve EtOH varlığında, süper kritik akışkan madde ekstraksiyonu (SFE) uygulanmıştır. Ekstrakt ve oleuropein verimi üzerine, ko-solvent miktarı (0-1mL/dk), sıcaklık (50-100°C) ve basınç (100-300bar) çalışma parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Nicel analiz için, sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon kütle spektrumu (LC-ESI-MS/MS) tekniği kullanılmıştır. Tek başına süper kritik-CO_2 kullanılarak elde edilen deney sonuçları tatmin edici bulunmazken, polar madde ilavesinin, verimin ve seçiciliğin geliştirilmesi

için gerekli olduğu görülmüştür. H_2O ve EtOH ko-solvent kullanımının oleuropein veriminde aynı performansı gösterdiği belirlenmiştir. En iyi performans 300 bar, 100ºC, CO_2–H_2O çalışma parametrelerinde tespit edilmiş ve oleuropein miktarı % 28,83 olarak tespit edilmiştir.

Taamalli vd. (2012b), yaptıkları çalışmada, 1 g toz edilmiş zeytin yaprağından süperkritik akış ekstraksiyonu ile hedef polifenollerden apigenin ve diosmetin izole edilmiştir. Apigenin ve diosmetin için en uygun koşullar 150 bar basınç, 40 °C sıcaklık, ekstraksiyon çözücüsü CO_2, modifiyer % 6,6 EtOH ve ekstraksiyon zamanı 2 saat olarak tespit edilmiştir. Polifenollerin analizi için HPLC-ESI-TOF/IT-MS sistemi, C18 Eclipse Plus (4.6 × 150 mm, 1.8 μm) analitik kolon, 25 °C, asetik asit (% 0.5) ve MeCN mobil faz ve gradient elüsyon kullanılmıştır. Akış hızı 0,8 mL/dk'dır.

Xynos vd. (2012) zeytin yapraklarından oleuropeinin zenginleştirilmesi için, süper-kritik ve sub-kritik çözücü ekstraksiyonu ile yeşil (green chem.) ekstraksiyon uygulamalarının geliştirilmesine yönelik araştırmalarında, 30MPa basınç, 50°C ekstraksiyon sıcaklığı, 55°C ayırma sıcaklığı kullanılmış, dinamik modda çözücü/katı madde oranı 120 ve 290, ko-solvent oranı %5 ve %20 olacak şekilde çalışılmıştır. Optimum koşulların 30 MPa basınç, 50°C ekstraksiyon sıcaklığı, 55°C ayırma sıcaklığı, dinamik modda çözücü/katı madde oranı 290, ko-solvent oranı %20 ve bu koşullarda oleuropeinin %30 verimle elde edildiği bildirilmiştir. Oleuropein analizleri, HPLC-DAD (248 nm), C18 (250 × 4.6mm, 5.0 μm) analitik kolon, 25 °C sıcaklık, %1 asetik asit ve MeOH mobil fazı, gradient elüsyon ve 1mL/dk. akış hızında çalışılmıştır.

2.4.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Japón-Luján vd. (2006b) çalışmasında, ilk kez mikrodalga yöntemi zeytin yapraklarından biyofenollerin ekstraksiyonunu hızlandırmak amacıyla önerilmiştir. Optimum çalışma koşulları belirlenmesinde çok değişkenli optimizasyon yöntemi kullanılarak, güç 100–200 W, irradiation zamanı 5–15 dak, EtOH yüzdesi %80–100 bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Analizler HPLC-DAD (280, 330, 340 ve 350 nm), Lichrospher 100 RP18, (250 × 4 mm,5 μm) kolon, 6% asetik asit, 2 mM sodyum

asetat ve MeCN mobil faz sisteminde gradient elüsyonla, 0,8 ml/dak akış hızında yapılmıştır. Analiz öncesi ekstraktlarda, ön temizleme ve deriştirme işlemi uygulanmamıştır. Hedef analitlerin 200W güçte, 8 dk içinde, %80 EtOH/H_2O sisteminde, 80 C°'de ekstraksiyonu sağlanmıştır. Oleuropein ve diğer biyofenoller, oleuropein % 2,32, verbaskozit 631 mg/kg, apigenin-7-glukozit 1076 mg/kg, luteolin-7-glukozit 1016 mg/kg olacak şekilde elde edilmiştir. Basit fenoller mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilememiştir.

Taamalli vd. (2012a), 1.25 g toz haline getirilmiş taze zeytin yaprağından, mikrodalga destekli ekstraksiyon kullanarak yaptıkları araştırmalarında, 10mL MeOH, EtOH ve bu iki çözücünün farklı oranlarda sulu karışımları (% 40-100) kullanılmış, ekstraksiyon zamanı 4-16 dk., irradiation uygulama sıcaklığı 10–120 °C aralığında belirlenmiştir. Analizler için HPLC-ESI-TOF/IT-MS sistemi, C18 Eclipse (4.6×150 mm,1.8 μm) analitik kolon, kolon sıcaklığı 25°C, mobil faz asetik asit (% 0,5) ve MeCN belirlenmiş, gradient elüsyon ile 0,8 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Tek değişkenli optimizasyon çalışması ile 36 fenolik madde, %80 MeOH-H_2O sisteminde, 80 °C'de 6 dk içinde ekstrakte edilmiştir.

2.5 *Olea Europaea* L. Bitki Yapraklarından Polifenollerin Analizi

Ters faz sıvı kromatografisi, sabit fazın apolar, haraketli fazın ise polar olduğu bir kromatografidir. Apolar sabit faz genellikle C8 ve C18 dolgu malzemeleridir. Dolgu maddesi olarak kullanılan silikanın polarlığını azaltmak için yüzeyi 8 veya 18 karbonlu

hidrokarbon ile kaplanmaktadır. Fenolik bileşiklerin HPLC ile ayrılması genel olarak ters faz (RP) kolonlar vasıtası ile gerçekleşmektedir. Fenolik bileşikler gibi polaritesi yüksek olan maddeler kolondan daha çabuk çıkmaktadır. Haraketli faz olarak MeOH veya MeCN ve çok az oranda asit ihtiva eden su kullanılmaktadır. Hareketli faz olarak kullanılan su içerisine asit eklenmesinin sebebi ise analitin çözücü sisteminde kolayca disosiye olmasını sağlayarak ayırma işlemine, ayırma gücüne ve pik şekline faydalı olmaktır. Çünkü fenolik bileşiklerde bulunan hidroksil grupları bu maddelerin zayıf asidik özellik göstermesine neden olmaktadır. Burada modifiye edici olarak kullanılan asitler formik

asit, asetik asit, trifloroasetik asit ve fosforik asittir. Bu amaçla yapılan çalışmalar aşağıda derlenmiştir.

Del Boccio vd. (2003), ratlara oral yolla 100 mg/kg dozajda oleuropein kapsülleri uyguladıkları çalışmada, ratların serum ve idrarında oleuropein ve biyoaktif metaboliti hidroksitirozolün kalitatif ve kantitatif tayini yapılmıştır. Etil asetat sistemi ile yapılan çözücü ekstraksiyonunda, plazma örneklerinde %100 geri kazanımla, idrar örneklerinde ise %60 geri kazanımla çalışılmıştır. Ters faz kromatografik ayırım için H_2O-MeCN mobil fazı (doğrusal gradient), ODS kolon, dedeksiyon sistemi için elektrosprey iyonizasyonlu tandem kütle spektrometresi kullanılmıştır. Biyofenoller için doğrusal kalibrasyon aralığı plazma için 2,5–1000 ng/mL (LOD 1,25 ng/mL), idrar için 5–1000 ng/mL (LOD 2,5 ng/mL) kullanılmıştır. Oleuropein ve hidroksitirozol; idrarda ağırlıklı olarak glukoronit ve düşük konsantrasyonlarda serbest formda, plazma örneklerinde ise oleuropein sadece glukozit formda bulunurken, hidroksitirozol sadece eser miktarda serbest formda tespit edilmiştir. Araştırmacılar tarafından, bu önemli diyet bileşenlerinin, potansiyel tedavi edici maddeler olarak gözönüne alınması gerektiği ve biyoyararlanım ve metabolizma araştırmaları için LC-MS sisteminin uygun bir analiz yöntemi olduğu belirtilmiştir.

Tan vd. (2003), zeytin bitkisinin ana glikoziti oleuropein ve onun degradasyon ürünü hidroksitirozolün eşzamanlı ölçümünü yaptıkları çalışmada, iç standart olarak 3,4-dimetoksifeniletanol, ters faz kromatografi sisteminde, fenil kolon (oda sıcaklığında), izokritik mobil faz sisteminde MeCN ve %2'lik asetik asit çözeltisi (15/85; v/v), 281, 316 nm uyarım ve emisyon dalga boylarında floresans dedektör sistemi kullanılmıştır. Araştırmada oleuropein ve hidroksitirozolün stabilitesini sağlamak için eserin (physo-stigmin) ve askorbik asit kullanılmıştır. Kalibrasyon grafikleri doğrusal ve kantitasyon limitleri hidroksitirozol ve oleuropein için sırası ile 30 ng/ml ve 3 mg/ml'dir.

Tsarbopoulos vd. (2003) çalışmalarında hidroksitirozol, tirozol ve oleuropein ters faz HPLC yöntemi ile tayin edilmiş, iç standart olarak 3-hidroksifenil etanol, mobil faz olarak 0.05M amonyum asetat tamponu (asetik asitle pH 5'e getirilmiş) ve MeCN ile 1mL/dk. akış hızlı gradient elüsyon programı uygulanılarak kullanılmıştır. C8 (250x4.0 mm I.D.,

5 μm) kolon ile 40 ºC'de çalışılmıştır. Oleuropein ve tirozol için dedeksiyon limiti 50 ng/mL ve hidroksitirozol için 75 ng/mL'dir.

Agalias vd. (2005) çalışmasında, *Olea europea* yapraklarının dört ana bileşeni oleuropein, elenolik asit, hidroksitirozol ve tirozol, kaynar su ekstraksiyonu (dekoksiyon) ve organik çözücü ekstraksiyonu sonrası LC-MS ile belirlenip, HPLC-DAD sistemi ile tayin edilmiştir. Hidroksitirozol ve tirozol LC-MS sisteminde etkin sinyal vermemiş ve DAD dedektör ile tayin edilmiştir. Oleuropein (m/z 539) ve elenolik asit (m/z 241) negatif iyon modunda çalışılmıştır. HPLC-DAD ters faz sıvı kromatografi sisteminde, mobil faz olarak 0,05M amonyum asetat tamponu (asetik asitle pH 5'e getirilmiş) ve MeCN ile 1mL/dk. akış hızlı gradient elüsyon programı uygulanılarak kullanılmıştır. C8 (250x4.0 mm I.D., 5 μm) kolon ile, 240 ve 280 nm dalga boylarında, 40 ºC'de çalışılmıştır. LC-MS sisteminde, triple kuadropol kütle spektrometresi (TPQ), API 2 kaynak ile elektrospray iyonizasyon ve C18 (2.1x150mm I.D., 3.5 μm) analitik kolon kullanılmıştır. Farklı zeytin yaprağı örneklerinde; 50 gram taze yapraktan 250 ml su ile ekstraksiyon sonrası, oleuropein 11,8-121,9mg, hidrositirozol 0,6-23,9mg, tirozol 0,4-20,5mg ve elenolik asit 0-33,1 mg aralığında tayin edilmiştir. Oleuropein için geri kazanım, sıcak su ekstraksiyonunda (dekoksiyon) % 34,8 MeOH ile çözücü ekstraksiyonunda % 30,2 ve aseton için % 37,7 olarak bulunmuştur.

Pek çok ağaç ve bitki türünde mevcut polifenollerin, sağlık düzenleyici ve antioksidan etkisi bilinmekte ve ilgi çekmektedir. **Proestos vd. (2006)** yaptıkları çalışmada *Verbenaceae, Lamiaceae, Oleceae* ailesine ait beş bitki türünde fenolik kompozisyon, HPLC, GC-MS sistemleri ile belirlenmiştir. GC-MS sisteminde uçucu olmayan ve termal bozunabilir bileşikler N,O-bis (trimetilsilil) trifloroasetamid içeren trimetilklorosilan ile türevlendirilip, uçucu trimetilsilil türevlerine dönüştürülerek analizlenmiştir. Bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda % 62,5 MeOH kullanılmıştır. MeOH'ün koruyucu rolü vardır ve fenoloksidaz gibi enzimler tarafından yükseltgenerek (okside olarak) fenolik bileşikleri koruduğu düşünülmektedir. HPLC analizi öncesi, bağlı formda bulunan önemli bir fraksiyonu oluşturan glikozit veya esterlerin hidrolizi gereklidir.

Silva vd. (2006) çalışmasında, Portekiz'e ait üç farklı *Olea europea* türünde meyve, çekirdek ve yaprak örnekleri, PDA dedektörlü HPLC ve kütle spektrometresi (MS) ile analiz edilmiştir. Bazı polifenollerden verbaskozit, rutin, luteolin-7-glukozit, oleuropein ve hidroksitirozol belirlenmiştir. Ayrıca zeytin çekirdeğinde HPLC-MS sistemi ile bir sekoridoid olan nüzhenit tanımlanmıştır. Zeytin yaprağında ise temel sekoiridoid olan oleuropein tespit edilmiştir.

Japón-Luján vd. (2008) yaptıkları çalışmada zeytin bitkisinin farklı bölümlerinden elde ettikleri ekstraktlardan, hidrofilik biyofenollerin tanımlanması ve miktar tayini yapılmıştır. Hedef biyofenollerin tanımlanması ve belirlenmesi için sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC/MS/MS) ile üçlü kuadropol (QQQ) kütle dedektörü kullanılmıştır. Elektrospray iyonizasyon ile negatif iyon modunda çalışılmıştır. Çalışmada hidroksitirozol, verbeskozit, luteolin-7-glikozit, apigenin-7-glikozit, oleuropein, luteolin, apigenin ve diosmetin tayin edilirken, yaprak örneklerinde sadece verbeskozit, luteolin-7-glukozit, apigenin-7-glikozit ve oleuropein belirlenmiştir.

Fu vd. (2010) çalışmasında, HPLC, ESI-TOF-MS ve iyon tuzaklı tandem ESI-IT-MS^2 gibi güçlü teknikler kullanılarak, zeytin yaprağı ekstraktlarında, fenolik bileşiklerin yapı taraması yapılmıştır. Sistemlerde küçük parçacık boyutlu C18 (1,8μm) kolon kullanılmış veyüksek çözünürlük ile pek çok izomerin birbirinden ayrılarak yapısının aydınlatılması amaçlanmıştır. Yapısal karakterizasyon ESI-TOF-MS ile yapılırken, parçalanma ürünlerinin doğası ESI-IT-MS^2 sistemi tarafından aydınlatılmıştır.

Salah vd. (2012), Tunusta sekiz farklı *Olea europea* türünde yaptıkları çalışmada, 1g zeytin yaprağı 20 ml, 70:30 (v/v) EtOH-su çözücü sistemi ile ekstrakte edilmiş, majör bileşen oleuropeinin HPLC ile miktar tayini ve EtOHlü ekstraktlarda toplam fenol, toplam flavanoid, toplam antioksidan (DPPH, β-carotene ve FRAP) analizleri yapılmıştır. Araştırmacılar tarafından ekstraksiyon verimi 28,33-46,00 toplam fenol 73,05 ± 15,52-144,19 ± 10,27 mg GAE/g kuru madde, toplam flavanoid 56,57 ± 6,0- 125,64 ± 3,36 mg CE/g kuru madde, oleuropein miktarı 30,76 ±2,64- 57,24 ± 2,05 mg/g kuru yaprak, toplam antioksidan 7,90 ± 0,56-18,64 ± 7,43 IC_{50} (μg/ml) ve 0,54 ± 0,00-0,84 ± 0,03 FRAP olarak verilmiştir.

Gentile ve Uccella (2014), Coratina zeytin bitkisi callus kültürlerinden biyofenoller ile sekoiridoid biyofenolleri ve bunlar arasındaki denge modellerini belirlemeye çalıştıkları çalışmada, temel biyofenoller olarak hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve verbaskozit, sekoiridoit biyofenol olarak oleuropein ve ligstrosit, bunlarla birlikte eser miktarda oleurosit ve bu biyoaktif yapının dimetil ve diglukosit formları, HPLC-elektosprey iyonizasyonlu kütle spektrometresi (HPLC-ESI-MS) birleşik sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada yapıların pKa değerleri ve bağ ayrışma entalpileride (BDE) hesaplanmıştır. pKa hesaplamaları için Hammett tipi denklem, entalpi hesaplamaları için yarı empirik metod PM3 ile kısıtlı Hartree–Fock (UHF) uygulamaları ile birleştirilmiş ve geometri optimizasyonu için konjügat gradyan yöntemi (Polak-Ribiere algoritması) kullanılmıştır. Oleuropein için pKa değerleri; aril 3-OH için pKa_1 9,70±0,10 ve 4-OH için pKa_2 değeri 12,52 ± 0,20 olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar; inceledikleri çalışmalar içinde Furia vd. (2010), zeytin yaprağından oleuropeinin potansiyometrik titrasyonla pKa değerlerini belirledikleri çalışmanın sonuçlarında; oleuropeinin hidroksitirozol-katekol yapısı nedeni ile hafif asidik olduğunu ve pKa_1 ve pKa_2 değerlerinin sırası ile 9,25; 13 bulunduğunu belirtmişlerdir.

2.6 Genel Kemometrik Uygulamalar

Ranalli vd. (2006), çalışmasında zeytin yaprağındaki oleuropein içeriğine sadece genetik faktörlerin etkisi değil, aynı zamanda yaprakların rengi ve yaşı arasındaki ilişki ve örnekleme zamanı da incelenmiştir. Analizler için HRGC ve HPLC metodları geliştirilmiş, bu metodlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir. İtalya'nın farklı türlerine ait zeytin yapraklarından katma değeri yüksek bir molekül olan oleuropeinin geri kazanımı hedeflenmiştir. Aynı zamanda oleuropeinin güçlü biyoaktif özelliklere sahip olan hidroksitirozole dönüştürülmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar, çeşitli kemometrik yöntemlerle (PCA, HCA, CART-classification, regression tree) değerlendirilmiştir.

Di Donna vd. (2010) çalışmasında, HPLC/ESTandemMS ile *Olea europaea* bitkisinden, yeni fenolik bileşikler tespit edilmiştir. İtalya'da zeytin ağaçlarının çeşitleri arasında ki, farklılığı ayırt etmek için uygun işaretleyici yöntem geliştirilmiştir. Beş çeşit (Carolea,

Cassanese, Coratina, Nocellara ve Leccino) ayrım için uygun bulunmuştur. Üç farklı coğrafi bölgede (Rende, Mirto ve Spoleto, İtalya) yetiştirilen Carolea numuneleri, olası farklılıkları değerlendirmek için kontrol olarak çalışılmıştır. Üç denetimli model tanıma prosedürü; lineer diskriminant analizi (LDA), yumuşak bağımsız sınıf benzetim modelleme (SIMCA) ve K-en yakın komşu (KNN), beş çeşide karşılık gelen beş grupta ve üç üretim alanına karşılık gelen üç grup örneği sınıflandırmak için kullanılmıştır. Sonuçlar, LDA ve SIMCA modellerinin, çeşitler için iyi tahmin yüzdesi verdiğini, yanı sıra yetiştirme bölgelerinin gerçekleştirilmesine de izin verdiğini, oysa KNN modelinin, en azından bu çalışmada dikkate alınan zeytin ağaçları için, çeşitlerde uygun bir tahminleme yapamadığını göstermektedir.

Aouidi vd. (2012), yaptıkları çalışmada zeytin yaprağının en önemli bileşiği olan oleuropein, HPLC sistemine alternatif olarak mid-IR spektroskopisi ile analizlenmiştir. Tunus'a ait beş farklı zeytin türünde (Chemlali, Chetoul, Meski, Sayali ve Zerrani) oleuropein miktarı tayin edilmiştir. Kemometrik olarak örnekleri rastgele ayırmışlar, 73 örnek kalibrasyon seti için, 32 örnek validasyon seti için kullanılmıştır. PLS (partial least squares) regresyon algoritması ile oleuropein miktarı, referans verisi kullanılarak spektral veri setleri korelasyonu yapılmıştır. Sonuçlar PLS metodun, oleuropein miktarının kantitatif tayini için uygun bir model algoritması olduğunu, tahmini bağıl hatasının % 8,5, en yüksek oleuropein miktarının % 17,7 olduğu bildirilmiştir.

2.7 Sıvı Kromatografide Metod Geliştirme ve Optimizasyon

Kaufmann (1995) 'ın çalışmasında, kromatografik optimizasyon için, çok değişkenli üç adımlı bir strateji açıklanmıştır. Bu stratejinin ilk adımı bir öngörü yöntemidir ve başlangıçtaki çözücü seçimini gerektiren zor bir aşamadır. Bu aşama, çok boyutlu çözücü özelliği aralığında, hedef bölgeyi amaçlayan, literatür bilgisine ve keşif adımlarına dayanır. Stratejinin ikinci adımında, hedeflenen arama alanı pH, sıcaklık, akış hızı gibi sistem değişkenleri de dahil edilerek, çok azaltılmış faktöriyel tasarım kullanılarak tanımlanmıştır. Stratejinin üçüncü ve son adımında, faktöriyel tasarım stratejisi, optimum kromatografik koşulların etki alanı içinde tahmine izin veren, kısmi en küçük kareler (PLS) modeli oluşturmak için kullanılmıştır. İstatistiksel deneysel tasarım, çalışmaların

her bir adımında üretilen stratejilerin farklı aşamalarında kullanılmıştır. Kullanılan tasarımlar, azaltılmış fraksiyonel faktöriyel tasarım ve Plackett-Burman tasarımı, CODEX yazılımında üretilmiştir. Doğrusal olmayan haritalama uygulaması, MATLAB'da euclidean uzaklık fonksiyonu kullanılarak geliştirilmiştir.

Analitik yöntemin dayanıklılığın değerlendirilmesi, genellikle ileri doğrulama (validasyon) için gereklidir. **Goga-Remont vd. (2000)**, yöntem geliştirmenin erken basamaklarında sağlamlığı göz önünde bulundurarak yapılan çalışmaların, önemli hataları ve iş hacmini önleyebileceğini bildirmiştir. Bu çalışma, optimizasyon yazılımı OSIRIS'in kullanıcıya, yöntem geliştirme prosesi süresince yardımcı olabileceğini ve bu yazılımın sağlamlığı dikkate aldığını belirtmektedir. Analiz koşullarının dayanıklılığı, optimizasyon prosedürü boyunca seçicilik kadar iyi değerlendirilmiştir. Bu optimizasyon yazılımı, önceden tahminlenen yorumsal metodlardan oluşmaktadır ve parametre boyutunda minimum sayıda deneme kullanılarak, ilk çözünenin alıkonma noktası modellemesi ile optimum koşulları belirlemektedir. Bu kapsamda cevap fonksiyonunun seçimi çalışılmıştır. Bu cevap faktörü (Rs), analiz süresi, minimum çözünürlük ve sağlamlık kriterleri ile birlikte dikkate alınmıştır. Bu üç kritere göre, optimum koşulların tanımlanması sağlanmıştır. HPLC sisteminde yöntem geliştirme çalışmaları sırasında, birden fazla eşik yaklaşımı beklenmedik sonuçlara yol açmaktadır. Çok ölçütlü cevap fonksiyonu, Derringer'in desirability fonksiyonu gibi oldukça uygun fonksiyonlarla, hedef değerleri iyi tanımlanmış değişkenlerle uygun pareto çözümler sunmaktadır. Bu çalışma ile Desirability fonksiyonu ile çoklu eşik yaklaşımı (Multiple Threshold Approach) karşılaştırılmış, her iki yöntemin avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir.

Cela vd. (2003) evrimsel algoritmalar (EA) kullanarak yapılan çok amaçlı optimizasyon çalışmasının, analitik kimyada kromatografi alanında, ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) gradient ayırım için geliştirilen, ilk otomatik optimizasyon modeli olduğunu bildirmiştir. Bu yeni yaklaşımın, optimizasyon prosesinde kromatografik amaçların kolay ve direkt tanımlanmasına izin verdiği ve tek taraflı optimum çözümleri değil, baskın olmayan kalabalık ön pareto çözümleri sağladığı vurgulanmıştır. Böylece artık otomatik optimizasyonun, son yıllarda kromatografik kalite değerlendirmesine esas olan kromatografik cevap fonksiyonları (CRF'ler) kullanımını

gerektirdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, optimizasyon prosesinin temel adımları ve evrimsel algoritma için yeni başlatma modlarını içeren yeni araçları sunulmuştur. Endişe verici onbir ilaç kalıntısının ayrımı, bu yeni yaklaşımda pratik avantajları ve çalışma prosedürlerini göstermek için örnek olay ve veri seti olarak kullanılmıştır. Araştırmacılar tarafından, HPLC ayırımının tam otomatik çok amaçlı optimizasyonu sırasında kullandıkları, yeni güçlü kemometrik araçlarla, kromatografi laboratuvarı donanımının geliştirilebilir olduğu gösterilmiştir.

Petkovska vd. (2008) çalışmasında, Hızlı Çözünürlük Ters Faz Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (RR RP-HPLC) yöntemi geliştirilmiş ve atorvastatinin ile yedi adet ilişkili bileşiğin eşzamanlı belirlenmesi, valide edilmiştir. Optimizasyon (tam faktöryel 32 tasarım) ve dayanıklılık (robustness) testi sırasında, deneysel tasarım yöntemi (merkezi kompozit tasarım) kullanılmıştır. Yöntem, bir dikdörtgen tasarım için iki faktörlü bir polinomal kullanan, ayırma gücü (R_S) modellemesine dayanmaktadır. Bir seçim kriteri olarak, bireysel R_S değerlerinin en az elde edilen değeri olan 2,5 kullanılmıştır. Çeşitli organik faz varyasyonlarında, her biri üç farklı seviyede olacak şekilde, gradient elüsyon (x_1) ve gradient süresi (x_2), belirlenen iki faktör olarak araştırılmıştır. Dokuz deney yapılmış ve tüm ardışık tepe çiftlerinin Rs değerleri hesaplanmıştır. Optimum koşulları belirlenen kromatografik analizde, mobil faz olarak pH 3.5 fosfat tamponu ve % 10 (v/v) tetrahidrofuran (THF) organik modifiyeri içeren MeCN karışımı ile C18 analitik kolon kullanılmıştır. Deneysel tasarım sonrası belirlenen model denkleminde, hızlı çözünürlük üzerinde; THF yüzdesinin nispeten küçük bir etkiye sahip olduğu, gradient zaman artışının R_S değerini azalttığı, gradient elüsyon süresince organik fazın artışının pikler arasındaki çözünürlüğü azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak cevap yüzeyi metodunun, tüm faktörler için uygun olduğu, analizlerle teyit edilmiştir. Çalışmada, R_S ile belirlenen değerler bağımlı değişken olarak kullanılıp, CRF bağımsız değişkeni için 16 noktalı tasarım yapılmış ve optimizasyon koşulları iyileştirilmiştir. Model (ANOVA) varyans analizi ile valide edilmiştir. Araştırmacılar tarafından metodun; basit, hızlı, impürite belirlemeleri için güçlü, kabul edilebilir bir doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve seçicilik sağladığı belirtilmiştir.

Al-Bakain vd. (2011), iki boyutlu kromatografik sistemlerin tasarımı ve iki ayırım arasındaki en yüksek ortagonalite beklendiği zaman fazlı sistemin seçiciliği birincil endişe kaynağı olduğunu ve ortagonalitenin derecesini ölçmek için, çeşitli istatistik ve geometrik kriter kullanılabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmada sekiz aday kriter karşılaştırması yapılmıştır. Herbir kriter arasındaki ilişki ve pH, sabit faz, organik modifiyer gibi faktörlerin etkisinin önemi, varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Deneysel olarak, geniş bir aralıkta fizikokimyasal özelliklere sahip biyolojik ve/veya çevresel numunelerden (asidik, bazik ve nötral pKa, moleküler kütle, hidrofobisite logP gibi) oluşan, 32 kromatografik sistemlik bir set, aynı cins gradient koşulda, 63 derinlemesine çözüm ile değerlendirilmiştir. Her bir kromatografik sistem; sabit fazın (8 farklı silika veya dolgu kimyasalı ile kaplı) doğası, mobil fazın sulu fazının pH değeri (2.5 veya 7.0) ve organik modifiyerin (MeCN ve MeOH) doğası ile tanımlanmıştır. Kromatografik sistemlerin 496 çiftinin ortagonalitesi değerlendirilmiş ve sekiz farklı yaklaşımla sıralanmıştır. Bu yaklaşımlar: üç korelasyon katsayısı (Pearson, Spearman ve Kendall), iki geometrik kriter, iki boyutlu ayırma alanının yorumsal tanımlanması, Slonecker bilgilendirme benzerliği, normalize edilen alıkonma zamanlarının arasındaki serbestliğin iki *chi-square* (ki-üstiki sınaması: ölçülen sıklık dağılımının kuramsal dağılıma uygunluk derecesini belirlemek üzere Karl Pearson tarafından önerilmiştir. İstatistikte her değişkenin ölçülen ve beklenen değerleri arasındaki farkın karesinin beklenen değere bölümünün toplamı) istatistiğidir. Araştırmacılar; Kendall korelasyon katsayısının, tüm deneysel faktörler için yüksek duyarlılık sergilediğini ve ANOVA'ya göre ortagonallik için en iyi ölçüm olduğunu belirtmiştir. Ortagonaliteyi etkileyen faktörler karşılaştırıldığında, mobil fazın pH değeri seçicilik üzerinde en yüksek etkiye sahip olduğu, bunu kolon sabit fazının türü ve organik modifiyerin izlediği vurgulanmıştır.

Rakiç vd. (2013) çalışmasında, (DoE) metodolojik deney tasarımı kullanarak hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) için, metod geliştirme stratejisi sunulmuştur. Çoklu eşik tasarımı yaklaşımı uygulanarak, aynı anda üç optimizasyon hedefi elde edilmiştir. Eş zamanlı optimizasyonun amacı analiz edilen maddelerin yeterli derecede ayrılması, en kısa analiz süresi ve elde edilen optimum değerlerin maksimum sağlamlığıdır (robustness). Sonuçta, optimal ayırım şartları sistem (grid) noktası taraması ile

sağlanmıştır. Bu çalışma ile araştırmacılar kompleks karışımların hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) ile ayrılması için çok amaçlı optimizasyon çalışmasının uygunluğunu vurgulamıştır. Seçilen model karışımında, psikotropik ilaçlardan klozapin, tiyoridazin, sulpirid, feniramin ve lamotrijin bulunmaktadır. Mobil faz kompozisyonu ile ilgili üç faktör, MeCN içeriği, su fazının pH değişimi ve amonyum asetat konsantrasyonu, bağımlı değişkenler olarak belirlenmiş ve hedeflere ulaşmak için optimize edilmiştir. Bu yöntem metod geliştirmenin doğrulama aşamasında başarısızlık riski düşük olan, güvenilir bir onaylama (validasyon) safhası sunar. Ön araştırmalarda boş silika kolon durağan faz olarak kullanılmış, mobil faz bileşiminde MeCN miktarı yüksek oranlarda, su miktarı ise düşük oranlarda tutularak amonyum asetat tamponu uygulanmış ve asetik asit ile pH ayarlaması yapılmıştır. Box-Behnken deney tasarımı uygulanmış, cevap değişkeni olarak; her bir ilaç etken maddesinin alıkonma faktörleri (k_1-k_5) ve kromatogramda son iki tür için seçicilik faktörü ($\alpha_{4,5} = k_5/k_4$) kullanılmıştır. Bütün bağımlı değişkenler için eş zamanlı optimizasyon, çoklu eğim yaklaşımıyla, sistem (grid) noktası taraması ile elde edilmiştir. Model denklemleri oluşturularak, her iki model de tatmin edici R^2 ile karakterize edilmiş ve düzeltilmiş R^2 (0.9) değerleri de yüksek bulunmuştur. Bu yüzden tasarım yüzeyinin optimizasyon için kullanılabilir olduğu belirtilmiştir. Optimum ayırım koşulları, MeCN içeriği % 83, su fazında amonyum asetat içeriği 14 mM ve pH 3.5 olarak belirlenip, deneysel olarak teyit edilmiştir.

2.8 Metod Geliştirmede Ayırma Gücü (R) Yerine, Yeni Kromatografik Cevap Faktörü (CRF) Uygulamaları

Duarte ve Duarte (2010), çalışmasında kompleks organik karışımların yani farklı kaynaklardan (atmosferik, sulu ve karasal) gelen doğal organik maddelerin, moleküler boyuttaki dağılımının belirlenmesi için düzenlenen, optimal kromatografik ayrım protokolleri hedeflenerek, yeni bir kromatografik cevap fonksiyonu sunulmuştur. Önerilen CRF'nin, asimetrik ve üst üste binmiş pikler ile bilinmeyen çözeltilerin karışımlarına uygulanabilir olduğu (pik çiftlerinin yüksek eşitsizlikteki alanlarının ayrım süreçlerinin tanımlanmasında iyi bir yeterlilikte olduğu) belirtilmiştir. Geliştirilen CRF fonksiyonunun performansı, simüle kromatogramlar kullanılarak, var olan bir yanıt fonksiyonu ile karşılaştırılmıştır. Yeni fonksiyonun kapasitesini tanımlamak için farklı

kromatografik şartlar altında, ulaştığı çözünürlük derecesi, iki seviyeli tam faktöriyel tasarım yolu ile farklı organik bileşiklerin çeşitli boyut-eleme kromatografisi (size-exclusion chromatography) çalışmaları sayesinde belirlenmiştir. Araştırmacılar bu fonksiyonun, mobil faz kompozisyonu (pH, iyonik kuvvet ve organik modifiyer konsantrasyonu) ve instrümental değişkenlerin (akış hızı) eş zamanlı optimizasyonu için güvenilir bir alternatif yöntem olduğunu kanıtlamıştır.

Stojanovic vd. (2011), çalışması yeni bir kromatografik cevap fonksiyonunun (N_{CRF}) tasarlanması ve optimizasyon stratejilerinin kullanımı için önerilmiştir. N_{CRF} fonksiyonunun kapasitesi ve genel kalitesinin, diğer iki objektif (CRF ve CEF) fonksiyona göre daha doğru ve güvenilir sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır. Yeni CRF fonksiyonu ayırma ve zaman terimi tahmini kavramlarını geliştirmiştir. Bu durumun kromatogramdaki tüm önemli defektleri, örneğin üst üste gelmiş veya asimetrik pik görünümleri, uzatılmış elüsyon zamanı (çok uzun analiz süresi) gibi durumların herbirinin ağırlıklı etkisini ve önemini yansıttığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Raloksifen ve dört impüritesinin sıvı kromatografi ile ayırımı için (CCD) merkezi kompozit tasarımı seçilmiş ve deneysel tasarımda sistemin çıkış değişkeni olarak yeni CRF fonksiyonu kullanılmıştır. Bu fonksiyonun, ayırma şartlarının belirlenmesinde yönlendirici ve karışım davranışları üzerinde etkili olan, seçilmiş kromatografik parametrelerin (mobil fazdaki MeCN içeriği, su fazında sodyum dodesil sülfat konsantrasyonu, mobil fazın pH'ı ve kolon sıcaklığı) kompleks etkileşimleri üzerinde söz sahibi olduğu gösterilmiştir.

Matos vd. (2012) çalışmasında, yeni esnek kromatografik cevap fonksiyonları (CRF), ($DCRF_f$) tek boyutlu ve ($DCRF_f$, 2D) iki boyutlu kromatografi için kompleks numunelerin tek hedefi olmayan kromatografik analizinde, ayırmanın kalite indeksi tahmini için test edilmiş ve öne sürülmüştür. Daha önceden denenmiş fonksiyonlara dayalı bu fonksiyonların üç kesin kriteri vardır; kromatografik piklerin sayısı, kromatografik ayırımın derecesi ve analize harcanan zaman. Ancak bu fonksiyonun, mevcut fonksiyonlara benzememekte ve farklı olduğu vurgulanmıştır. DCRF fonksiyonları, kesin tartımlara ve kriterleri ayarlayacak ve düzenleyecek analistlere ihtiyaç duyar. Özel ilgi gösterilen durum, analizde boşa giden zaman için bunu telafi eden

zaman kazandıran kriterlerdir ve kromatografik sistemler zamana bağlı uygulamalara izin vermektedir. Cevap fonksiyonlarının geliştirilmesine dayalı stratejilerin esnekliği ve performansı, farklı kromatografik senaryolarla ve çeşitli uygulama olasılıkları da simüle edilmiş kromatogramlar kullanılarak test edilmiştir. Bu yeni kromatografik cevap fonksiyonu, kromatografik optimizasyonlarda ki gerçek problemler için ağırlık kavramını içeren uygun kriterlerde, esnek stratejiler sunmaktadır. Esneklik; yeni CRF'nin sağlamlığını test etmeyi ve her bir kriterin ayrı ayrı uygunluğunu kontrol ederek, farklı senaryoları ölçmeyi sağlamaktadır. Logaritmik ağırlıklı zaman tasarrufu kriteri için başlangıçta, uygulamaların tam aralığı için güvenilir sonuçlar elde edilmesi sağlanmalıdır. Araştırmacılar yeni ağırlıklı ve esnek CRF yi, 1D ve 2D simüle edilmiş kromatogramlarla eşleşen, 15 farklı optimizasyon senaryosunu dikkate alarak, eşleşen en uygun kromatografik optimizasyonun, en yüksek olasılıklı durumları kullanılarak test edilmiştir. DCRF fonksiyonunun, başarıyla uygulandığı, ağırlıkları farklı kombinasyonlara kolayca adapte olduğu ve her kritere yeterli cevap verdiği kanıtlanmıştır.

2.9 Metod Geliştirmede Alıkonma Modeli Uygulamaları

Gritti ve Felinger'in çalışmaları literatürde preparatif kromatografide aşırı yükleme sorunları ve doğrusal çözücü gücü modeli-linear solvent strength model (LSSM) ile genel adsorpsiyon modelinin bir arada düşünüldüğü az sayıdaki çalışmanın temelini oluşturmaktadır. **Gritti vd. (2003)** yılında yaptıkları çalışmalarında**,** fenolün aşırı yüklenmiş band profilleri C18 kolonda gradient elüsyon şartlarda ölçülmüştür. Mobil faz olarakMeOH-su karışımı kullanılmıştır. Organik modifiyer MeOH hacim oranı 0-0,5 arasında değiştirilmiştir. Genel adsorpsiyon modelinde, fenol adsorpsiyonun miktarı q*, konsantrasyonu C ve mobil fazın organik modifiyerinin kompozisyonu φ ile ifade edilmiştir. Empirik modeller, daha önce ki frontal analiz (FA) ve karakteristik nokta ile frontal analiz çalışmalarına dayandırılarak türetilmiştir. Buna göre genel model, izokratik olmayan koşullar için Bilangmuir modelin basit, heterojen, genişletilmiş hali olmuştur. Doğrusal çözücü gücü modeli (LSSM)'nin düşük enerjili bölgesi izlenmiş, ama yüksek enerjili bölge izlenmemiştir (ki bu bölgenin φ ile doygunluk kapasitesi doğrusal azalmaktadır). Genel model, gradient elüsyon koşullarının band profillerinin deneysel ve

simüle edilmiş verilerinde, doğrusal ve doğrusal olmayan koşullarda valide edilmiştir. Band profilleri kromatografinin denge-dağıtım modeli ile sonlu farklar algoritması kullanılarak hesaplanmıştır. En iyi durum, gradient adımı (Δφ) % 0-50 MeOH, gradient zamanı t_g 20,25,30,40,60,80 ve 100 dakika kullanılarak gözlemlenmiştir. Gradyan adımların en iyi olduğu koşulların %5 - 45 (t_g = 25 dk), %5 -35 (t_g = 50 dk), %5 - 25 (t_g = 50 dk) ve % 5 - 15 (t_g = 50 dk) olduğu belirlenmiştir.

Kamel ve Hadjmohammadi (2008) çalışmasında, dokuz klorofenol bileşiğinin HPLC ile ayırımının çözünürlük ve analiz zamanının eşzamanlı optimizasyonu için, çoklu doğrusal gradient elüsyon uygulanmıştır. İlk ilişki, herbir analit için izokratik alıkonma zamanı kullanılarak φ'ya karşı lnk'nın belirlenmesidir. Analitlerin gradient alıkonma zamanlarının tahminlenmesi için temel denklem nümerik olarak çözülmüştür. Daha sonra herbir yeni koşul altında kromatogramların simülasyonu yapılmış ve simulasyon için, grid tarama programı kullanılmıştır. İki farklı kromatografik amaç hedeflenmiştir. Analiz süresi ve bitişik komşu pikler arasındaki uzaklık amaçları, herbir pik için Derringer desirability (istenebilirlik) fonksiyonu kullanılarak değerlendirilmiştir. Sigmoid fonksiyonu desirability değerlerinin optimizasyon kriterlerine dönüştürülmesi için kullanılmıştır. Araştırmacılar tarafından, optimum koşullar altında kromatografik cevap fonksiyonunun tahmini ve deneysel değerleri arasında, 40 dk'dan küçük analiz süresi için uygun olduğu gözlenmiştir.

HPLC de çözünen maddenin alıkonma davranışlarının tahminlenmesi için, çeşitli *alıkonma modelleri* geliştirilmiş ve kabul edilmiştir. Gradient elüsyonda alıkonma zamanları başarılı bir şekilde tahmin edilebilir olsada, elüe edilen piklerin teorik plaka sayısı, komşu pikler arasında çözünürlük ve asimetri faktörleri gibi temel parametrelerin tahminlenmesi zordur. *Snyder alıkonma modeli*, izokratik ve gradient şartlarda alıkonma davranışını tahmin etmek için yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Ancak mobil fazda kullanılan organik modifiyerin nispeten küçük miktarlarında, çözünenin alıkonma davranışlarını yakından izleyememek gibi kritik kusuru bulunmaktadır. Bu durum, alıkonma faktörünün logaritmik değeri ve mobil fazdaki organik modifiyerin hacimsel oranı arasında ki doğrusal olmayan ilişkinin sonucudur. Bu eksikliğin üstesinden gelmek için modifiye edilmiş alıkonma modeli birçok doğrusal gradient şartın alıkonma

zamanının tahminlenmesi için benimsenmiştir. Herhangi bir gradient koşulunun içine ayrık adım gradient şartları (discrete step gradient) yerleştirilmiş bir nümerik metod, gradient elüsyonun alıkonma zamanlarının tahminlenmesi için önerilmiştir Model, gerçek (elde edilen gradient profilleri de dahil olmak üzere), doğrusal olmayan ve çoklu doğrusal gradient koşulları uygulamak için uygundur. Araştırmada iki çeşit organik modifiyer, MeOH ile MeCN ve çözünen olarak dört adet pürin bileşiği kullanılmıştır **(Lee ve Row 2008).**

Pappa-Louisi vd. (2008) ters faz sıvı kromatografide gradient koşullar altında organik modifiyer konsantrasyonu φ ve sıcaklık T etkisini birarada değerlendirdikleri çalışmalarında, T sabit φ gradienti ve φ sabit T gradienti durumları, hem teorik hemde deneysel gradient durumlarında incelenmiştir. İki yaklaşım incelenmiştir. İlk yaklaşım çözünen örneğin alıkonma zamanının tahmini, çözünenin izokratik/izotermal özelliklerine dayanır. İkinci yaklaşım, 2D kromatografinin izokratik/T gradienti veya izotermal/φ gradienti, alıkonma verisi için uygun aıkonma modelinin direkt uygunlanmasına dayalıdır. Bu yaklaşımlar, alkilbenzenlerin MeCN elüsyon sistemlerinin kullanıldığı durumlarda test edilmiştir. Araştırmacılar her iki yaklaşımın önkoşullar altında mükemmel sonuçlar verdiğini belirtmiştir. Ancak ilk yaklaşımın T sabit φ gradienti, φ sabit T gradient geçiş koşullarının herhangi birinde alıkonma zamanının tahminlenmesinde önemli avantaj sağladığı açıklanmıştır.

Nikitas vd. (2011) çalışmasında, çoklu doğrusal gradient elüsyonun temel denklemlerle analitik çözümü için iki durum türetilmiştir. Organik modifiyerin (φ) hacim fraksiyonunun logaritmik alıkonma çözümü (lnk) ile ilişkisi olduğunda, durum üç parametreli logaritmik ifadedir ve ln k ile ln φ arasında basit doğrusal bir ilişki olduğu kabul edilir. Çoklu doğrusal gradient koşullar altında, alıkonma zamanı için türetilen teorik ifadeler, gradient verilerinin uygunlanması için türetilen basit algoritmaları ve özellikle çözünürlük optimizasyonunu somutlaştırır. Pürinler, pirimidinler ve nükleositler arasından seçilen bileşiklerin MeCN ile modifiye edilmiş elüsyon sisteminde, 16 model karışımı kullanılarak performansları incelenmiştir. Alıkonma davranışlarının çözümü için basit logaritmik ifadeler olsa bile, ln φ üzerine ln k doğrusal bağımlılığı kullanılarak tahminlenen gradient alıkonma zamanının doğruluğu, oldukça yeterli bulunmuştur.

Nikitas vd. 2012 yaptıkları çalışmada, iyonlaşabilen analitlerin alıkonma zamanı için doğrusal pH gradientine ilişkin yeni ifadeleri (Kaliszan−Wiczling's yaklaşımları) gözden geçirmiştir. 1/k ya karşı pH grafiği için ideal doğrusal pH gradient koşullarının en iyi modeli açıklanmıştır. Burada k analitin alıkonma faktörüdür. Ancak gerçek deneysel koşullar altında, ideal olmayan çeşitli regresyon prosedürlerini örneğin pH gradient profilinin doğrusallıktan sapması ve pK nın organik modifiyer üzerindeki etkisi gibi durumları telafi etmek için, modelin uygunlanma ve tahmin performansı, onun yeteneklerine bağlı olduğu bildirilmiştir. Genel olarak incelenen tüm modeller iyi bir uygunlama ve tahmin performansı sergilemiş ve en iyi modelin 1/k ya karşı pH grafiği için cebirsel sigmoid fonksiyonuna dayandığı belirtilmiştir. Araştırmacılar bu modelin temel zayıflığının -gradient elüsyonun temel denklemlerinin çözümüne dayalı bu model kadar iyi olan tüm modellerde olduğu gibi- alıkonma zamanını veren ifadelerin oldukça karmaşık olduğunu bildirmiştir. Alıkonma zamanı programlanmış gradient zamanla belirlenen durumlarda, basit doğrusal modeller kullanılarak bu zayıflığın üstesinden gelinir. Bu modeldeki gradient eklemeleri de olumsuzluklardan etkilenmemektedir.

Fasoula vd. 2013 çalışmasında; ters faz sıvı kromatografisinde organik modifiyer geadienti boyunca, iyonlaşabilen analitlerin alıkonma zamanına, mobil faz pH'ının etkisi çalışılmıştır. Herhangi bir sabit pH'da bulunan organik modifiyerli mobil fazın gradient koşullar altında, çözünenin alıkonma tahmini için iki yaklaşım incelenmiştir. Birinci yaklaşımda monoprotik asit/bazlar için doğrusal organik modifiyer gradientinde, belirli varsayımlar altında temel denklemin analitik çözümü önerilmiştir. İkinci yaklaşım, gradient alıkonma verilerinin değerlendirilmesinden kaynaklanan bir ampirik modele dayanmaktadır. Her iki yaklaşımda başarılı bir şekilde uygulanarak, 16 OPA türevli amino asitin verilerinden elde edilen 19 adet basit tekli-doğrusal organik modifiyer gradient çalışmasının modellenmesinde, iki farklı MeCN içeriği ve farklı mobil faz pH'ı ile farklı gradient süreçleri tanımlanmıştır. Burada amino asitler zayıf monoprotik asit gibi davranmıştır. Bu çalışma aynı zamanda, iyonlaşabilen bileşiklerin gradient ayırımını optimize etmek için güvenilir bir yöntem sağlamaktadır.

3. KURAMSAL TEMELLER

3.1 *Olea Europaea* L. Bitkisinin Özellikleri ve Polifenolik Yapıları

Zeytin bitkisi dünyadaki en dayanıklı ağaçlardandır. Yaprağı asırlardır yeryüzünde yetiştiği tüm bölgelerde halk tarafından çeşitli hastalıkların geleneksel tedavilerinde kullanılmaktadır. *Oleaceae* ailesi veya dikotiledonların sınıfına ait yaprak döken ağaçlar ve çalılar dahil olmak üzere yaklaşık 30 cins içerir ve zeytin ağacı ve akrabalarının sınıflandırılmış 600 türü bulunmaktadır. *Oleaceae* ailesi, *Fontanesieae, Forsythieae, Jasmineae, Myxopyreae* ve *Oleeae* gibi çeşitli cinslere ayrılmıştır.

Bu familya dünyanın tropik, sub-tropikal ve ılıman bölgeleride dahil olmak üzere Antarktika hariç tüm kıtalarına yayılmıştır. *Oleaceae* Asya'da ve Malezyanın özellikle tropik ve ılıman bölgelerinde en iyi şekilde yetişir. Olea'nın kökeninin; Yunanca "elaia" ve Latince "oleum" kelimelerinden türediği düşünülmektedir. Olea türü farklı cinsler içermesine karşı *Olea europaea* L. cinsi Olea familyasının en popüler üyesidir. Gıda olarak kullanılır ve Akdeniz bölgesinde bulunan tek cinsdir. Zeytin ağaçları normalde Doğu Akdeniz havzası kıyı bölgelerinde, Akdeniz bitişik kıyı alanları, Hazar Denizi nin güneyinde, İranın kuzeyi, Batı Asya ve Kuzey Afrika'nın güney ucunda yayılım gösterir (Hashmi vd. 2015).

(*Olea europaea* L.)'nin anavatanı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya ile Mardin, Hatay, Suriye, Filistin ve Kıbrıs adasını içerisine alan bölge olarak kabul edilmektedir (Şekil 3.1) (Anonim 2013). Bir Akdeniz bitkisi olan zeytin, anavatanından Yunanistan, İtalya ve İspanya'ya adalar yoluyla geçmiştir ve Akdeniz ülkelerinin tamamında yetiştirilmektedir (Anonim 2015).

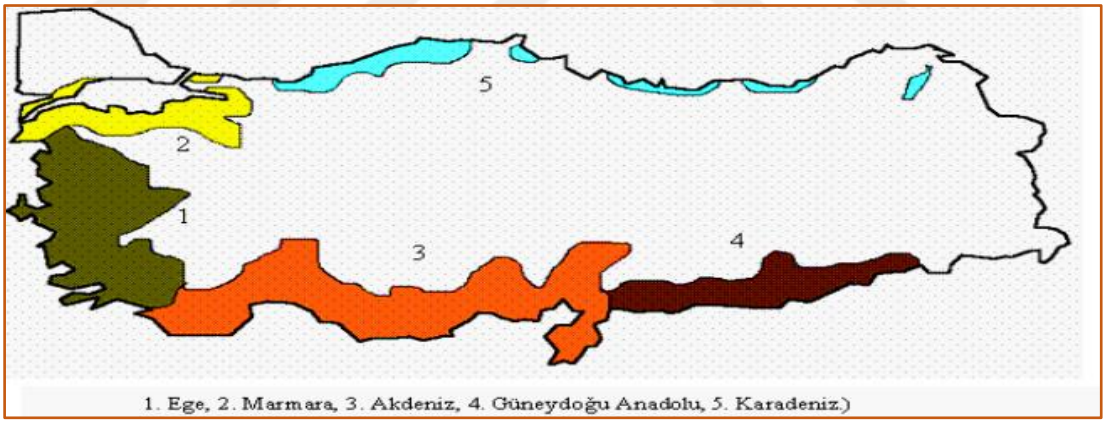
Dünya genelinde 10 milyon hektarın üzerinde zeytinlik mevcuttur ve bu zeytinliklerin %95'inden fazlası Akdeniz ülkelerindedir. 7 kıtanın 6'sında ve yaklaşık 25 ülkede zeytin üretimi yapılmaktadır. İspanya, 2,5 milyon hektar ile dünya zeytin üretim alanının %24,3'ünü sınırları içerisinde bulundurmaktadır. İspanya'yı %17,7 ile Tunus, %11,1 ile

İtalya ve %9,0 ile de Yunanistan izlemektedir. Türkiye, % 8 ile dünya zeytin üretim alanı bakımından 6. sırada yer almaktadır.



Şekil 3.1 Zeytin üretiminin yayılışı (Anonim 2013)

Türkiye'de, zeytin üretim alanı, 2004 yılından bu yana düzenli olarak artış göstermiştir. 2004 yılında toplam zeytin dikili alan 633.000 ha iken, 2013 yılında bu değer %30 oranında artarak 825.830 hektara ulaşmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Türkiye'de yoğunluğuna göre zeytin dikili alanlar

Zeytin üretiminde lider ülke konumunda olan İspanya'da, dikili alanlar nispeten istikrarlı bir seyir izlemiş ve geçtiğimiz on yıl içerisinde fazla bir değişim göstermemiştir. Zeytin dikili alanların son 10 yıldaki gelişimine bakıldığında, en fazla alan artışının Fas ve Cezayir'de olduğu görülmektedir. Dünyanın en fazla zeytin dikili alanına sahip ikinci ülkesi Tunus ve daha az alana sahip Libya da hesaba katıldığında Kuzey Afrika

ülkelerinin, dünya zeytin dikili alanlarının %32'sine sahip olduğu görülmektedir (Anonim 2015).

Zeytin ağacının meyvesi zeytin, son derece acı bir tada sahip olduğundan meyve olarak kullanılmaz ve meyve suyu olarak betimleyebileceğimiz zeytinyağı ve işlem görmüş sofralık zeytin olarak tüketilir. Zeytin üretim miktarı bakımından önde gelen ülkeler; İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye'dir. En fazla zeytin dikili alana sahip olan İspanya, dünya zeytin üretimi bakımından da 1. sırada yer almakta, dünya üretiminin %38,6'sını tek başına karşılamaktadır. Zeytin sektörünü, yıllık % 90'lık üretim ile zeytinyağı pazarı belirler. Bu pazarda en önemli payı en büyük üretim ve ticaret hacmi ile İspanya almakta ve onu Akdeniz Bölgesi ülkeleri ile İsrail ve Filistin izlemektedir. Akdeniz Bölgesinde İspanyadan sonra, İtalya, Fransa Yunanistan ve Türkiye diğer üreticilerdir (Doğaka, 2015).

***Olea europaea* L. Bitkisinin Sistematikteki Yeri**

Bölüm	: Spermatophyta
Altbölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Dicotyledones
Altsınıf	: Sympetalae
Takım	: Contortae (Gentianales)
Familya	: Oleaceae
Cins	: *Olea* L.
Tür	: *Olea europaea* L. (Tanker vd. 2004)

***Olea* L. cinsinin genel özellikleri:**

Yaprak dökmeyen ağaçlar veya çalılar, dallar; enine keside yuvarlak veya 4 köşeli; yapraklar; basit, lanseolat-obovat, derimsi, dal üzerinde karşılıklı olarak dizilişli; çiçekler hermafrodit veya poligamorf; kaliks 4 dişli, kısa; korolla kısa, tüp şeklinde ve 4 loblu, stamenler petallere yapışık ve loblardan kısa; filamentler kısa, anterler geniş; meyve yuvarlağa yakın veya oblong şekilli (Davis 1978).

***Olea europaea* bitkisinin genel özellikleri**:

10-15 m boyunda, geniş taçlı, gövdesi çoğunlukla boğumlu, dalları dikensiz ağaç, 2-5 m boyunda, dalları sık ve dikenli olan çalı, yapraklar hemen hemen sapsız, lanseolat veya obovat, 8-86 x 4-24 mm boyunda, mukronat tepelerde koyu yeşil ve tüysüz, alt kısımlarda gümüşümsü gri renkte, çiçek durumu panikula ve yapraklardan daha kısa, çiçekler beyaz renkli, güzel kokulu ve 3-4 mm boyunda, meyva, yuvarlağa yakın veya oblong şekilli, 6-40 x 5-25 mm boyunda, olgunken siyah, kahverengimsi yeşil veya nadiren fildişi-beyaz renkli drupa, bitkinin çiçeklenme zamanı mayıs ayıdır (Davis 1978).



Şekil 3.3 *Olea europaea b*itkisi yaprak, çiçek ve meyve görüntüleri

Türkiye Florası'nda tek *Olea* türü ve bu türün iki varyetesi kayıtlıdır. Bunlar:

1. *Olea europaea L.* var. *europaea* Zhukovsky (Syn: *Olea europaea* L. var. *sativa* Lehr, *Olea sativa* Hoffmanns. & Link)

2. *Olea europaea L*. var. *sylvestris* (Miller) Lehr. (Syn: *Olea sylvestris* Miller, *Olea europaea* L. var. *oleaster* (Hoffmanns. & Link) DC.)

Bu varyetelerin Türkiye'deki yayılımı:

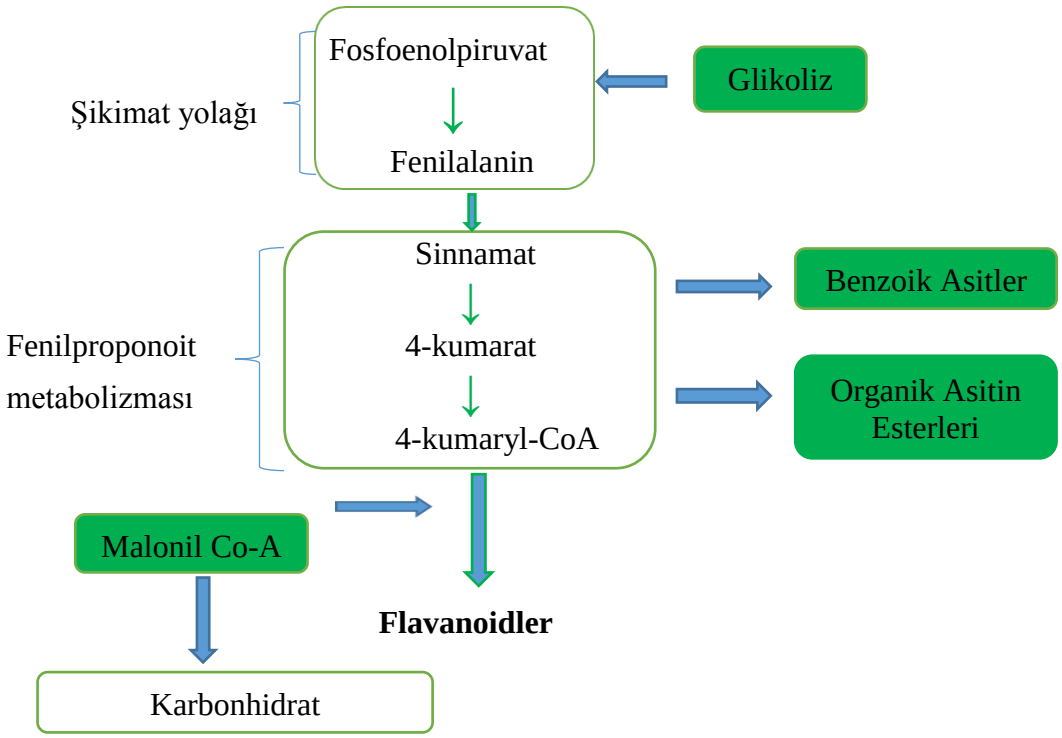
Olea europaea L. var. *europaea* Zhukovsky: Marmara Bölgesi, Doğu Karadeniz, Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi, Güney Doğu Anadolu

Olea europaea L. var. *sylvestris* (Miller) Lehr.: Marmara Bölgesi, Doğu Karadeniz, Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi (Davis 1978).

Bitkilerin tüm bölümlerinde bulunan fenolik bileşiklerin; anti-mikrobiyal, anti-enflamatuar, anti-artherogenik, anti-alerjik, antioksidan, anti-trombotik, anti-kanser, kardio, vazodilatör etki ve benzeri fizyolojik özellikleri geniş bir yelpazede sergiledikleri gösterilmiştir. Bu ilginç bileşenleri doğal matrislerden elde etme olasılığı, onların ekstraksiyon basamaklarının önemini artırır. Genellikle atık olarak kullanılan bu doğal

ürünlerin, gıda sanayi, kozmetik sanayi yan ürünleri için kullanılır olmasını sağlamak, atık değerlendirilmesi açısından da önemlidir (Abaza vd. 2015).

Bitkisel kaynaklı polifenoller potansiyel antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri nedeni ile önemli derecede ilgi çekerler. Tüketicilerin kimyasal koruyucu maddelerin sağlık açısından olumsuz etkileri konusundaki görüşleri, gıda sektörünün uzun raf ömrü beklentileri, kimyasal olarak sentezlenmiş katkı madddelerinin yerini doğal alternatiflerin almasına katkı sağlamıştır. Bu amaçla doğal kaynaklardan elde edilen polifenoller konusundaki araştırmalarda artmıştır. Pek çok bitki fenolik bileşiklerin mükemmel kaynağı olarak kabul edilir (Proestos vd. 2006). Bitki fenolikleri bir yada daha fazla hidroksi sübtitüent taşıyan aromatik bir halkaya sahip, aromatik ikincil metabolitlerdir. Bu bağlamda sözkonusu tanım tam olarak fenolikleri ifade edemeyebilir. Bu nedenle metabolik kaynağa dayalı bir tanım tercih edilir ve bitki fenolikleri, şikimat yolağı ve fenilproponoid metabolizmasından türetilen maddeler olarak kabul edilir. Fenolik maddelerin oluşumuna yol açan metabolik yol izleri şekil 3.4' de verilmiştir (Proestos vd. 2006).



Şekil 3.4 Fenolik bileşenlerin oluşumunda izlenen metabolik yol izleri

Zeytin bitkisinde bulunan fenolik bileşikler genel olarak polifenol olarak karakterize edilirler, bu terim fenolik bileşiklerin polihidroksi türevleri oldukları düşünüldüğünde uygundur. Fenolik grup yada aromatik halkaları eksik sinnamik asit, elenolik asit, şikimik asit ve kuinik asit gibi pek çok bileşik metabolik tanıma uyarlar ve çoğunlukla hidrofilik yapıdadırlar. Fenolik bileşiklerin amfibilik yapıda olanları, suyla güçlü bir şekilde etkileşen hidrofilik ve suyla etkileşmeyen hidrofobik bir kısma sahiptir.

Bitki fenolikleri, temel fenolik iskelet yapıları ile bağlantılı karbon atomlarının sayısı ile farkedilebilir. Onbeş temel grup halinde sınıflandırılmıştır. Zeytin bitkisinde, fenolik bileşikler geniş bir alana dağılmakla birlikte, basit fenolikler, benzoik asitler, sinnamik asitler, flavanoidler ve iridoidler en önemli grupları oluşturmaktadır. Çizelge 3.1'de zeytin bitkisindeki temel fenolik bileşikler sınıflandırılmıştır (Proestos vd. 2006).

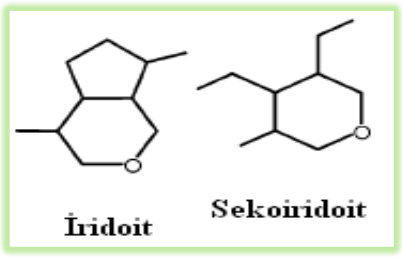
Çizelge 3.1 Zeytin bitkisindeki temel bileşik sınıfları

C Atomu Sayısı	Temel İskelet	Sınıf	Örnek
7	C_6-C_1	Benzoik Asitler	p-hidroksibenzoik asit Vanilik asit Protokateşik asit
9	C_6-C_3	Hidroksisinnamik asitler	Kafeik asit
15	C_6-C_3- C_6	Flavonoidler Antosiyaninler Flavonoid glikozitler İridoidler	Siyanidin Rutin Oleuropein Ligstrosid
n	-	Ligninler Taninler	

3.1.1 *Olea Europaea* L. bitkisinde mevcut polifenolik yapılardan iridoitler ve özellikleri

Zeytin yaprağı içeriği analiz edildiğinde tespit edilen fenolik bileşiklerin başlıcaları sekoiridoidler, flavonoidler, fenolik asitler ve lignanlardır.

Sekoiridoitler, siklopentanopiran halkasına sahip acı lezzetli monoterpen lakton olan iridoitlerin, siklopentan halkasının parçalanması ile oluşmaktadır (Şekil 3.5). *Oleaceae* familyasındaki sekoiridoitler ekzosiklik 8,9-olefinik bağ tarafından karakterize edilen, elenolik asit ve glikoz kalıntısının kombinasyonu oleosid türevleridir.



Şekil 3.5 İridoit ve sekoiridoit iskeletleri

İridoitler bitkiler aleminde aşağıdaki sınıflarda yaygındır.

1.Cornidae alt sınıfından eczacılık bakımından önemli bitki familyalarından, *Valerianaceae, Ericaceae, Gentianaceae, Loganiaceae, Menyanthaceae*, ***Oleaceae*** ve *Rubiaceae*.

2.Lamiidae (Tubiflorae) alt sınıfından *Lamiaceae, Plantaginaceae* ve *Scrophulariaceae*.

İridoitler 3 alt sınıfa aynlmaktadır.

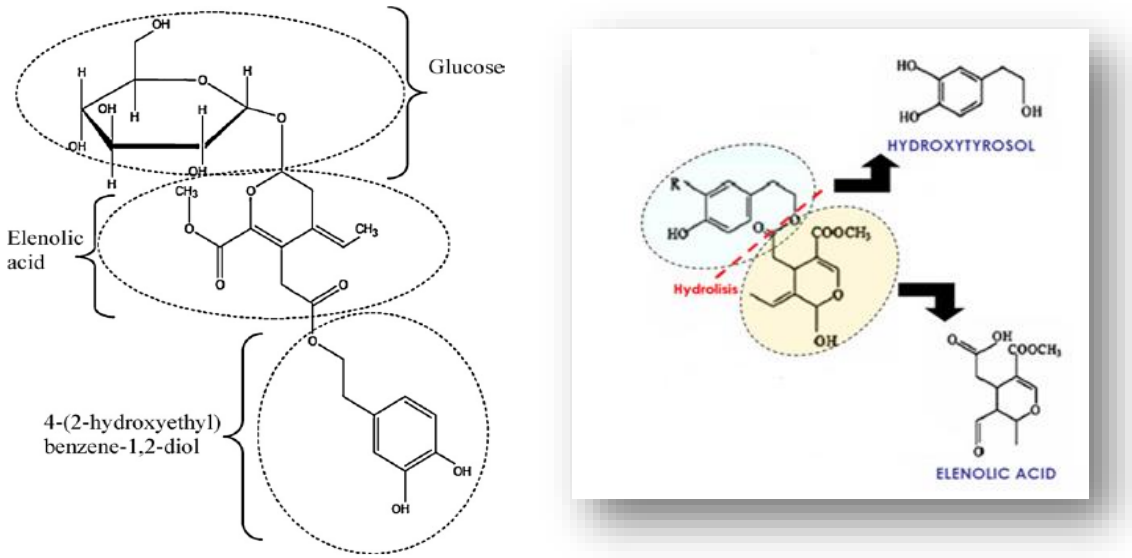
- İridoit heterozitleri
- Sekoiridoit heterozitleri
- Heterozit olmayan iridoitler

Sekoiridoitler şeklen iridoit heterozitlerinden meydana gelir. İridoitlerin siklopentan halkasındaki C-7 ve C-8 deki C-C bağlar parçalanmıştır. Sekoiridoit heterozitlerden amarogentin, gentiopikrin ve oleuropein açık renkli, optikçe aktif kristaller şeklindedir. İridoit heterozitlerden farklı olarak suda kısmen çözünür. Eczacılık bakımından ilginç olan bazı sekoiridoit heterozitlerden amorogentin, amarosverin ve oleuropein deki fenol, karbonik asitler D-glukozla ester şeklinde bağlıdır. Bitkisel bir ekstraktdaki iridoitlerin varlığı, Trim ve Hill renk reaktifi (bakır sülfatın dilüe çözeltisi ve HCl) ile teşhis edilir. İnce Tabaka Kromatografisi için non-spesifik bir reaktif olan vanilin/H_2SO_4 kullanılır. Bu tip bileşikler fenol reaktifleri ile reaksiyona girerek kromatografik olarak tanınır veya

fotometrik olarak miktar tayini yapılır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) miktar tayininde geniş ölçüde kullanılmaktadır (Tanker M).

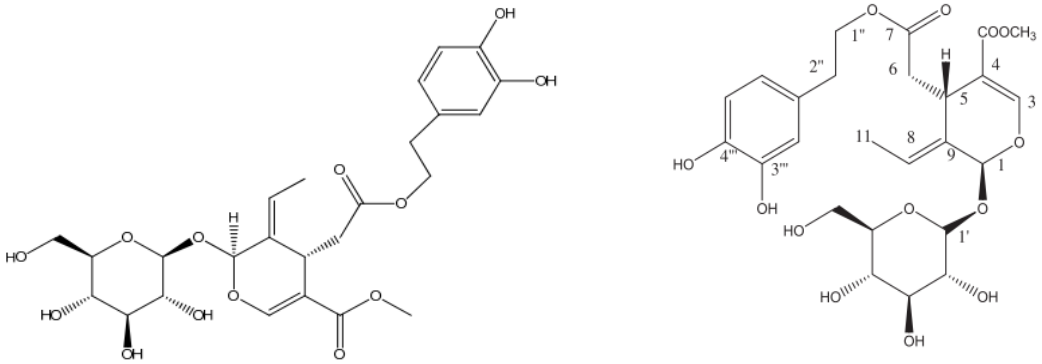
Oleuropein *Oleaceae, Gentianaceae, Cornaleae* familyalarında ve bunun yanı sıra diğer pek çok bitkide de bol miktarda bulunan sekoiridoit grubu bir bileşiktir. Oleuropein zeytin yaprağında (60-90 mg/g yaprak) bulunan en önemli fenolik bileşik olmakla birlikte, ayrıca zeytinyağı ve meyvesinde, zeytinyağı üretimi sırasında ortaya çıkan atıklarda (alperujo)da bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda zeytinyağında oleuropein içeriğinin %0,005-2 arasında değişiklik gösterdiği, alperujoda %0,87, zeytin meyvesinin olgunluğuna göre değişmekle birlikte, en yüksek miktarın hiç olgunluğa erişmemiş yeşil türde %14 (kuru ağırlık) ve zeytin yaprağında ise %1-14 arasında olduğu belirlenmiştir.

Oleuropein, moleküler olarak üç alt birimden oluşmuştur. Bu alt birimlerden birincisi, polifenol yapısında olan 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol (hidroksitirizol); ikinci alt birim, elenolik asit ve üçüncü alt birim de glikoz molekülüdür. Hidroliz yoluyla aktif metaboliti olan hidroksitirizole dönüşür. Oleuropein reaktif oksijeni ve azot türlerini uzaklaştırmaktadır (Armutcu vd. 2011, Yıldız ve Uylaşer 2011).



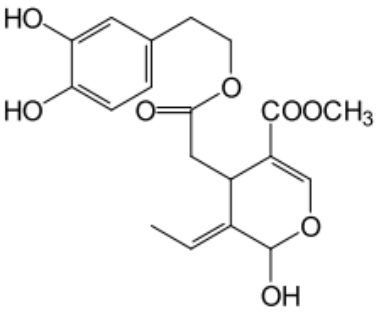
Oleuropein

Oleuropein ($C_{25}H_{32}O_{13}$), moleküler ağırlığı 540.51 g/mol olan açık sarı görünümlü bir fenolik bileşiktir.

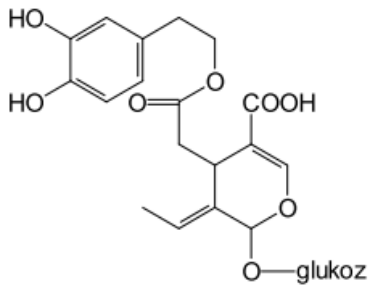


Oleuropein

Zeytin bitkisinin meyve kısmında oleuropeinin sadece glikozidik türevleri birikmesine karşın yapraklarda dihidroksitrisol ve oleuropeinin glikozidik olmayan türevleri ve dimetil yapılarıda tespit edilmiştir.



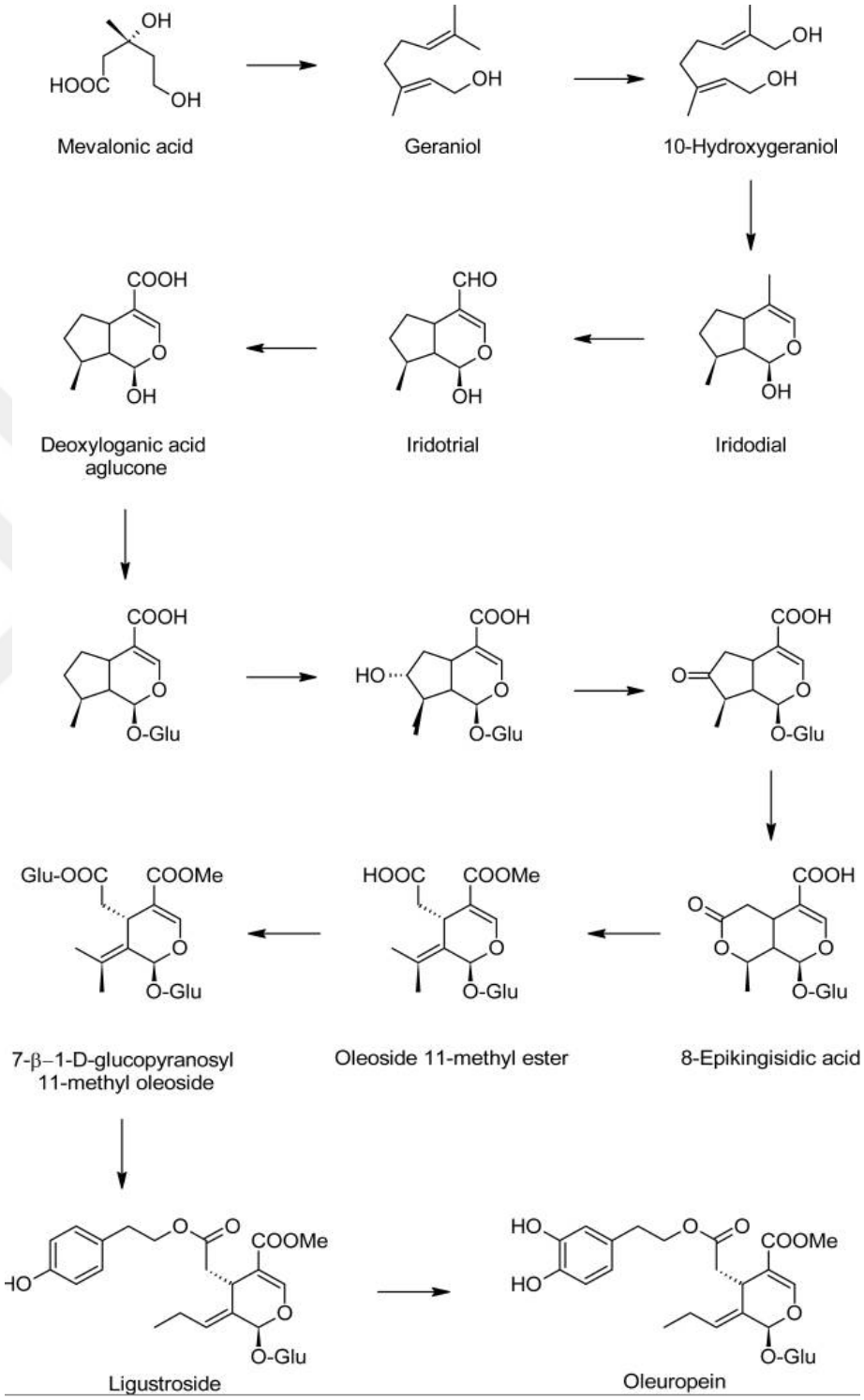
Oleuropein aglikon



Dimetil oleuropein

Oleaceae familyasındaki oleuropeinin biyosentezi, mevalonik asit üzerinden gerçekleşmektedir. Karbon iskeletini oluşturan mevalonik asitin bir dizi reaksiyonu sonucu; geraniol, 10-hidroksigeraniol ya da stereo izomeri 10-hidroksinerol ve iridodial oluşmaktadır. Bu bileşikler loganinin prekürsörü olarak bilinmektedir. Sırasıyla deoksiloganik asit, 7-epiloganik asit ve 7-ketologanik asit oluşumundan sonra, gerçekleşen bir dizi dönüşüm sonucu oleuropeinin direk prekürsörü olan ligstrosit meydana gelmektedir. Deoksiloganik asit ve 7-ketolaganik arasındaki gerçekleşen dönüşümlerin bitki türüne ve yılın belli zamanlarına göre değişiklik gösterdiği

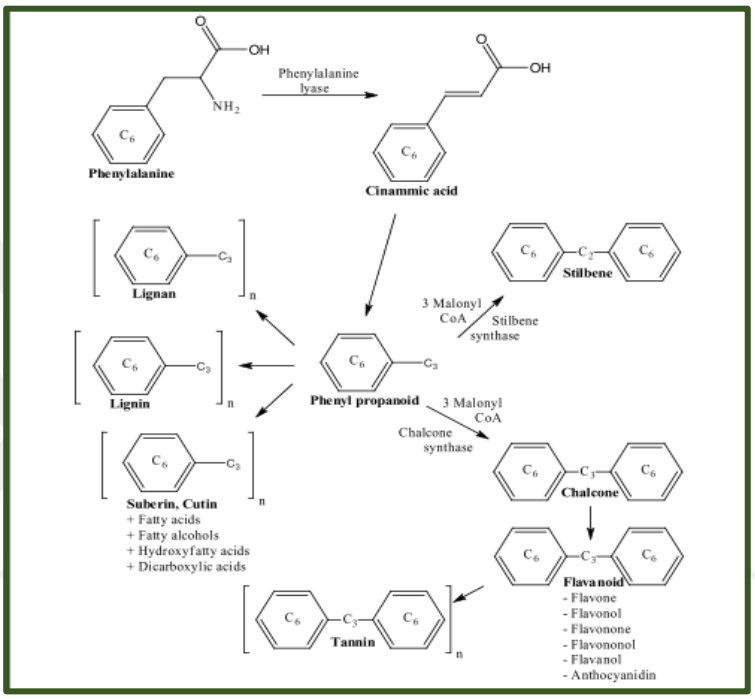
belirtilmektedir. *Oleaceae* familyasındaki oleuropeinin, Damtoft vd. (1992) tarafından öngörülen biyosentez yolu, şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6 *Oleaceae* yapısında bulunan oleoropein için önerilen biyosentetik yolağı

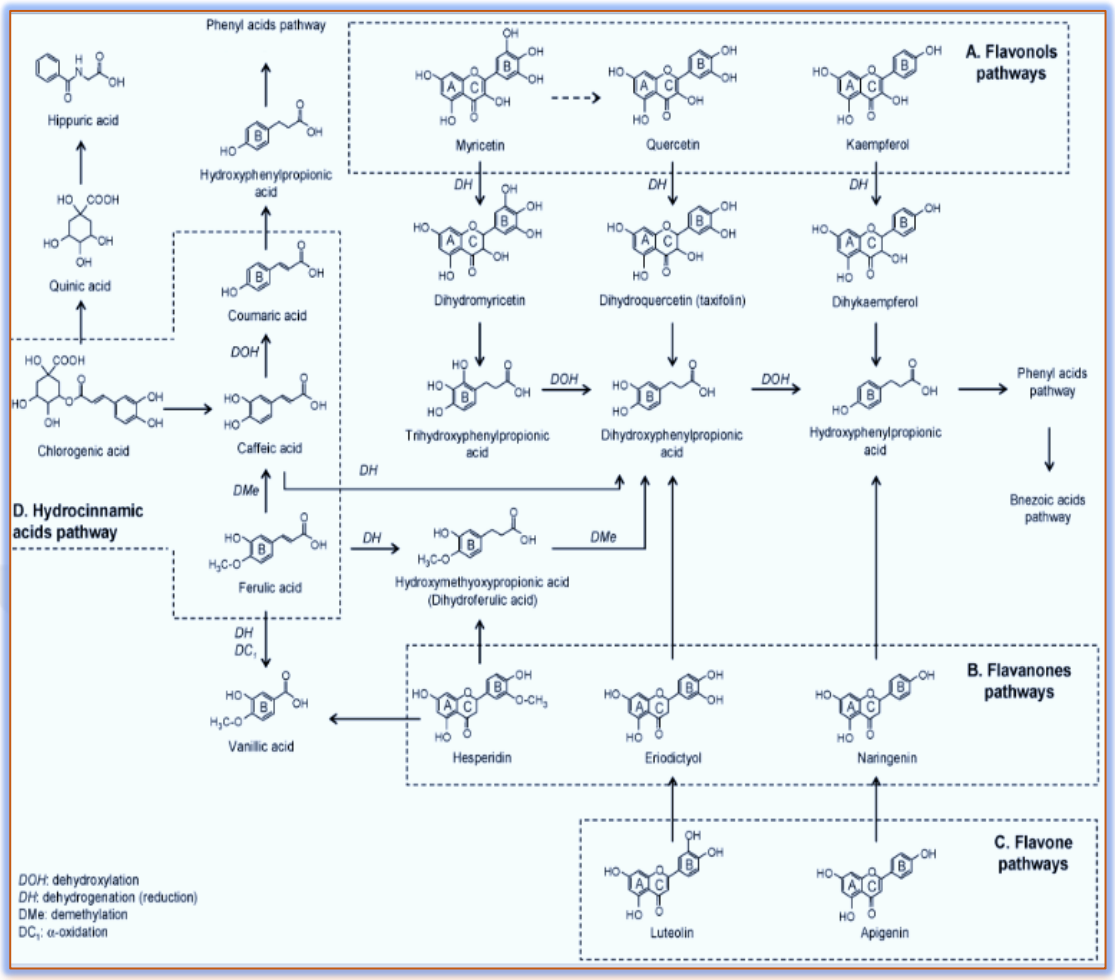
3.1.2 *Olea Europaea* L. bitkisinde mevcut polifenolik yapılardan flavanoidler ve özellikleri

Fenolik bileşiklerden flavanoidlerin tanımlanmasında, fenilpropanoid metabolizması ve şikimat yolundan türeyen bitki fenolleri dikkate alınarak metabolik orijine dayanan bir tanımlama tercih edilmektedir (Şekil 3.7).



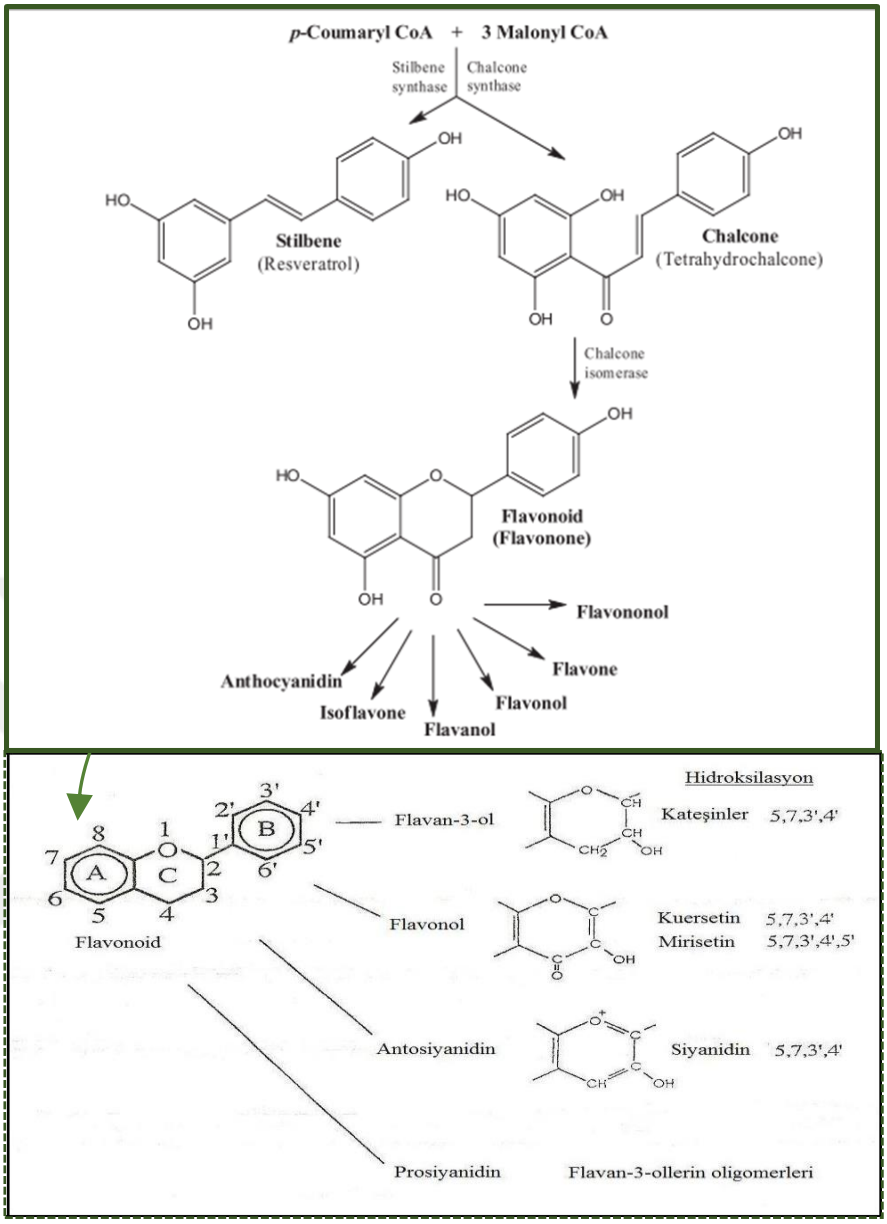
Şekil 3.7 Fenilalaninden, fenilpropanoid sentezi ile fenolik maddelerin sentezi (Shahidi 2000)

Fenolik bileşiklerin alt sınıflarından birini oluşturan flavonoidler, şikimat ve asetat-malonat yollarının her ikisinden öncü bileşikleri kapsayan genel bir biyosentetik yol ile birbirine bağlanmaktadır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Flavanoid sınıfları (Flavanol, flavanon, flavon ve hidroksisinamik asitler) için önerilen yolağları (Mosele vd. 2015)

Flavonoidler bitkilerin ikincil metabolitlerinin önemli ve bitki fenollerinin en yaygın ve en fazla sayıda bulunan sınıfıdır. Flavonoidlerin karbon iskeletini iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren difenilpropan (C6-C3-C6) yapısı oluşturur. Difenilpropan iskeleti içeren doğal bileşikler, fenil gruplarının propan zincirine bağlanma pozisyonlarına göre flavonoid (2-fenil-1,4-benzopiron yapısından türeyen), izoflavonoid (3-fenil-1,4-benzopiron yapısından türeyen), neoflavonoid (4-fenil-1,2-benzopiron yapısından türeyen) olmak üzere üç ana grupta toplanırlar. Bu grupların her biri de çeşitli alt sınıflara ayrılırlar. Flavonoidler, şekil 3.9 'de kimyasal yapısı verilmiş olan, bir flavan (2-fenil-benzo-ɤ-piran) türevleridir. Flavan yapısı, oksijen içeren piran halkasıyla (C) birleşmiş iki benzen halkasından (A ve B) oluşur (Artık vd. 2016).

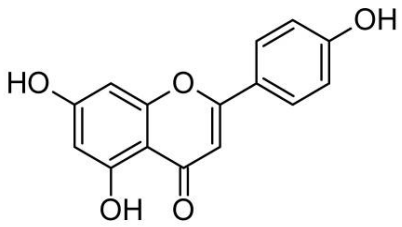


Şekil 3.9 Flavanoidlerin kimyasal yapısı

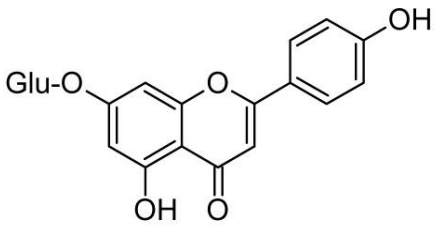
Flavonoidlerin değişik gruplar arasındaki farkları OH gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. Flavonoidlerin alt gruplarından monomerik flavanollere, (kateşinler, lökoantosiyanidinler), proantosiyanidinler, anyosiyanidinler, flavonlar, flavonoller, flavanonlar ve kalkonlara bitki kaynaklı gıdalarda sıkça rastlanmaktadır. Flavonoidler çoğunlukla çeşitli derecelerde hidroksillenmiştir ve hidroksil grupları bazen glikozitleşmiş veya metillenmiş durumdadır. Flavonoidler genellikle bir –OH grubuyla

(o-glikosil flavonoid olarak bilinirler) ya da karbon-karbon bağıyla (c-glikosil flavonoid olarak bilinirler) şeker ile bağlanarak glikozitleri oluştururlar. Şeker molekülleri flavonoidlere çeşitli pozisyonlarda bağlanabilir (Artık vd. 2016).

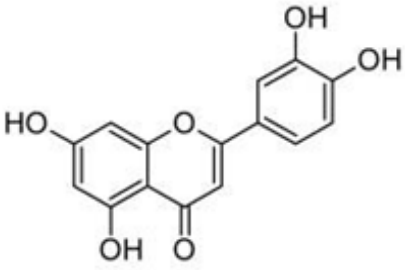
Flavon ve flavonolların kimyasal yapı farkları, orta halkanın 3. pozisyonundaki karbon atomuna bağlı grubun değişik olmasından kaynaklanmaktadır. Buraya flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bağlanmıştır. Flavonollar 3-hidroksiflavon; flavonlar 3-deoksiflavonollar olarak da adlandırılmaktadır. Flavon ve flavonollar genellikle aglikonlar ve glikozitler olarak gıdalarda bulunurlar. Flavon ve flavonol glikozitleri hemen her bitkide bulunurlar ve açık sarı renklidirler. Bitkisel materyallerde flavonollara ilaveten yaklaşık 100 flavon tespit edilmişttir. Flavonlar meyve ve sebzelerde flavonollar kadar yaygın değildirler fakat hububat ve otlarda bulunurlar. Yaygın flavonlar apigenin ve luteolindir. Apigenin ve glikozitleri hububat tanelerinde, bazı otlarda, bazı sebze ve yapraklarında yaygındır. Luteolin esasen tahıl ve otlarda; luteolin glikozitleri bazı sebze ve yapraklarında bulunur. Flavonlar genellikle 7-O-glikozit halinde bulunurlar. Zeytinde bulunan luteolin-7-glikozit buna örnektir (Artık vd. 2016).



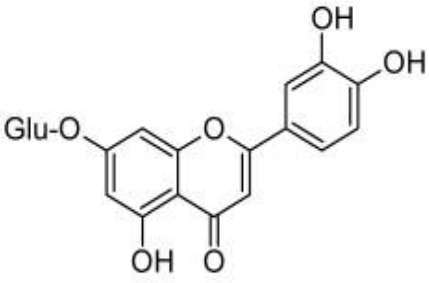
Apigenin



Apigenin-7- glukozit



Luteolin



Luteolin-7- glukozit

Glikozitlerin şeker kısımları çoğunlukla D-glukoz, D-galaktoz, L-ramnoz, L-arabinoz, D-apioz, D-glukuronik asit ile bunların kombinasyonundan oluşmaktadır. Aglikona D-serili şekerler β-bağı ile L-serili şekerler α-bağı ile bağlanırlar. Flavonollerin ve flavonların sentezi için ışık gereklidir. Bu yüzden genellikle yaprak ve meyve kabuklarında bulunmaktadırlar. Flavonoller ve flavonlar bitkinin dıştaki etkiye açık kısımlarında ve yeşillikle orantılı olarak yoğunlaşmıştır (Artık vd. 2016).

3.2 *Olea Europaea* L. Bitkisinden Polifenolik Yapıların Ekstraksiyonu

Fenolik bileşiklerin hazırlanması ve ekstraksiyonu; örneğin doğal matriksi ve moleküler yapısı ile birlikte polarite, konsantrasyon, aromatik halka sayısı ve hidroksil gruplarında farklılık gösteren fenolik maddelerin, kimyasal özelliklerine dayalıdır. Protein, karbonhidrat ve diğer kompleks yapılar, bazı fenolik maddelerin tam olarak ekstrakte edilmesini engellemektedir. Örnekteki fenoliklerin kimyasal yapısında ki farklılıklar, basit ve kompleks yapıdaki polifenolik yapılar ve farklı oranlardaki fenolik asit, flavanoid, antosiyanin ve proantosiyanin gibi organik grupların konsantrasyonu ile ilişkilidir. Pek çok bitki örneğinde bu nedenlerden dolayı tek bir örnek hazırlama ve ekstraksiyon metodu seçmek oldukça zordur. Birden fazla metodun ve yöntemin bir arada kullanılması gerekir.

Bitki örneklerinin, bazı numune hazırlama teknikleri için, dondurarak kurutma, hava ile kurutma ya da fırında kurutma teknikleri kullanılarak kurutulması gerekir. Genellikle, örneğin belli tekniklerle kurutulma ve öğüterek boyut küçültme işlemleri, numune hazırlamanın en önemli aşamasını oluşturmaktadır. Kurutulmuş örnekler öğütülerek ya da parçalanarak, parçacık büyüklüklerine göre tasnif edilmelidir. Fenolik maddelerde yüksek ekstraksiyon verimine, en küçük parçacık boyutunda erişilir, aynı zamanda küçük parçacık boyutu, enzimatik olayların ve ekstraksiyonun iyileştirilmesinde etkindir.

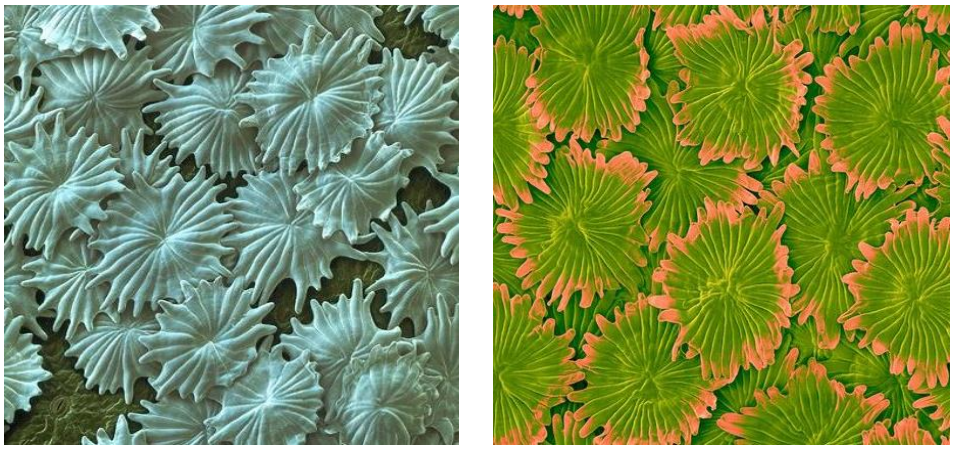
Eğer örnekten elde edeceğimiz fenolik bileşen, glikozit yapıda bir madde ise stabilize edildikten sonra ekstrakte edilmesi tercih edilmektedir. Stabilizasyon, kaynar su ve kaynar alkol, alkol buharı veya diğer çözücü sistemlerinin örnek üzerine gönderilmesi ile uygulanan ve yapıdaki enzimleri parçalayan bir tekniktir. Stabilizasyon örnekteki

enzimleri parçalayarak faaliyetlerini tamamen durdurur. Parçalanan enzimleri tekrar aktive etmek mümkün değildir (Artık vd. 2016).

Bitkiler farklı çevresel faktörlerin etkisi altında yaşamlarını sürdürmeye çalışırlarken, bu faktörlerdeki herhangi bir artış veya azalış bitkide stres meydana getirmektedir. Stres, bitkide mevcut olan söz konusu biyoaktif bileşenlerden ikincil metabolitlerin miktarının değişiminde önemli derecede etkili olmaktadır (Dichio vd. 2006, Şahin 2011).

Bitki hücreleri hücre zarı denilen ince bir zarla çevrilidirler. Suyun hücre zarından geçişi osmoz denilen fiziki bir yolla meydana gelmektedir. Yarı geçirgen bir zarla ayrılmış bir ortamda suyun konsantrasyonun yüksek olduğu yerden düşük olduğu yere doğru bir geçme eğilimi vardır. Bu geçiş, her iki taraftaki konsantrasyon eşit oluncaya kadar devam eder. Bu olaya osmoz denir. Bitkideki mevcut bu osmotik durum, bitkinin su stresine adapte olabilmesini sağlayan önemli proseslerden birisidir. Yetersiz suya maruz bırakılan bitkiler aminoasit (pirolin, aspartik asit gibi), protein, şeker (sukroz, glukoz, mannitol gibi) ve organik asitleri sentezlemekte ve biriktirmektedirler. Söz konusu maddelerin konsantrasyonunun yüksek olması suyun bu hücrelere ulaşmasını sağlayarak, bitki dokularının topraktaki düşük suya toleransını artırmaktadır (Dichio vd. 2006, Şahin 2011).

Sudaki yetersizliğe karşı verilen tepki, bitkinin türü ile de ilgilidir. Örnek olarak zeytin ağacı, dokularının su ihtiyacını azaltarak su stresine direnebilmektedir. Su stresi, zeytin ağaçlarının yaprak anatomisinde de değişikliklere sebep olmaktadır. Bu değişiklik, kuraklığa adaptasyonda faydalı olmaktadır. Su stresi altındaki yaprağın boyutunun küçülmesi ve buna paralel olarak yaprak hücrelerinin yoğunluğundaki artış, yaprak liflerini ve stomasını artırmaktadır ki, yarı kurak bölgelerde bol olan yüksek sıcaklık ve güneş radyasyonuna uyumu sağlamaktadır (Dichio vd. 2006, Şahin 2011).



Şekil 3.10 *Olea europaea L*. yapraklarının stoma ve trichomes SEM görüntüleri (Bitki trichomes, farklı yapı ve fonksiyona sahip ince epidermal çıkıntılar vardır)

Katı veya sıvı halde bulunan bir bileşiğin uygun bir ekstraksiyon tekniği kullanarak, bulunduğu karışım ortamından alınması işlemi; en basit uygulamalarda, ya da en büyük ölçekli endüstriyel uygulamalarda gerçekleştirilsin, mutlaka ekstraksiyona etki eden birçok parametreye bağlıdır. Ekstraksiyon işleminin en optimum koşulları doğru parametrelerin seçimi ile sağlanabilir. Ekstraktın yüksek verimle ve uygun koşullarda alınabilmesi için en uygun ekstraktör tipinin seçimi yanında, ekstraksiyon işlemleri öncesinde veya işlemler sırasında dikkat edilmesi gereken birçok parametre bulunmaktadır. Bu parametrelerin en önemli olanları; sıcaklık, basınç, çözücü, parçacık büyüklüğü, ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı ve karıştırıcı tipi, nem, yüzey aktif madde etkisi, materyalin por özelliği olarak sayılabilir. Ayrıca, fenolik maddelerin optimum geri kazanımı, numuneden numuneye farklılık gösterir ve bitki türü ile bitkinin aktif bileşiklerindeki farklılıklara dayanır (Artık vd. 2016).

Ekstraksiyon işlemleri genel olarak ya kesikli (Batch) bir sistem ile ya da sürekli (Continuous) bir sistem ile gerçekleştirilmektedir. Bu iki sistemle birlikte yarı kesikli bir uygulama şeklide mevcuttur. Kesikli (Batch) tipi ekstraksiyon yöntemleri genellikle küçük ölçekli veya az miktar örneğin kullanıldığı sistemlerde, sürekli (Continuous) tipi ekstraksiyon yöntemleri ise büyük ölçekli veya çok miktarda materyalin ekstraksiyon işlemleri için uygulanmaktadır. Endüstriyel veya yarı-endüstriyel ölçekli sistemlerin bir kısmı bu tiptedir.

3.2.1 Çözücü ekstraksiyonu

Ekstraksiyonda fazlardan biri katı diğeri sıvı olabildiği gibi her ikisi de sıvı olabilir. Bu durumlara göre sırasıyla, katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonlarından bahsedilebilir. Sıvı - sıvı ekstraksiyonu, çözelti içinde çözünmüş bir maddeyi, bu çözeltiyi kendisiyle karışmayan başka bir sıvı ile çalkalayarak alma işlemidir. Katı–sıvı ekstraksiyonu ise katı bir faz içerisinde olan ve katıdan özütleme (leaching), sıvıda özütleme (lixiviation) ve yıkama (washing) gibi kavramları da kapsayan bir terimdir. Çok bileşenli bir katıdan istenilenbileşenin bir çözücü ile çözülerek ayrılması işlemidir. Sıvı–sıvı ekstraksiyonuna benzemekle beraber daha fazla zaman alan ve daha zor bir süreçtir. Zira katı içerisindeki difüzyon sıvıdakinden daha yavaştır. Katı-sıvı ekstraksiyon yönteminde, katı içinde bulunan madde, bu maddeyi büyük ölçüde çözebilen bir çözücü yardımıyla alındığı için çözücünün seçimi son derece önemlidir. Çözücü seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekilde sıralanabilir:

•"Benzer benzeri çözer" prensibinden yola çıkarak istenilen maddenin ekstraksiyonunda seçimli olmalıdır.
• Kullanılan çözücü kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Sistemdeki diğer komponentlere ve kullanılan techizatın malzemesine karşı inert davranmalıdır.
• Kolay temin edilebilmeli ve maliyeti düşük olmalıdır.
• Düşük korrozivite, düşük viskozite, düşük bir donma noktası, düşük bir spesifik ısı ve buharlaşma ısısı, düşük alevlenme veya patlama noktası gibi fiziksel özelliklere sahip olmalıdır (Şahin 2011).

Burada çözücünün ekstrakte edilecek katı malzemeye oranı da önemlidir. Çözücü miktarının yüksek olması ekstrakt verimini arttırsa da, ekstraksiyon sonucunda elde edilecek ürünün seyreltik olması ve bu çözücüyü buharlaştırmak için harcanacak enerji düşünülerek, çözünenin çözücüdeki doygunluk noktasına bağlı olarak çözücü kapasitesi belirlenmelidir.

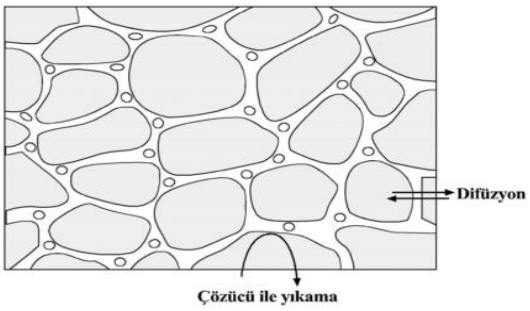
Çözücü ile ekstrakte edilecek malzemenin teması da katı–sıvı ekstraksiyonunda önemli bir diğer husustur. Kütle transferi katı faz ile sıvı faz arasındaki ara yüzey ile orantılı olduğundan, katı malzemenin boyutunun küçültülmesi ekstraksiyonu hızlandırmaktadır. Bitkilerin ekstraksiyonu hücresel yapıya sahip olmalarından dolayı diğer maddelerin ekstraksiyonundan biraz daha farklı olmaktadır. Bitki dokusu duvarlarla sarılmış hücrelerden oluşmaktadır. Kurutulmuş bir bitkisel malzemenin çözücü ile ekstraksiyonu, iki aşamalı bir prosestir. Bunlar;

1. Bitki üzerindeki porların genişlemesini kolaylaştırmak için çözücü ile ıslatılması, böylece bitki dokusunun hidrasyonu ve şişmesi,
2. Bu genişletilmiş porlardan çözücüye çözünenin difüzyon ve osmotik proseslerle geçişi.

Çözünenin çözücüye geçişini sağlayan ekstraksiyon mekanizması ise iki fiziksel fenomenden ibarettir:

• Bitki hücrelerinde var olan çözünenin difüzyon ile çözücüye geçmesi,
• Ufaltma ile duvarları parçalanan hücrenin çözücü ile yıkanarak içeriğindeki çözünenin çözücüye geçmesi.

Şekil 3.11'de bitkisel bir doku üzerinde vuku bulan ekstraksiyon mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.11 Bitki hücre dokusunun şematik gösterimi

Söz konusu ekstraksiyonda meydana gelen kütle iletimine sebebiyet veren itici güç, ekstrakte edilecek maddelerin bitkideki konsantrasyonları ile çözücüdeki konsantrasyonları arasındaki farktır (Şahin 2011).

Fenoliklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak, organik veya inorganik çözücüler kullanılır. Ekstraksiyonda kullanılan, su, aseton, etil asetat, alkoller (MeOH, EtOH ve propanol) gibi çözücü maddeler ve bunların karışımlarının seçimi, ekstraktdaki fenolik verimini etkileyecektir. Ekstraksiyonda örneğin doğası, parçacık büyüklüğü, sıcaklık dahil olmak üzere, ekstraksiyon süresi, çözücü-örnek oranı, numunenin tekrar ekstraksiyon sayısı, çözücü madde tipi gibi birkaç parametre, fenolik verimini etkileyebilir (Artık vd. 2016)

Fenoliklerin bitkisel kaynaklardan elde edilmesinde verimi etkileyen en önemli optimizasyon parametresi, çözücü seçimi ve bileşimi olmakla beraber, önemli diğer iki parametre zaman ve sıcaklıktır. Genellikle artan zaman ve sıcaklık, analit çözünürlüğünü teşvik eder, ancak yüksek sıcaklık ve genişletilmiş ekstraksiyon zamanı ile ortaya çıkan enzimatik oksidasyon gibi istenmeyen reaksiyonlar, fenolik maddelerin yıkımına yol açar. Çözücü-örnek oranı ve ekstraksiyon tekrarlanma sayısı; her bir örnekte fenoliklerin geri kazanımını etkiler. Bitki kaynaklı örneklerde çözücü-örnek oranının, fenolik ekstraksiyonu için artırılması önerilir. Ancak optimum oran belirlenirken çözelti başlangıç oranı ve çözeltinin etkin doygunluğu en aza indirilmelidir (Artık vd. 2016).

Örnek matrisi ve parçacık büyüklüğü de fenolik ekstraksiyonunu kuvvetle etkilemektedir. Difüzyon olayı örneğin parçacık büyüklüğü ile ilişkilidir. Parçacık büyüklüğü küçüldükçe difüzyon ve ekstraksiyon işlemi kolaylaşır ve ekstraksiyon verimi artar. Ancak, bu artış bir noktaya kadar devam eder ve belli bir noktadan sonra artış durur veya azalır. Bu durum çok küçük taneciklerin oluşturduğu yığın hareket sebebi ile kütle transfer hızının azalmasıyla kendini gösterir. Bu aşamada daha fazla çözücüye ihtiyaç duyulur. Bu yüzden optimum verim ve kalitenin sağlanabilmesi için ekstraksiyon öncesi, örnek en uygun parçacık büyüklüğüne getirilir. Parçacık büyüklüğü küçüldükçe ekstraksiyon verimi artar, ancak iyice toz haline gelen materyal için operasyonel güçlükler ortaya çıkar (Artık vd. 2016).

Fenolik maddeler, örnekdeki karbonhidrat ve protein gibi diğer organik yapılara bağlanabilir. Bu şekilde bağlanmış fenoliklerin, enzim ilavesi ile hidrolize edilerek serbest hale geçmeleri sağlanabilir. Bitki materyalindeki fenolikler, bitki hücre

duvarındaki polisakkaritlerle hidrofilik ve hidrofobik bağlarla, bağlı olduğu düşünülmektedir. Enzimlerin eklenmesi ile matriksteki fenolik-hücre duvarı bağları parçalanabilir ve fenolik ekstraksiyonu iyileştirilebilir.

Asidik ve alkali hidroliz; bitki ve bitkisel ürünlerden fenoliklerin izolasyonu ve ekstraktaki fenoliklerin stabilitesi için oldukça önemlidir. Flavonoid glikozitler, ekstraksiyon sırasında, sıkça N_2 (g) altında HCl uygulanarak aglikon formlara hidrolize edilir. Asidik hidroliz yöntemi flavonoid aglikonların (beş temel grup aglikon; kuarsetin, kamferol, myricetin, luteolin ve apigenin) bitkisel kaynaklı örneklerden belirlenmesinde kullanılan etkili bir tekniktir. Sıralı alkali ekstraksiyon, bitkisel örneklerden bağlı ve serbest fenolik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılan bir yöntemdir. Serbest fenolikler, su banyosunda 20 dk süresince azot atmosferinde, H_2O, saf organik çözücü veya sulu organik çözücü kullanılarak ekstrakte edilir. Katı kalıntı daha sonra karanlıkta, oda sıcaklığında, azot atmosferi altında bir saat boyunca NaOH ile hidroliz edilir. Ardından, HCl ile muamele edilerek alkali ekstraktın pH'ı 2'ye getirilir, santrifüjlenir ve ekstraktlar bağlı fenoliklerin belirlenmesi için kullanılır (Artık vd. 2016).

Flavonoidler, hem yenilebilir hem de yenilebilir olmayan veya herbal bitkilerde görülen, son derece biyoaktif bileşiklerdir. Genellikle, MeOH, EtOH, aseton, su ya da bu çözücülerin karışımları ile geri soğutuculu ekstraksiyon (heated reflux extraction) yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilirler (Artık vd. 2016).

Soxhlet, geri soğutucu ve maserasyon sıklıkla katı örneklerden fenolikleri ekstrakte etmek için kullanılan geleneksel yöntemlerdir. Soxhlet ve geri soğutucu 90°C'de birkaç saat boyunca maserasyon ise oda sıcaklığında gün boyunca ya da birkaç günde gerçekleştirilen yöntemlerdir. Bu yöntemler, oldukça basittir ve nispeten ucuz aparatlar içerir, aynı zamanda yeterince yüksek fenolik ekstraksiyon oranları verirler.

Bu ekstraksiyon yönteminin pek çok olumlu yönleri olmakla birlikte, büyük dezavantajları da söz konusudur. Bu dezavantajlar aşağıda ki şekilde sıralanabilir:

1. Büyük hacimlerde sağlığa zararlı ve çevreyi kirletici tehlikeli organik çözücüler kullanılır,

2. Uzun ekstraksiyon süreleri
3. Hedeflenen bileşenler ışık, hava, yüksek sıcaklık ve enzimatik reaksiyonlar gibi iç ve dış faktörlerden etkilenir, girişim ve degradasyon söz konusudur.

Soxetec değiştirilmiş Soxhlet ekstraksiyon yöntemidir. Bu teknik normal Soxhlet ya da geri soğutucu sistemlerine göre daha avantajlıdır. Daha düşük organik çözücü tüketimi, daha kısa ekstraksiyon süresi ve çözücünün geri dönüşüm yeteneği vardır. Maserasyon, diğer geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile aynı dezavantajlara sahiptir ve fenolik ekstraksiyonunda düşük verimlilik ile karakterize edilir (Artık vd. 2016).

Pek çok yeni çalışmada, zeytin yapraklarından fenolik bileşikleri ekstrakte etmek için geleneksel yöntemler dışında, ses ötesi dalga destekli (UAE), süper kritik akışkan (SFE), basınçlı sıvı ekstraksiyon (PLE), sub-kritik sıvı, yüksek hidrostatik basınç prosesi (HHPP), mikrodalga destekli (MAE), ses ötesi dalga mikrodalga destekli ekstraksiyon (UMAE) gibi çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bu tür yeni tekniklerin temel avantajları arasında ekstraksiyon zamanından kazanç, çözücü hacmini azaltmak ve ekstraksiyon verimini artırmak sayılabilir.

3.2.2 Ses ötesi dalga ekstraksiyonu

Ses ötesi dalga etkisi, basınç dalgalarının elastik özelliklere sahip fiziksel bir ortamdan yayılması sonucu oluşur. Mekanik titreşimler mekanik basınç dalgalarına dönüşerek enerjiyi ortama ve ortam da dalgayla temas eden maddeye aktarır.

Titreşim halindeki nesne hareketini ortamdaki moleküllere aktarır ve her molekül bu hareketi komşu moleküle ileterek başlangıç konumuna geri döner. Ultrasonik dalga hava içinden geçerken, basınçta değişimlere sebep olur. Moleküllerin sıkıştığı noktalarda basınç normal değerinin üstüne çıkarken, moleküllerin birbirinden uzaklaştığı noktalarda basınç normal değerinin altına iner. Herhangi bir zamandaki basınç (P_a), zaman (t) ve frekansa (f) bağlıdır.

$$P_a = P_A \sin 2\pi ft \quad (3.1)$$

Burada, P_A basınç genliğini ifade eder (Mason ve Lorimer 2002; Tavman vd. 2009). Diğer bir önemli parametre ise ses şiddetidir. Şiddet ($W.cm^{-2}$), üretilen ses dalgasının enerjisini ifade etmek için kullanılır. Ses ötesi dalga düşünüldüğünde, farklı şiddet varyasyonları genliği değiştirerek elde edilir. Şiddetin mutlak tanımı, dalga tarafından birim alanda birim zamanda taşınan enerjidir.

Ses dalgasını ortama yaymak için ultrasonik ses üreten cihazlar kullanılır. Belirli bir frekansla çalışan bu cihazlar (endüstriyel kullanım için genellikle 20-50 kHz'dir) alternatif akımı, bir dönüştürücü sayesinde mekanik titreşimlere dönüştürürler. Bu titreşimler probu uygulanan frekansta titreterek titreşimlerin ortama iletilmesini sağlar. Eğer ortam sıvı ise, uygulanan akustik alan ortamda bulunan moleküllerin orijinal pozisyonlarında titremesine sebep olur ve ortamın basıncı (genellikle hidrostatik basınç, P_h) uygulanan akustik basınçla ($P_a = P_A \sin 2\delta ft$) birlikte artar. Herhangi bir zamanda oluşan yeni basınç $P = P_h + P_a$ 'dır. Burada, P_a uygulanan akustik basıncı, P_h hidrostatik basıncı ifade eder. Basıncın pozitif olduğu sıkışma evresinde, moleküller arasındaki ortalama uzaklık azalır. Buna karşın seyrelme evresinde, moleküller arası ortalama uzaklık artar ve basınç negatif değerlere ulaşır. Basınç kritik değerin, P_c altına düştüğünde (seyrelme evresinde gerçekleşir, $P_c = P_h - P_a$), moleküller arası ortalama uzaklık molekülleri bir arada tutmak için gerekli olan kritik değerin üstüne çıkar ve sıvı kırılarak boşluk veya başka bir deyişle kavitasyon oluşur (Mason ve Lorimer 2002, Tavman vd. 2009). Şekil 3.12'de negatif basınç kritik değerine (P_c) bağlı olarak kavitasyon kabarcıklarının oluşumu gösterilmektedir.



Şekil 3.12 Ses ötesi dalga etkisinde kavitasyon kabarcıklarının oluşumu
(Kavitasyon kabarcıkları, negatif basınç kritik değerin (P_c) altına indiğinde gözlemlenebilmektedir)

Bu kavitasyonlar, boşluklar veya kabarcıklar bir kez oluştuktan sonra, basınç maksimum negatif değerine ulaşana kadar büyürler. Basınç osilasyon sebebiyle sıkışma evresine gelerek pozitif değerlere ulaştığında, bu kavitasyon kabarcıkları çökmeye zorlanırlar (hacimleri küçülür, hatta bazıları tamamen kaybolur). Bu kabarcıkların tamamen veya kısmen çökmesi sonucu çok yüksek bir enerji açığa çıkarak şok dalgaları ve mikro-jetler oluşur. Ortaya çıkan bu mekanizma ses ötesi dalganın çeşitli endüstriyel alan ve proseslerde uygulanabilirliğini mümkün kılmaktadır.

Ultrasonik dalgalar bir ortamdan geçerken kütle transferine olan hem iç ve hem de dış dirence tesir eden bir seri etkide bulunurlar. Yüksek şiddetli ultrasonik dalga sıvı içinde karıştırma uygulamasıyla sıvıdaki taşınımı arttırarak kütle transferinde dış direnci düşürür. Bu karıştırma işlemi ultrasonik dalgaların sebep olduğu ses rüzgarı etkisiyle ortaya çıkmakta, bu şekilde katı-sıvı ara yüzeyinde ultrasonik dalga etkisiyle mikro düzeyde karışma sağlanmaktadır. Katı yüzeyin çok yakınında gerçekleşen mikro karışma olayı çok önemlidir, difüzyon sınır tabakasında azalma sağlamaktadır. Sıvı sistemlerde ses ötesi dalga kavitasyonu olarak adlandırılan bir etki yaratmaktadır. Bu olay sıvı içinde kabarcıkların oluşma, büyüme ve sönmesiyle ilgilidir. Kabarcıkların sönmesi (çökmesi) asimetrik olarak ara yüzey yakınında gerçekleşmekte ve katı yüzeyine çarpan mikrojetler oluşturmaktadır. Yüksek şiddetli ultrasonik dalganın bu özelliği temizleme işlemlerinde kullanılmaktadır. Katı yüzeyine çarpan mikrojetler sıvının katı içine enjekte olmasına da yol açar. Sistem yapısına bağlı olarak kabarcıklar bazen çökmez ve uygulanan ultrasonik dalgayla aynı frekansta titreşmeyi sürdürür. Bu titreşim hareketi aynı zamanda sıvının karışmasını sağlar. Tüm bu olaylar, dış direnci etkileyerek, mekanik karıştırma uygulamalarında olduğu gibi kütle transferini de kolaylaştırır. Materyalde bir seri sıkışma ve genleşme hızlı bir şekilde meydana gelir. Katılarda bu basınç değişimleri süngerin sürekli sıkılıp bırakılması gibi bir etki yapar. Bu "sünger etkisi" katıdan içindeki sıvının çıkmasına ve dış ortamdaki sıvının katının içine girmesine neden olur.

Ultrasonik dalgaya maruz kalan bitkisel dokularda fiziksel değişimler meydana gelmektedir. Ultrasonik dalga etkisiyle hücre duvarları hasar görerek doku içindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin ortaya çıkması kolaylaşmaktadır. Çözücü fazına bu maddelerin kütle transferi ile aktarımı artmaktadır Bu nedenle ultrasonik dalga destekli

ekstraksiyon gelecekteki uygulamalar için önemli potansiyele sahiptir. Ultrasonik ekstraktörün dizaynında ekstraktör içerisindeki ultrasonik dalgaların dağılımı önemli bir parametredir. Ultrasonik probun dalga yayan yüzeyinin yakınlarında maksimum ultrasonik güç bulunmaktadır. Proba olan uzaklık arttıkça ultrasonik yoğunluk (etki) azalmaktadır. Ayrıca katı partiküllerin artması da ultrasonik yoğunluğunu azaltmaktadır. Dalgaların sabit kalmasını önlemek için genellikle karıştırma veya çalkalama yapılır (Vinatoru 2001, Mulet vd. 2003,Tavman vd. 2009).

Bitki materyalinden fenoliklerin ekstraksiyonunda, ses ötesi dalga uygulamaları, statik ve dinamik modlarda kullanılmaktadır. Statik sistem sürekli çözücü transferinin olmadığı kapalı-hat ekstraksiyon uygulamasıdır. Dinamik ekstraksiyonda çözücü sürekli beslenerek, analitlerin etkin adsorpsiyonu ve ekstraksiyon kabından transferleri sağlanır. Bu tip sonikasyonda, ekstrakte edilmiş analitlerin sürekli transferi, ısı ile ilişkili herhangi bir termo-kararsız bileşiğin oluşmasını ve bozulmaları önler.

Ses ötesi dalga uygulamaları yaygın olarak prob (sonda) ve ultrasonik banyo sistemleri ile yapılmaktadır. Prob sistemi ile örnek çoğunlukla temastadır ve bu sistemde tekrar edilebilirlik (repeatability) ve yeniden üretilebilirlik (reproducibility) zor sağlanır. Aynı zamanda örnekte kirlenme ve köpük üretimi riski daha yüksektir. Ultrasonik banyo sistemleri, bir seri örneğin eşzamanlı olarak çalışılmasına imkan verir ve daha yüksek yeniden üretilebilirliğe olanak sağlar (Artık vd. 2016).

Ultrason destekli ekstraksiyon sistemi oldukça basit, pahalı olmayan ve verimli bir ekstraksiyon sistemidir ve endüstriyel amaçlar için kullanılan büyük ölçekli uygulamalarda, fazla miktarlarda çözücünün hızlı ve kolay kullanımına imkan verir. Ultrasonik dalganın katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılmasının başlıca yararları hızlı kinetik ve verim artışıdır. Ayrıca ultrasonik dalga, düşük sıcaklıklarda da etkin olarak uygulanabildiğinden sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesini mümkün kılar (Tavman vd. 2009)

3.3 Deney Tasarımları

Deneyler, araştırmacılar tarafından bir sistemi yada belirli bir süreci tanımlamak ve anlamak için kullanılır. Literatürde bir deney aynı zamanda bir testtir. Bir süreç yada sistemin girdilerinde değişiklik yapılarak çıktıların gözlemlenmesi ve analiz edilmesidir. Deney Tasarımı ilk olarak 1920' lerde ünlü İngiliz istatistikçi R.A. Fisher ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Fisher aynı zamanda gözlemlenen veri gruplarının ortalamaları arasında önemli farklılıklarının olup olmadığının ölçülmesinde kullanılan, varyans analizi (ANOVA) tekniğini de geliştirmiştir. Fisher aritmetik düzenlemenin en uygun yolunun varyans analizi olduğunu söylemiştir (Montgomery 2001, Gökçe ve Taşgetiren 2009).

Deney tasarımının en temel amaçlarından biri deney hatalarını minimuma indirmektir. Bu amaç, rastgeleleştirme ile sağlanır. Rastgeleleştirme, bir deneyde gözönüne alınmayan, ancak deney sonuçlarını etkileyecek olan gürültü değişkenlerinin etkisini tüm çıktılara eşit dağıtabilmek için kullanılır. Deney tasarımları rastgeleliği sağlamak, çıktılar üzerine etki edecek etkenleri düzeyleri ile belirlemek, etkenler arasındaki ilişkileri saptamak ve en düşük maliyetle en çok güvenilebilir bilgiyi elde edebilmenin yollarını araştırmak için kullanılır. Deney tasarımı ve planlaması heyecan verici bir süreç olmasına rağmen bir o kadarda zaman alıcıdır. Deneyin planlaması sırasında bir kontrol listesi oluşturulur. Bir deneyin tasarımında kontrol listesinde oluşturulan adımların hiçbiri bir birinden bağımsız değildir. Bazen listedeki bir önceki adıma dönülüp gerekirse revize edilebilir ve tekrar uygulamaya geçilir. Örnek bir kontrol listesi aşağıda verilmiştir.

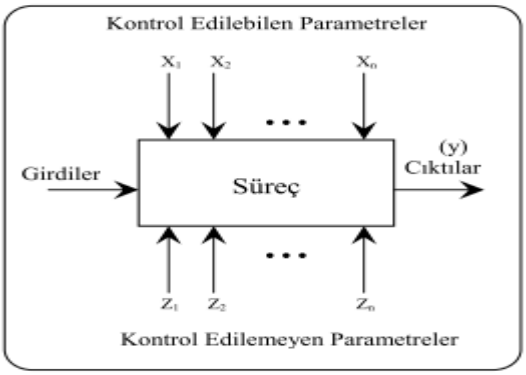
1. Deneyin amaç ve hedeflerinin belirlenmesi
2. Bütün değişken özelliğe sahip kaynaklarının tanımlanması
    a. Deney üniteleri
    b. Kontrol edilebilen faktörler
    c. Kontrol edilmeyen faktörler
    d. Bloklama işlemleri
3. Uygulamada deneyi ünitelere ayırmak için bir kuralın belirlenmesi
4. Deneyin ölçü birimlerinin belirlenmesi
5. Pilot bir uygulama yapılması

6. Pilot uygulamadan sonra model oluşturulması
7. Analiz için bir çerçeve oluşturulması
8. Kaç adet gözlem yapılacağının hesaplanması
9. Gözden geçirme ve revizyon

Genel olarak deneyler sistemin ya da sürecin performansını ölçmede de kullanılır. Bir deney modeli şekil 3.13 de gösterilmiştir. Burada deneyin gerçekleştirilmesi sürecinde, deneyde kullanılacak parametreler bir takım girdilerdir. Bunlar makine, teçhizat, yöntem ve insan kaynakları gibi girdi türleri olabilir. Parametreler iki şekilde deneye etki eder, bunlar kullanıcı tarafından bizzat kontrol edilebilen parametreler, mesela kullanılacak malzemelerin çeşitleri, sıcaklık farklılıkları, karışım oranları gibi parametrelerdir. Kontrol edilemeyen parametreler ise kullanıcının müdahale edemediği çevre sıcaklığı, nem oranı, sıcaklık değişimi, nakliye gibi daha akla gelmeyen birçok sebeplerdir. Bir deney tasarımında kontrol edilemeyen parametreler mutlaka göz önüne alınmalıdır (Montgomery 2001, Gökçe ve Taşgetiren 2009).

Şekil 3.13' de X_1, X_2 ve X_3 kontrol edilebilen parametreler ve Z_1,Z_2 ve Z_3 ise kontrol edilemeyen parametrelerdir. Deney sonucunda elde edilecek çıktılar şu sorulara cevap vermelidir (Montgomery 2001, Gökçe ve Taşgetiren 2009).

1. y Çıktısını en fazla etkileyen parametre hangisidir
2. y çıktısı en az, nominal yada en yüksek değerde istendiği zaman, X parametrelerinin değerleri ne olmalıdır
3. Z_1,Z_2 ve Z_3 kontrol edilmeyen parametreleri minimize etmek için kontrol edilebilen (X) parametrelerin değerleri ne olmalıdır?



Şekil 3.13 Bir sistem yada sürecin genel modeli (Mongomery 2001)

Deney tasarımı diğer bilimsel disiplinlere benzer ve kendine has terminoloji ve metodolojiye sahiptir. Bilindiği gibi deneysel çalışmalarda çok sayıda deney yapılır. Bu deneyler laboratuar ortamında, pilot uygulama, tam uygulama yada klinik olarak yapılabilmektedir. Deney tasarımı sebep ve etki ilişkisini belirlemek için planlanmış bir yaklaşımdır. Deney tasarımı için şunlar gereklidir (Gökçe ve Taşgetiren 2009).

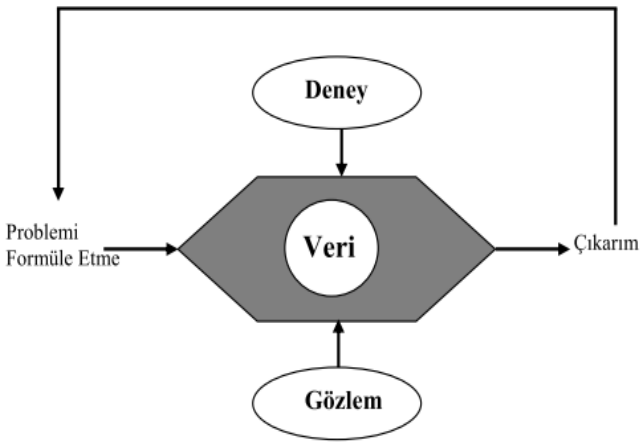
1. Toplam deney sayısını azaltmak,
2. Tasarımcının formüle ettiği etkinliği eş zamanlı olarak değiştirebilmek,
3. Doğru bir deney stratejisi belirlemek.

Eğer bir deney doğru bir şekilde tasarlanırsa, en iyi sonuç için veriler doğru bir şekilde toplanmış olacaktır. Bundan dolayı deney tasarımı yapılırken aşağıdaki sorulara cevap verilecek şekilde tasarım yapılmalıdır (Gökçe ve Taşgetiren 2009).

1. Sonuçlar ve parametrelerin etkisi hesaplanabiliyor mu?
2. Sonucu kaç tane parametre etkiliyor?
3. Eş zamanlı olarak kaç tane parametre hesaba katılmalı?
4. Kaç tane deney tekrarının yapılması gerekiyor?
5. Ne tür bir veri analizi (regresyon, ANOVA) kullanılmalı?
6. Etkiler üzerindeki hangi seviye farklılıkları ne kadar önemlidir?

Veriler deneysel ya da gözlemsel çalışmaların merkezindedir. Deneysel çalışmaların en temel problemlerinden biri de çıkarımların formüle edilmesidir. Şekil 3.14 de görüldüğü gibi veriler deneysel çalışmaların ve gözlemlerin kesişim noktasında olmalıdır. Deneysel

çalışmalarda değişkenlerin kaynağı her bir test için kontrol edilebilir ya da sabitlenebilir. Ancak gözlemsel çalışmalarda değişkenler kontrol edilemezler sadece veri olarak kaydedilebilirler.



Şekil 3.14 Bilimsel çalışmalarda istatistiksel girdi düzeyi

İstatistiksel deney tasarımının amacı minimum zaman, kaynak ve harcama ile maksimum anlamlı verileri toplamaktır. Bundan dolayı deney tasarımı geleneksel yöntemlerden uzak ve araştırmalara yeni bir yaklaşım getirir. Geleneksel deney tasarım yöntemleri, yüksek malzeme maliyeti, uzun zaman ve kaynak gerektiren yöntemlerdir. Her bir parametrenin deney üzerindeki etkisini araştırmak için diğer bütün parametreler sabit tutularak, her seferinde bir parametre denenir. Bu durumda parametrelerin aynı anda 4 yada 5'den fazla seviyeleri olamaz. Klasik yada geleneksel yöntemlerle yapılan deney çalışmalarında eş zamanlı analiz mümkün olamamaktadır.

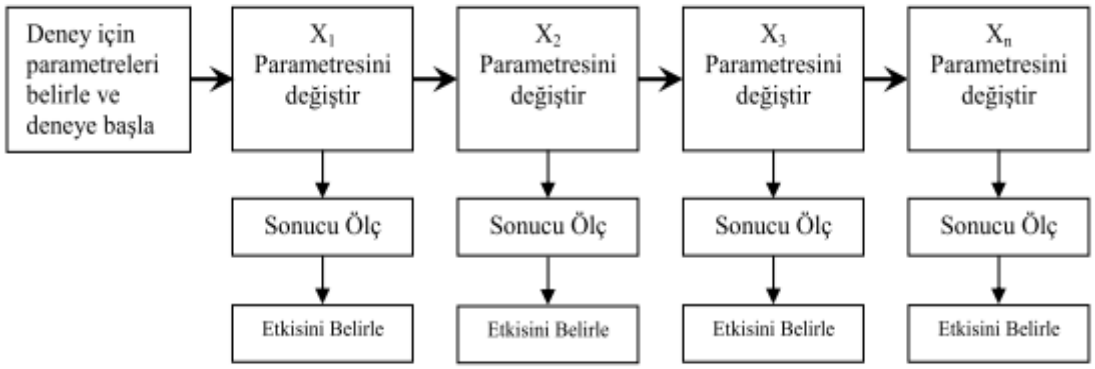
Bütün bu problemler istatiksel deney tasarım yöntemleri ile giderilebilir. Bütün gözlemsel çalışmaların metodolojisi iki büyük gruba bölünür. Bunlar;

1. Klasik yada pasif metodoloji
2. Aktif yada istatistiksel metodoloji

Klasik Metodoloji İle Deney Tasarımı

Klasik yada geleneksel yöntem ile yapılan deney çalışmalarında, her seferinde bir parametre değiştirilir ve diğer bağımsız parametreler sabit tutulur. Bu yöntemde sistemin parametrelerin arasında o anda değiştirilen parametrenin sisteme etkisinin araştırılması yapılır. Bu metot her bir parametre için bir başlangıç noktası yada temel seviye seçmekle başlar. Seçilen parametre dışındaki diğer parametreler kendi temel seviyesinde sabit tutulur. Seçilen parametreler kendi aralığı içerisinde değiştirilerek deneye etkisi araştırılır. Şekil 3.15'de görüldüğü gibi bir ürün geliştirmede yada üretim problemini çözmek için klasik metodoloji ile yapılan deney tasarımında, deney için parametreler belirlenir ve deneye başlanır. Deneyde X_1 parametresi değiştirilir, deneyin sonucu ölçülür ve deneye etkisi belirlenmeye çalışılır bu sırada diğer parametreler sabit tutulur.

Klasik metodoloji ile yapılan deney çalışmasında deneyi etkileyen dış faktörler (kontrol edilemeyen) çok fazla hesaba katılmaz.



Şekil 3.15 Klasik metodoloji ile yapılan deney tasarımı ve ölçümü akış şeması

Klasik metodoloji ile yapılan deney çalışmasında, deneyin parametreleri niceliksel (kantitatif) ise o zaman deneyin seviye skalasının dışındaki bir değerin deneye olan etkisi hesaplanabilir. Ancak deney parametresi niteliksel (kalitatif) ise parametreye ait seviye skalasının dışındaki bir değeri tahmin etmek mümkün değildir.

Geleneksel yöntemler ile yapılan deneysel çalışmalarda parametreler arasındaki etkileşim göz ardı edilmektedir. Aynı zamanda çok zaman harcanmakta ve daha pahalıya mal olmaktadır (Gökçe ve Taşgetiren 2009).

İstatistiksel Metodoloji İle Deney Tasarımı

İstatistiksel olmayan deney tasarım yöntemleri kullanıldığında varyasyon ve regresyon analizi sonuçları bazen etkin süreci yada işlemi belirlemeyebilir. Örneğin bir regresyon analizi bir işlemin sonucu etkileyecek sıcaklığın etkisini tam olarak belirlemeyebilir. Bundan dolayı bir araştırmacı işlemin sonucunu iyileştirmek için bir sıcaklık ayarlaması yapmaz. İşlem sırasında sıcaklığın normal dalgalanmasından dolayı sapmalar meydana gelebilir. Bu dalgalanma istatistiksel olarak bulunabilecek büyüklükte değildir. Bu tür kısıtlar ve hatalar istatistiksel deney tasarımı yöntemi ile giderilir (Gökçe ve Taşgetiren 2009). Deney tasarımında klasik yöntemlerin yetersizliği istatistiksel deney tasarım yöntemleri ile giderilmiştir.

İstatistiksel deney tasarımında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları;

1. Tam faktöriyel
2. Kesirli faktöriyel
3. Taguchi metodu, sayılabilir.

Tam Faktöriyel Deney Tasarımı

En az iki veya daha fazla parametre ve bu parametrelere ait en az iki veya daha seviyelerin bulunduğu deneylerde seviyelerin birbirleri ile çarpımları ile oluşan kombinasyondur. Tam faktöriyel deney tasarımı istatistiksel metotlar ile birleştirildiğinde analiz aşamasında araştırmacılara büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bilimsel olarak deney tasarımı 3 temel prensibe sahiptir. Bunlar; deney tekrarı, deneyin sırasının rastgele yapılması ve deneyin bloklanmasıdır. Tam faktöriyel deney tasarımında rastsal tam bloklamalar kullanılır. Bloklamanın temel amacı bilinmeyen ve kontrol edilemeyen hataların deneyi etkilemesini önlemesidir. Eğer bu temel prensipler yerine getirilmezse deneyde bilinmedik hataların ortaya çıkması muhtemeldir. Deney esnasında oluşabilecek hatalardan ve sapmalardan sakınmak için iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar deneylerin rastgele yapılması ve geriye dönük detayların incelenerek gerekli düzetmelerin

yapılmasıdır. Deney sonrasında varyasyon analizinin yapılabilmesi için deneyin en az üç kez tekrar edilmesi gerekmektedir. Böylece deney istatistiksel olarak yorumlanabilir. Tam faktöriyel deneylerin analizinde ANOVA (Varyasyon Analizi) ve regresyon analizi kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile bir parametrenin deney üzerindeki etkisi hesaplanabilir. Varyasyon ve regresyon analizi teknikleri işlem sırasınca bir değişiklik yapmadan farklılıkların kaynağının belirlenmesine yardımcı olur (Gökçe ve Taşgetiren 2009).

Kesirli Faktöriyel Deney Tasarımı

Tam faktöriyel deney tasarımında parametrelerin bütün seviyelerinin kombinasyonları tek-tek denendiğinden deney maliyetini arttırmakta ve çok zaman almaktadır. Yani tam faktöriyel deney tasarımında maksimum zaman ve maliyet söz konusudur. Tasarım yaparken deneyden elde edilecek veriler ile harcanan maliyet ve zaman arasındaki bağıntı çok önemlidir. Maliyetten ve zamandan kazanmak için deney sayısının orantılı olarak azaltarak kesirli faktöriyel deney tasarımı elde edilir.

Taguchi Metodu

Taguchi Yöntemi, parametre tasarımı, sistem tasarımı ve tolerans tasarımı üzerine kurulmuş bir deney tasarım ve optimizasyon yöntemidir. En yaygın olarak, kalite güvence sistemleri kapsamında toplanan verilerin, istatistiksel analizinde kullanılmaktadır. Taguchi'nin deney tasarım yöntemi, farklı parametrelerin, farklı seviyeleri arasından optimum kombinasyonu saptamak adına oldukça yararlı bir yöntemdir. Her bir parametrenin, her bir seviyesini içeren tüm kombinasyonlar için oldukça fazla deneysel çalışma yapılması gereken durumlarda, Taguchi Yöntemi kullanılarak, çok daha az sayıda deneysel çalışma ile sonuca ulaşmak mümkün olmaktadır. Taguchi deneysel tasarım metodunda geliştirilen metodoloji üç temel kavramdan oluşur bunlar; sistem tasarımı, parametre tasarımı ve tolerans tasarımıdır (Gökçe ve Taşgetiren 2009).

3.4 Cevap Yüzey Modelleri

Cevap yüzeyi yöntemi, bazı etkenlerin değerlerinin, cevap değişkeni üzerindeki etkisini ortaya koymak ve etken değerlerinin kombinasyonları arasından cevap değişkenini

maksimum (ya da minimum) yapan değeri (değerleri) bulmak amacıyla kullanılır. Bu yöntem cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin tanımlanması için kullanılan bir dizi matematiksel ve istatistiksel teknikten oluşmaktadır. Bu teknikler işlemdeki bağımsız değişkenlerin (etkenlerin) tek başına ya da kombinasyonlu olarak cevap üzerindeki etkilerini araştırır. Cevap yüzeyi yönteminde ilk adım cevap değişkeni üzerinde etkisi olduğu düşünülen etkenleri yani bağımsız değişkenleri belirlemektir.

Gerçek dünyada karşılaşılan problemler genellikle karmaşık yapıda olduğundan, problemlerin modellenmesinde birden fazla karakteristik kullanılır. Bu karakteristikler, probleme uygun biçimde uygulayıcı tarafından tanımlanan girdi değişkenleri (X_i,i = 1,2,...,k) ve cevap değişkenleri (Y_j, j= 1,2,...,r) olarak ele alınabilir. Aynı anda en iyi değeri elde edilmek istenilen birden fazla cevap değişkenine sahip problemler, çok cevaplı yüzey (multi response surface) problemi olarak adlandırılır. Çok cevaplı yüzey problemlerinin çözümü, problemin modellenmesi ve optimizasyonu olmak üzere iki aşamada değerlendirilir.

Çok cevaplı yüzey probleminin modellenmesinde cevap yüzey yöntemi (response surface methodology) nden yararlanılır. Myers ve Montgomery (2002) yanıt yüzey yöntemini, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlamıştır. Yanıt yüzey yöntemi, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin yanıtı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenleri nin sistemin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir

Cevap yüzey yöntemleri;

1. Deney tasarımı,
2. Stokastik modelleme,
3. Optimizasyon yöntemleri,

biçiminde tanımlı üç aşamadan oluşur ve cevap değişkeni ile girdi değişkenleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi için kullanılan matematiksel yöntemleri içerir. Cevap değişkenlerinin gelecekteki değerini doğru olarak tahmin edebilmek için cevap değişkeni ile girdi değişkenleri arasındaki ilişkiyi tanımlayacak uygun bir fonksiyonun belirlenmesi gerekir. Gerçek cevap fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller, genellikle ikinci dereceden polinomiyal modeller, üssel modeller veya eksponensiyel modeller kullanılır. Uygun bir model elde edildikten sonra, bu model optimum noktanın araştırılmasında kullanılır. Genel olarak karşılaşılan cevap yüzey problemlerinin doğrusal olmayan yapıda olduğu göz önünde bulundurulduğunda, yanıt yüzey yönteminin model stratejisi içinde ikinci dereceli polinomsal modellerin önemli bir yeri vardır. Bu tür modellerin yüzeyi daha iyi açıkladığı düşünüldüğünden, genellikle seçilecek tasarımlar ikinci dereceli fonksiyonları destekler niteliktedir (Myers ve Montgomery 2002; Türkşen 2011).

Gerçek dünyaya ilişkin problemler karmaşıklık (complexity) veya belirsizlik (vagueness) içeriyorsa problemin modellenmesi sonucunda elde edilen cevap, gerçek değeri tam ve doğru olarak yansıtmayacaktır (Eğer bir model ölçülebilir ve türetilmiş değişkenler arasındaki ilişkiler üzerine kuruluysa ve bir belirsizlik içermiyorsa *deterministik* iken, eğer belirsizlik durumları veya olasılık kavramlarına yer veriyorsa *stokastik* modeldir). Gözlem sayısının yetersiz olması, hataların normal dağılım varsayımlarını sağlamasında zorluklarla karşılaşılması, girdi ve cevap değişkenleri arasındaki ilişkinin belirsiz olması gibi durumlarda klasik regresyon analizinin uygulanmasında çeşitli problemlerle karşılaşılır. Cevapların fonksiyonel yapılarının belirlenmesindeki eksik ve yetersiz bilginin neden olduğu belirsiz durumları açıklayacak biçimde problemin modellenmesi gerekir. Böyle durumlarda kesin olmayan yaklaşık tanımlamalar yapılabilir ya da veriler bir aralıkta tanımlanabilir.

Genel olarak çok değişkenli optimizasyon (multi objective optimization) alanında yapılan çalışmalarda temel amaç, cevap fonksiyonlarına en iyi değeri verecek girdi değişken değerlerinin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda çok cevaplı yüzey probleminin çözümü için geliştirilmiş çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Boyut indirgeme stratejisinden yararlanılarak oluşturulan bu yaklaşımlarla, cevap yüzey fonksiyonları tek cevap

fonksiyonuna dönüştürülüp, uzlaşık çözüm sağlayacak girdi değişken düzeyleri belirlenmiştir. Cevap fonksiyonlarını tek bir cevap fonksiyonuna dönüştürüp, tek amaçlı optimizasyon problemi gibi çözümleme yapmak kolay bir yaklaşım olsa da, cevap fonksiyonlarını aynı anda optimize edecek girdi değişken değerleri elde edilemeyecektir. Çünkü, bir cevap fonksiyonunu optimum yapacak koşullar, diğer cevaplar için genellikle optimumdan uzaktır. Çok cevaplı yüzey problemini oluşturan her bir cevap fonksiyonu bir amaç fonksiyonu olarak değerlendirildiğinde çok cevaplı yüzey problemi, çok amaçlı optimizasyon problemine dönüşecektir. Çok amaçlı optimizasyon probleminin çözümünde ideal çözüm olarak adlandırılan tek bir optimal çözüm yoktur. Uygulamada ideal çözümler yerine alternatif (seçenek) çözümler önem kazanır. Pareto optimal çözüm (Pareto optimal solution) olarak adlandırılan bu çözümler, çok amaçlı optimizasyon probleminin alternatif çözümlerini karakterize etmekte kullanılırlar. Çok amaçlı optimizasyon probleminin çözümü sonucu elde edilecek olan Pareto çözüm kümesi, karar vericiye geniş bir seçenek sunar. Bu sonuçların içinden karar vericinin ilgilendiği tüm amaçları tatmin edecek uzlaşık çözümü seçmesi istenir (Türkşen 2011).

Cevap yüzey yöntemi, ilk olarak 1951 yılında Box ve Wilson tarafından endüstriyel deneyler için geliştirilmiştir (Myers ve Montgomery 2002). Khuri ve Cornell (1996), cevap yüzey yöntemi hakkında detaylı bilgiler vererek, çok cevaplı yüzey probleminin modellenmesi ve optimizasyonu için geliştirilen yöntemlerden söz etmişlerdir. Box ve Draper (2007), değişkenlerin bileşimlerinden elde edilen yeni değişkenlerin de modele dahil edildiği karma modellere yer vererek, Ridge analiz üzerinde bilgilendirme yapmışlardır. Ridge analizi, cevap yüzeylerine grafiksel yorum getiren bir tekniktir ve temelinde ikinci dereceden çok terimli regresyon modeli yatmaktadır. Tahmin edilen cevap fonksiyonunda, en iyi durumun kararlaştırılmasında yardımcı olacak ek analiz yöntemlerinin kullanılmasına *ridge analiz* denir.

Çok cevaplı yüzey probleminin eş anlı optimizasyonunda en çok kullanılan stratejilerden biri boyut indirgeme stratejisidir. Bu amaçla oluşturulan yöntemlerle çok cevaplı bir yüzey problemi tek cevaplı probleme dönüştürülerek, tek amaçlı optimizasyon problemi gibi çözümlenir. Literatürde tek bir amaç fonksiyonunun optimizasyonu biçiminde tanımlı ilk yaklaşım istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı (desirability function approach)

dır. Bu yaklaşımda, cevap fonksiyonları ilgilenilen fonksiyonların türüne göre tanımlanan bir dönüşüm ile [0,1] aralığında değerler alan istenebilirlik fonksiyonuna dönüştürülür. Elde edilen dönüşüm fonksiyonlarının geometrik ortalamasının maksimum değeri, problem için optimal çözüm olarak değerlendirilir (Türkşen 2011).

Çok cevaplı yüzey probleminin optimizasyonunda en çok kullanılan bir diğer yaklaşım genelleştirilmiş uzaklık yaklaşımı (generalized distance approach) dır. Yaklaşım, cevap değişkenlerinin hedef değerlerden sapmalarının karesel ifadesi biçiminde tanımlı bir kayıp fonksiyonunun minimizasyonuna dayanır. Amaç, kayıp fonksiyonuna minimum değeri verecek optimal girdi değişken değerlerinin elde edilmesidir. Çok cevaplı yüzey problemlerinin optimizasyonu için geliştirilen yaklaşımlar, bir amaç fonksiyonuna dayalı olarak tasarımcıya tek bir çözüm sonucu verirken, çok amaçlı optimizasyon yöntemleri etkileşimli bir süreç sunar (Türkşen 2011).

3.4.1 Cevap yüzey problemleri

Fen ve mühendislik alanında karşılaşılan çok cevaplı ürün veya tasarım problemlerinin çoğunda öncelikle ilgilenilen probleme ilişkin veri seti uygun bir deney tasarımı yöntemi ile düzenlenerek, yanıtların tahmini model denklemlerinin elde edilmesi istenir.

Genellikle bu alanda yapılan çalışmalarda, yüzeye uygun tahmini cevap fonksiyonunun oluşturulması için cevap yüzey yönteminden yararlanılır.

3.4.1.1 Cevap yüzeyleri

Araştırmaların çoğunda, etken olarak adlandırılan girdi değişkenlerinin (X_i,i = 1,2,...,k) ilgilenilen cevap değişkeni/değişkenleri (Y_j, j= 1,2,...,r) üzerindeki etkisinin incelenmesi istenilebilir. Bu durumda girdi değişkenleri ve bunların düzeylerini birlikte karşılaştırmak mümkündür. Buna çok etkenli deney denir. Genel olarak çok etkenli deney, bir etkenin her düzeyinin geri kalan diğer bütün etken düzeyleri ile denendiği düzendir.

Deney tasarımında etkenlerin düzeyleri nitel veya nicel yapıda olabilir. Şayet denemeler ilgilenilen etkenin nicel düzeylerinden oluşuyorsa, bu durumda cevap değişkenini etkileyebilecek doğrusal ve eğrisel etkilerin araştırılması istenilebilir.

Çok etkenli deneylerde, denemelerin iki ya da daha fazla etken düzeylerinin kombinasyonlarından oluştuğu durumda, denemeler ile cevaplar arasındaki ilişki cevap yüzey formundadır. Cevap değişkenlerinin gelecekteki değerini doğru olarak kestirebilmek için cevap değişkeni ile girdi değişkenleri arasındaki ilişkiyi belirleyecek uygun bir fonksiyonun veya modelin belirlenmesi gerekir. Amaç, ilgilenilen probleme bağlı olarak maksimum veya minimum cevap değerlerinin araştırılması ve bu cevap değerlerini sağlayan optimal girdi değişken düzeylerinin belirlenmesidir.

Cevap değişkeni üzerinde etkili olabilecek k tane etken, $X_1,X_2,X_3,\ldots,X_k$ önceden belirlenmiş olsun, "Gerçek" cevap değişkeni η ile $X_1,X_2,X_3,\ldots,X_k$ arasındaki bilinmeyen bir fonksiyonel ilişki

$$\eta = \phi\,(X_1,X_2,X_3,\ldots,X_k\,;\Theta_1,\Theta_2,\Theta_3,\ldots,\Theta_k) = \phi\,(\mathbf{X},\boldsymbol{\Theta}) \qquad (3.2)$$

eşitliği ile verilebilir. Burada, ϕ bilinmeyen bir fonksiyonel ilişki formunu gösterirken,

$\Theta_1, \Theta_2, \Theta_3,\ldots, \Theta_k$ bilinmeyen model parametreleridir. Gerçek cevap sistemine ilişkin ϕ fonksiyonunun yapısı bilinmediğinden η değişkenine ilişkin değerler gözlenemez. Bu nedenle, ϕ ile tanımlı bilinmeyen ilişkiyi temsil edecek uygun bir fonksiyonun belirlenmesi gerekmektedir. Bu fonksiyonel ilişkiyi belirlemek amacıyla, d. dereceli uygun bir f polinomu ile bilinmeyen ϕ fonksiyonu Taylor serisine açılmış ve d. dereceden sonra kesilmiş kısmı ile ϕ fonksiyonu temsil edilmiştir (Myers ve Montgomery 2002).
Bu durum

$$Y = f\,(X_1,X_2,X_3,\ldots,X_k;\beta_1,\beta_2,\beta_3,\ldots,\beta_k)+\varepsilon = f\,(X,\beta)+\varepsilon \qquad (3.3)$$

eşitliği ile ifade edilebilir. Burada, Y gözlenen cevap değişkeni; $X_1,X_2,X_3,\ldots,X_k$; girdi değişkenleri; $\beta_1, \beta_2, \beta_3,\ldots, \beta_k$ bilinmeyen model parametreleri ve ε model hatasını göstermektedir. Eşitlik (3.3)'de f ile tanımlanan polinomsal fonksiyonun ϕ 'yi tam olarak açıklayamama durumu söz konusu olabileceğinden, modele bir hata terimi (ε) eklemesi yapılmıştır. Ayrıca, girdi değişkenlerinin ait olduğu deney tasarımından kaynaklanabilecek deneysel ve gözlemsel hatalar da ε terimi altında değerlendirilmiştir (Şayakdokuyan 2006, Türkşen 2011).

Cevap yüzeyi yöntemi için birçok özel tasarımlar üzerinde çalışılmıştır. Bu tasarımlar diklik ve dönersellik (rotatable) özellikleri taşıdıkları zaman cevap yüzeyi problemlerinin çözümünde daha sağlıklı çözümler üretmektedirler. Merkezi bileşik tasarımlar ve Box-Behnken tasarımları bu alanda en çok başvurulan ve dönerselik özelliğini sağlayan önemli deney tasarım yöntemleridir. Deney tasarımı bölgesi boyunca tahmini varyansın sabit dağılımını sağlamak, ikinci dereceden tasarımlar için büyük önem taşımaktadır. Deneyi yapan ve tasarlayan kişiler tasarım uzayında başlangıç noktalarının ve optimum noktaların nerelerde olduğunu tasarımın başlarında bilemezler (Baş 2010).

Ancak $Var(y(x))$ değerini en küçük yapacak, merkezden belli uzaklıktaki noktalar, deney noktaları olarak alınabilir. Bu noktalar üç boyutlu uzayda bir küre üzerinde bulunacaktır. Bu tür hazırlanmış tasarımlara dönersel tasarımlar denir. Böylece, sabit tahmini varyans, gelecekteki cevap değerlerinin bir tahmini olarak $\hat{y}(x)$'ın kalitesinin ilgilenilen alan (region of interest) içerisinde aynı kalmasını garantiler. Tasarımın dönersellik yapısına sahip olmasının amacı varyansın tutarlılığının sağlanmasıdır. Tasarımda dönersellik özelliği, tasarım parametrelerinin seçimi için çok önemli bir katkı sağlamaktadır (Myers ve Montgomery 2002, Baş 2010).

Çok etkenli deney tasarımında bulunması gereken, ilgilenilen alan içerisinde **d.** dereceden polinomlar için sonuç üretmeye izin vermesi, tahmin edilen polinomun kontrol edilebilmesine ve analiz edilmesine imkan vermesi, çok sayıda deney noktası içermemesi, bloklama yapısına uygun olması ve bir çekirdek (nucleus) formuna sahip olmalısı gibi özellikler dönersel tasarımlar için de geçerlidir.

3.4.1.2 Cevap Yüzeyleri İçin İkinci Derece Model Kavramı

Gerçek dünya problemleri genellikle doğrusal olmayan yapıdadır. Bu tür problemlerin modellenmesinde, ikinci derece modeller ile bilinmeyen yüzeye daha az hata ile yaklaşım yapılacağı düşünülmüştür (Khuri ve Cornell 1996, Myers ve Montgomery 2002). Bu nedenle, ikinci derece model yapısının cevap yüzey çalışmaları içinde önemli bir yeri vardır. Eşitlik (3.3)'de verilen model tanımlamasına bağlı kalınarak, *k* değişkenli bir ikinci dereceli model denklemi

$$Y = \beta o + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X^2{}_i + \sum_{i=1}^{k} \sum_{i \lhd j}^{n} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \tag{3.4}$$

eşitliği ile tanımlanır. Eşitlik (3.4)'deki model parametrelerini tahmin etmek için en küçük kareler veya ağırlıklı en küçük kareler yöntemleri kullanılabilir. Model parametrelerinin uygun bir yöntemle tahmin edildiği varsayımı altında tahmini cevap modeli

$$\hat{Y} = \hat{\beta} o + \sum_{i=1}^{k} \hat{\beta}_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \hat{\beta}_{ii} X^2{}_i + \sum_{i=1}^{k} \sum_{i \langle j}^{n} \hat{\beta}_{ij} X_{ti} X_{tj} + \varepsilon \tag{3.5}$$

olacaktır. Burada, $\hat{\beta} o$ tahmini sabit terim, $\hat{\beta}_i$ modelin tahmini doğrusal katsayılarını, $\hat{\beta}_{ii}$ modelin tahmini karesel katsayılarını, $\hat{\beta}_{ij}$ modelin tahmini çapraz çarpım katsayılarını, *i*=1,2,…,k; *j*= 1,2,…k; $i \neq j$ ifade etmektedir *n* sayıda gözlemden oluşan bir cevap değişkeni ile ilgilenildiği durumda (3.5) eşitliği ile tanımlı tahmini model denklemi

$$\hat{Y} = \hat{\beta} o + \sum_{i=1}^{k} \hat{\beta}_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \hat{\beta}_{ii} X^2{}_i + \sum_{i=1}^{k} \sum_{i \langle j}^{n} \hat{\beta}_{ij} X_{ti} X_{tj}, \quad t=1,2,\ldots,n \tag{3.6}$$

biçiminde olacaktır (Khuri ve Cornell 1996, Türkşen 2011).

3.4.1.3 İkinci derece modelleme için bazı deneysel tasarımlar

Yanıt yüzeye uygun model oluşturmak için, öncelikle girdi ve yanıt değişkenleri iyi tanımlanmış bir veri setine ihtiyaç duyulur. Çeşitli yöntemlerle veri toplamak mümkündür. Deney yolu ile veri elde etmek bunlardan biridir. Veri elde etme işleminin modellemede kolaylık sağlayacak bir takım kurallara uygun olması için deneyin tasarlanması gerekir. Eşitlik (3.5) ile verilen model tanımlamasına uyabilecek tasarımlara literatürde geniş yer verilmiştir (Box ve Draper 2007, Khuri ve Cornell 1996, Myers ve Montgomery 2002). İkinci dereceli tasarımlara Merkezi Bileşik (Kompozit) Tasarımlar (Central Composite Designs), 3k Çok Etkenli Tasarımlar (3k Factorial Designs) ve Box-Behnken Tasarımları (Box-Behnken Designs) örnek olarak verilebilir.

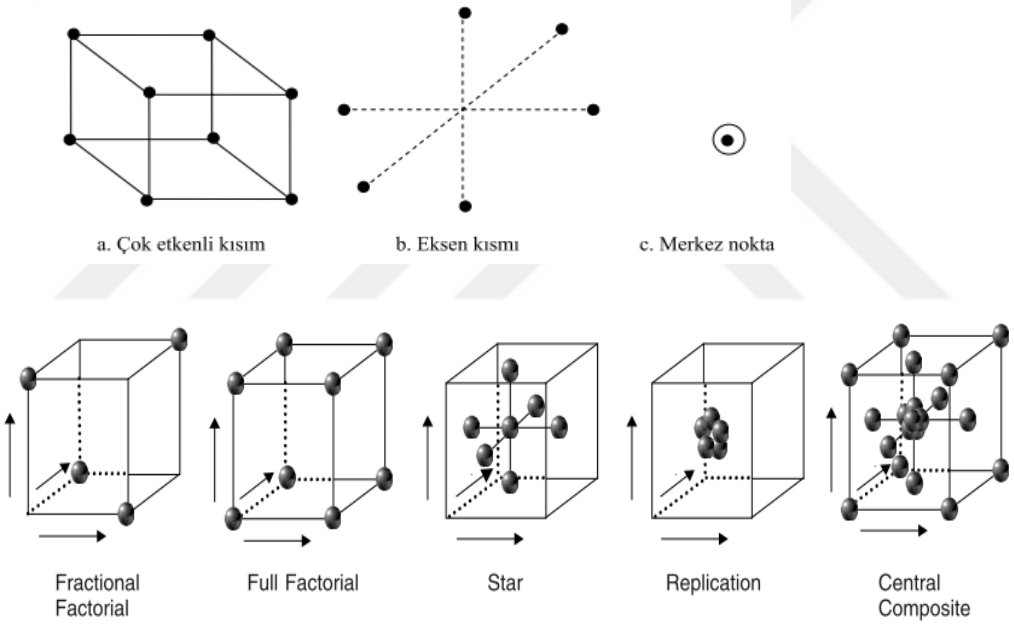
İkinci dereceli yanıt yüzeyler ile birlikte kullanılacak tasarımlarda her bir etken en az üç düzey içermek zorundadır. Aksi halde model parametreleri tahmin edilemez.

Merkezi Bileşik (Kompozit) Tasarımlar:

İlk olarak Box ve Wilson (1951) tarafından "Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması" ismi ile tanıtılan cevap yüzey yöntemi ve merkezi bileşik tasarımlar daha sonra Box ve Hunter (1961) tarafından geliştirilmiştir. Bileşik tasarımların özel bir formu olarak bilinen merkezi bileşik tasarımlar, ikinci dereceli tasarımlar ailesinin bir üyesidir. Bu tasarımlar için az sayıda deneyin yeterli olması ve tasarımların deney hakkında yeterli bilgiyi sağlaması, diğer ikinci dereceli tasarımlara göre uygulamada daha fazla tercih edilmesine neden olmuştur. Merkezi bileşik tasarımlar, çok etkenli kısım (factorial portion), eksen kısmı (axial portion) ve merkez noktalar (center points) olmak üzere üç kısımdan oluşur. k deneyde etken sayısı olmak üzere deneyin çok etkenli kısmı 2^k tasarım noktası, eksen kısmı 2k tasarım noktası ve merkezde tekrarlanan n_c sayıda deney toplamı merkezi bileşik tasarım için tasarım noktalarını verecektir. Tasarımda kullanılan deneme noktaları kendine özel öneme sahiptir. Faktöriyel noktalar ile etkileşimli terimlerin tahmine katkısı belirlenirken, eksen noktaları ikinci dereceli terimlerin tahmini için bilgi sağlar. Merkez noktaları hatanın tanımlanması için gerekli olup, deneysel hataların bağımsızlığını sağlayacağı için oldukça önemlidir. Sözü geçen tasarım noktaları, üç boyutlu uzayda bir

küpün köşelerinde veya eksenleri üzerinde bulunur (Türkşen 2011). Merkezi bileşik tasarımın kısımları şekil 3.16'da verilmiştir.

Şekil 3.16a-b'de gösterilen tasarım noktaları genellikle değişkenlerin gerçek değerlerine bağlı çeşitli fonksiyonlar ile tanımlanan kodlanmış değerlerle ifade edilir. Kodlamanın temel amacı, tasarımın dik (ortogonal) hale getirilmesi ve hesaplama kolaylığıdır. Tahmini cevap yüzey modelleri kodlanmış değişkenlere göre oluşturulur. Kodlanmış bir değerden gerçek değere geçiş basit bir dönüşüm aracılığı ile sağlanır. Literatürde tanımlı değişik kodlama yöntemleri vardır (Box ve Draper 2007).



(a)

(b)

Şekil 3.16 a Merkezi bileşik tasarım (k=3), b. Merkezi bileşik tasarım ögeleri

Kodlamaya bağlı olarak parametre tahminleri üzerinde yapılacak yorumlar da değişecektir. Girdi değişkenleri tanım aralıklarına göre çok etkenli kısımlarda ±1, merkezde 0 ve eksen kısımlarında ±α olarak kodlanır. Burada, $\alpha=2^{k/4}$ şeklinde tanımlıdır. Girdi değişkenlerinin gerçek değerleri ve kodlanmış değerleri arasındaki ilişki çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Bir girdi değişkeninin kodlanmış ve gerçek değerleri arasındaki ilişki

Kod değeri	Gerçek değer
- α	X_{min}
-1	$[(X_{max} + X_{min})/2]-[(X_{max}-X_{min})/2\ \alpha]$
0	$(X_{max} + X_{min})^2$
1	$[(X_{max} + X_{min})/2]+[(X_{max}-X_{min})/2\ \alpha]$
+α	X_{max}

3.4.2 Çok cevaplı yüzey probleminin modellenmesi

Birden fazla cevap değişkenine sahip problemler, çok cevaplı yüzey problemi olarak değerlendirilir. Çok cevaplı yüzey probleminin modellenmesinde, girdi değişkenleri arasında ilişki olabileceği gibi cevap değişkenleri arasında da ilişki olabileceği durumu göz önünde bulundurulmalıdır. Cevaplar arasında ilişki olduğu düşünüldüğünde, her bir cevapın bireysel ve bağımsız değerlendirilmesi anlamsız olacaktır. Bu nedenle probleme özgü tanımlanmış bir deneysel bölgede, cevapların girdi değişkenlerinin bir fonksiyonu olacak biçimde eş anlı modellenmesi gerekir.

Çok cevaplı bir deneyde, N deney sayısı olmak üzere, k tane kodlanmış girdi değişkeni $X_1, X_2, \ldots, X_k$ için elde edilen r sayıda cevap değişkeni $Y_1, Y_2, \ldots, Y_r$ ele alınsın. Belirli bir R deneysel bölgesi içinde, girdi değişkenleri kullanılarak elde edilen polinomsal tipteki regresyon modelleri ile cevap değişkenlerinin açıklanabileceği varsayılsın. Buna göre i cevap modeli

$$\mathbf{Y}_i = \mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta}_i + \boldsymbol{\varepsilon}_i\ ,\ \ i = 1,2,\ldots,r \qquad (3.7)$$

eşitliği ile vektörel biçimde tanımlanır. Burada, $\mathbf{Y}_i$, N ×1 boyutlu i. cevap vektörü; $\mathbf{X}_i$, $N \times p_i$ boyutlu ve p_i ranklı kodlanmış girdi değişkenlerinin bilinen fonksiyonlarından oluşan tasarım matrisi; $\boldsymbol{\beta}_i$, $p_i \times 1$ boyutlu bilinmeyen parametreler vektörü ve $\boldsymbol{\varepsilon}_i$, i.cevap vektörüne ilişkin rasgele hata vektörünü göstermektedir. (3.4.6) eşitliği ile tanımlı r cevaplı modelin her biri için hataların ilişkisiz, model varyansının sabit olduğu ve farklı

modeller arasındaki hataların ilişkili olduğu varsayılsın. Tanımlanan varsayımlar matematiksel olarak

$$\begin{aligned} &E(\varepsilon_i) = 0, i = 1,2,\ldots,r \\ &Var(\varepsilon_i) = \sigma_{ii} I_N \\ &Cov(\varepsilon_i, \varepsilon_j) = \sigma_{ij} I_N \\ &i,j=1,2,\ldots,r; \qquad i \neq j \end{aligned} \tag{3.8}$$

biçiminde ifade edilebilir. (3.7) ile tanımlı *r* tane model,

$$\mathbf{Y} = X\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \tag{3.9}$$

eşitliği ile tanımlanabilir. Eşitlik (3.9) ile tanımlı model yapısına doğrusal çok cevaplı model adı verilir. Bu gösterimde, $Y = \left[Y_1^{'} : Y_2^{'} : \ldots : Y_r^{'} \right]^{'}, N_r \times 1$ boy utlu cevap vektörü; $X = diag(X_1, X_2, \ldots, X_r), Nr \times p$ boyutlu tasarım matrisi $\left(p = \sum_{i=1}^{r} p_i \right)$; $\beta = \left[\beta_1^{'} : \beta_2^{'} : \ldots : \beta_r^{'} \right]^{'}, p \times 1$ boyutlu parametre vektörü ve $\varepsilon = \left[\varepsilon_1^{'} : \varepsilon_2^{'} : \ldots : \varepsilon_r^{'} \right]^{'}, N_r \times 1$ boyutlu hata vektörü biçiminde tanımlanmaktadır. Buna göre eşitlik (3.9)' datanımlanan çok cevaplı model

$$\begin{bmatrix} \mathbf{Y}_1 \\ \mathbf{Y}_2 \\ . \\ . \\ . \\ \mathbf{Y}_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1 & 0 & \ldots & 0 \\ 0 & \mathbf{X}_2 & \ldots & 0 \\ . & . & \ldots & . \\ . & . & \ldots & . \\ . & . & \ldots & . \\ 0 & 0 & \ldots & \mathbf{X}_r \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{\beta}_1 \\ \boldsymbol{\beta}_2 \\ . \\ . \\ . \\ \boldsymbol{\beta}_r \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \boldsymbol{\varepsilon}_1 \\ \boldsymbol{\varepsilon}_2 \\ . \\ . \\ . \\ \boldsymbol{\varepsilon}_r \end{bmatrix} \tag{3.10}$$

ifadesinde tanımlı matris notasyonu ile gösterilebilir. (3.9) eşitliğinde tanımlı **β** parametre vektörünün tahmin edicisi

$$\hat{\beta} = \left(X^{'} \left(\Sigma^{-1} \otimes I_N \right) \; X \right)^{-1} X^{'} (\Sigma^{-1} \otimes I_N) Y \tag{3.11}$$

eşitliği ile tanımlıdır. Eşitlik (3.11)'de tanımlı tahmin ediciye Genelleştirilmiş En Küçük Kareler (Generalized Least Squares) tahmin edicisi denir. Burada Σ , cevapların varyans kovaryans matrisi ve I_N , NxN boyutlu birim matrisidir. $\hat{\beta}$ ' nın kovaryans matrisi

$$Cov(\hat{\beta}) = \left(X' \left(\Sigma^{-1} \otimes I_N \right)^{-1} X \right)^{-1} \tag{3.12}$$

olacaktır. Eşitlik (3.12) ile tanımlı tahmin ediciyi hesaplamak için Σ 'nın bilinmesi gerekir. Eğer bu matris bilinmiyorsa, öncelikle bu matrisin tahmin edilmesi gerekir.

$\hat{\Sigma}\left[\hat{\sigma}_{ij} \right], i, j = 1, 2, ..., r$ olmak üzere cevaplar arasındaki tahmini varyans değeri,

$$\hat{\sigma}_{ij} = \frac{Y_i'(I_N - X_i(X_i'X_i)X_i'(I_N - X_j(X_j'X_j)X_j')Y_j'}{N} \tag{3.13}$$

eşitliği ile tanımlıdır. (3.11) ve (3.12) ile tanımlanan eşitliklerde Σ yerine (3.13) ile tanımlı tahmin edici kullanılabilir.

Cevap değişkenlerinin ilişkili olabileceği düşünülerek kullanılan bu yöntem, literatürde Görünüşte İlişkisiz Regresyon (Seemingly Unrelated Regression) olarak tanımlanmıştır. Tahmini model hatalarının ilişkisiz olduğu ve her bir cevap fonksiyonu için aynı tasarım matrisinin kullanıldığı durumda eşitlik (3.11) ile tanımlı tahmin edici en küçük kareler tahmin edicisi olacaktır (Krafft ve Schaefer 1992, Türkşen 2011).

3.4.3 Çok cevaplı yüzey problemlerinin optimizasyonu

Çok cevaplı yüzey problemleri genellikle optimal değeri elde edilmek istenilen çelişik cevaplar içerir. Bu tür problemlerin optimizasyonunda cevap fonksiyonları için istenilen cevap değerlerini verecek optimal girdi değişken düzeylerinin belirlenmesi temel hedeftir. Çok cevaplı yüzey probleminin çözümü için geliştirilen yaklaşımları çeşitli kategorilerde incelemek mümkündür.

Yapılacak olan deneyde, ilk tasarım noktaları seçilerek, doğrusal bir cevap fonksiyonu ile cevap yüzeyi yönteminin başlangıcı yapılır. Cevap yüzeyi için model kurulduktan ve regresyon eşitlikleri yardımıyla birinciden dereceden cevap yüzeyi formu hazırlandıktan sonra belirlenen aralıklarda elde edilen bu sonuca bakılarak maksimum (ya da minimum) noktaya ulaşmak için hangi yöne doğru gidilmesi gerektiğine karar verilmesi gerekmektedir. Cevap yüzeyini maksimum (ya da minimum) yapan noktaya ulaĢmak için cevap yüzeyinin konturlarından yararlanılabilir. Cevap yüzeyini maksimum yapan noktaya varıldığı anlaşıldığında, daha masraflı olan ikinci dereceden bir cevap yüzeyi formuyla işleme devam edilir (Baş 2010).

Cevap yüzeyi yönteminde optimal deney noktalarının belirlenmesinde iki aşamalı bir yol izlenmektedir;

1-Bir deneye dayanarak, bir sonraki deneyde cevap yüzeyi altındaki maksimum (ya da minimum) noktaya doğru nereden hareket edileceğinin belirlenmesi. Bu aşama en dik çıkış (iniş) yöntemi olarak bilinir.
2-Yüzeyin maksimum (ya da minimum) ya da yaklaşık maksimum (ya da minimum) sonucunu belirledikten sonra cevap yüzeyinin bu maksimum (ya da minimum) nokta civarındaki alanda denkleminin belirlenmesi.

En dik çıkış (iniş) yöntemi

Deneysel çalışmalarda cevap yüzeyinin fonksiyonu bilinmez. Bu nedenle herhangi bir yüzey için en iyi durumlar kümesini bulabilmek için en dik çıkış (iniş) yolu (the path of steepest ascent-descent) olarak bilinen yöntem kullanılabilir. En dik çıkış (iniş) yöntemi, deney tasarımı, model tasarım yöntemleri ve ardışık deneyler ile bölgenin araştırılması aşamalarını kapsamaktadır. Bu yöntemdeki düşünce, cevap yüzeyinin küçük bir alanı üzerinde basit bir deney uygulamaktır. Burada uygulamaya yönelik olarak bu yüzey, düzlem olarak düşünülebilir. Bundan sonra bu düzlemin denklemi bulunur ve bu denklemden de yüzeyin en iyi noktasına doğru hareket etmek için gidilecek yön belirlenir. Daha sonraki deney, tepe (dip) noktasına (en iyi nokta) en hızlı şekilde ulaşacak yönde tasarlandığı için bu yöntem en dik çıkış yöntemi olarak adlandırılır. Bu yöntem, sonradan yapılacak ardışık deneylerin orjinal deneyden ne kadar uzak olacağını belirlemez, ancak,

bundan sonraki deneyin hangi yönde yapılacağını gösterir (Myers ve Montgomery 2002, Baş 2010).

$X_1, X_2,..,X_k$ başlangıç bölgesinde sistemin, uygun bir tahmini için birinci-dereceden bir modelle tanımlanmış olduğu varsayılırsa, bu aşamadan sonra en dik çıkış yöntemi aşağıdaki adımları izlemektedir:

1.Birinci-dereceden bir dik tasarım (ikinci-dereceden merkezi denemeleri olan tasarımlarda uygundur) kurulur.

2.Maksimizasyonlu bir cevap gerekiyorsa bir en dik çıkış yolu, minimizasyonlu bir cevap gerekiyorsa bir en dik iniş yolu oluşturulur.

3.Regresyon katsayılarına bakılarak bir sonraki aşamada deney yapılıp yapılmayacağına karar verilir. Eğer deney yapılacaksa, hangi noktalarda yapılacağı belirlenir. Deney yapılacak noktaların belirlenmesi için cevap değerleri gözlemlenir. Bir sonraki deney yeniden birinci-dereceden model kullanılarak (ikinci-dereceden merkezi denemeleri olan tasarımlar da uygundur) yürütülür.

4.Uyum eksikliği (lack of fit) testi yapılır. Eğer testin sonucuna göre uyum eksikliği önemli bulunursa yeni bir yön oluşturacak ikinci bir hesaplama yapılır. Eğer testin sonucuna göre uyum eksikliği önemli bulunmazsa ikinci dereceden bir deney tasarımı modeli kurularak optimum nokta bulunur (Myers ve Montgomery 2002, Baş 2010).

Çok cevaplı yüzey problemlerinin optimizasyonunda genel olarak kullanılan ilk yaklaşım 1960 yılında Lind tarafından geliştirilen eş yükselti grafikleri (contour plots) çizimidir. Eş yükselti grafikleri, tahmini fonksiyonlarının grafikleridir. Myers ve Montgomery (2002), çalışmalarında eş yükselti grafiklerinin kullanımlarına detaylı olarak yer verilmiştir. Bu grafiksel yöntem, cevapların eş yükseltilerini belirleyerek, cevaplar için optimal çözüm içeren bölgenin bulunmasına yardımcı olur. Bu bölge, tüm cevapların eş anlı olarak en iyi değerlerinin elde edildiği çözüm uzayıdır. İki girdi değişkenine sahip yüzey problemlerinin çözüm bölgesinin bulunmasında kolaylık sağlayan bu yaklaşım, ikiden fazla girdi değişkenine sahip problemlerle ilgilenildiğinde sınırlı kullanıma sahiptir.

Çok cevaplı yüzey optimizasyonunda kullanılan bir diğer yaklaşım, cevap fonksiyonlarının tek cevap fonksiyonuna dönüştürülerek çözümlenmesi ve optimal girdi değişken değerleri kümesinin elde edilmesidir. Literatürde bu amaçla en çok kullanılan yaklaşımlar, İstenebilirlik Fonksiyonu Yaklaşımı (Desirabillity Function Approach) ve Genelleştirilmiş Uzaklık Yaklaşımı (Generalized Distance Approach)' dır.

İstenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı

İstenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı, çok cevaplı yüzey problemlerinin optimizasyonunda en çok kullanılan yaklaşımlardan biridir. Bu yaklaşımda tahmini cevap fonksiyonları $\hat{Y}_j, j=1,2,...,r,[0,1]$ aralığında tanımlı ölçekten bağımsız bir değere, $d_j(\hat{Y}_j(X))$, dönüştürülür. Burada, $d_j, j=1,2,...,r, j.$ cevap için $d_j:\hat{Y}_j \to [0,1]$ biçiminde tanımlı reel değerli bir fonksiyondur. Her bir cevap fonksiyonu için elde edilen $d_j, j=1,2,...,r, j$, tüm sistemi tanımlayacak bir istenen fonksiyona

$$D=(d_1 d_2 \cdots d_r)^{1/r} \tag{3.14}$$

dönüştürülür. (3.14) eşitliği ile tanımlı D cevap fonksiyonunu maksimum yapacak girdi değişkenlerinin belirlenmesi istenir. Eğer cevap fonksiyonlarından biri için istenebilirlik değeri sıfır ise $(d_j=0, j=1,2,...,r),$ diğer cevapların kabul edilebilir olması sistem için optimalliğin sağlandığını göstermez. Cevap fonksiyonlarının maksimum, minimum ya da hedef değerlerinin elde edilmesi durumlarına göre farklı istenebilirlik fonksiyonu tanımlamaları yapılabilir. Tahmini $\hat{Y}_j$ cevapını d_j değerine dönüştürmek için tek yönlü ve iki yönlü olmak üzere iki dönüşüm fonksiyonu kullanılır. $\hat{Y}_j$ cevapının maksimum veya minimum değeri bulunacaksa tek yönlü dönüşüm, $\hat{Y}_j$ cevapı bir hedef değere atanacaksa iki yönlü dönüşüm kullanılır. $Y_j^{\min}$ ve $Y_j^{\max}$ sırası ile ilgilenilen $j.$ yanıt fonksiyonunun alabileceği minimum (alt sınır) ve maksimum (üst sınır) değerler olmak üzere, minimum değeri elde edilmek istenilen $j.$ cevap için istenebilirlik fonksiyonu tek yönlü dönüşümle

$$d_j\left(\hat{Y}_j(\mathbf{X})\right)=\begin{cases}1 & , \quad \hat{Y}_j(\mathbf{X}) \le Y_j^{\min} \\ \left(\dfrac{Y_j^{\max}-\hat{Y}_j(\mathbf{X})}{Y_j^{\max}-Y_j^{\min}}\right)^s & , \quad Y_j^{\min} < \hat{Y}_j(\mathbf{X}) < Y_j^{\max}, \ j=1,2,...,r \\ 0 & , \quad \hat{Y}_j(\mathbf{X}) \ge Y_j^{\max}\end{cases} \qquad (3.15)$$

biçiminde tanımlanır. Eğer, $j.$ cevap fonksiyonunun maksimum değerinin elde edilmesi hedefleniyorsa istenebilirlik fonksiyonu

$$d_j\left(\hat{Y}_j(\mathbf{X})\right)=\begin{cases}1 & , \quad \hat{Y}_j(\mathbf{X}) \ge Y_j^{\max} \\ \left(\dfrac{\hat{Y}_j(\mathbf{X})-Y_j^{\min}}{Y_j^{\max}-Y_j^{\min}}\right)^s & , \quad Y_j^{\min} < \hat{Y}_j(\mathbf{X}) < Y_j^{\max}, \ j=1,2,...,r \\ 0 & , \quad \hat{Y}_j(\mathbf{X}) \le Y_j^{\min}\end{cases} \qquad (3.16)$$

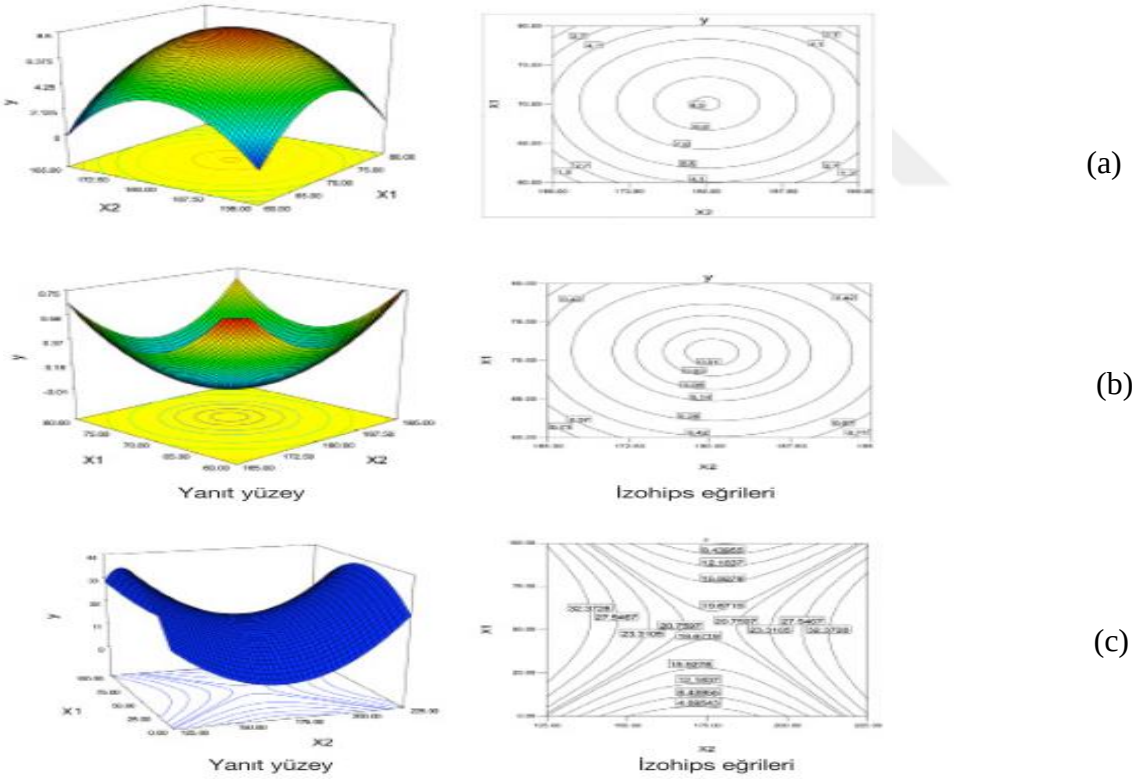
eşitliği ile tanımlı olacaktır. (3.15) ve (3.16) eşitliklerinde tanımlı olan s değeri, şekil parametresi olup, değeri kullanıcı tarafından belirlenir. s=1 için, istenebilirlik fonksiyonu hedef değer etrafında lineer olarak artar. $s\langle 1$ için, fonksiyon dışbükey iken s>1 için fonksiyon içbükeydir. Yöntemde cevap değişkenleri için alt sınır ve üst sınır değerlerinin seçimi oldukça önemlidir. Bu değerlerin uygun olmayan biçimde seçilmesi optimalden oldukça farklı sonuçların elde edilmesine neden olacaktır. İstenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı, sezgisel ve basit olmasından dolayı oldukça ilgi çekici olmasına rağmen bu yöntemde cevap fonksiyonları arasındaki ilişki göz ardı edilmekte ve cevapların ilişkisiz olduğu varsayılmaktadır (Türkşen 2011).

İzohips Eğrileri

Doğrusal olmayan programlama yaklaşımında çok yanıtlı sistemlerin optimizasyonunda temel amaç olan tüm yanıtlar arasında en iyi dengenin sağlanması karşılanamamaktadır. Çok cevaplı optimizasyon problemlerinin çözümünde, doğrusal olmayan programlamayaklaşımı ve cevapların izohips eğrileri çizilerek üst üste yerleştirilmesi (superimposing), desirability (istenilen hedefe ulaşma) fonksiyonu yaklaşımı dışındaki diğer yaklaşımlardır.

Cevapların izohips eğrilerinin çizilerek üst üste yerleştirilmesi (superimposing), çok cevaplı optimizasyon problemlerinin çözümünde kullanılan diğer bir yaklaşımdır. Her bir

izohips eğrisi, bir bağımsız değişken merkezdeyken, diğer değişkenlerin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. Katsayılara bağlı olarak izohips eğrilerinin dairesel, eliptik ya da eğer şeklinde olması; maksimum nokta, minimum nokta, (eyer noktası-saddle point) durgun tepe ya da yükselen/azalan tepe koşullarını verebilmektedir. Maksimum nokta, minimum nokta ve eğer noktası için yanıt yüzey grafikleri ve izohips eğrileri sırasıyla Şekil 3.17a-c'de gösterilmiştir. Cevap yüzeyinin dairesel olması, değişkenler arasındaki etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu, elips ya da eyer şeklindeki yüzeyler iç etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir. En küçük elips ya da dairesel şekil ile sınırlandırılmış yüzey öngörülen en yüksek veya en düşük yanıtı belirtmektedir. Ancak bu yaklaşım çok sayıda bağımlı ve bağımsız değişkenin (dört veya daha fazla) bir arada incelendiği durumlar için kullanışlığını kaybetmektedir. Ayrıca, cevapların çok farklı skalaya sahip olması aynı grafik üzerinde gösterilmelerini de zorlaştırmaktadır (Myers ve Montgomery 2002, Bezerra vd. 2008).



(a)

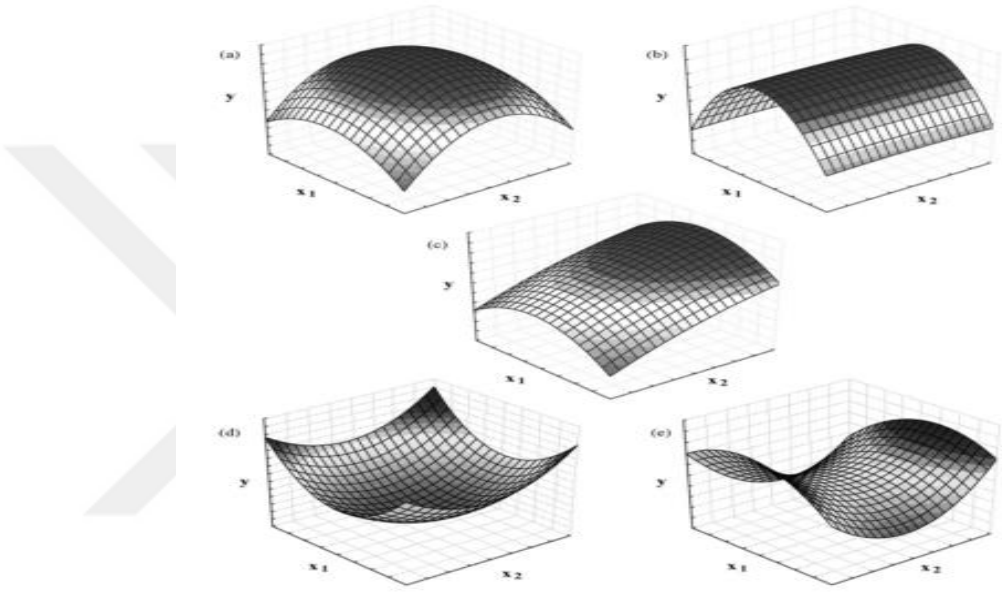
(b)

(c)

Şekil 3.17 a Maksimum nokta için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri*
b Minimum nokta için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri**
c Eyer noktası için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri***

*((x_0(0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri düşüş göstermektedir)
**((x_0(0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artış göstermektedir)
***((x_0(0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir)

İki değişkenin optimizasyonunda kuadratik cevap yüzeyleri için bazı farklı profiller de oluşabilir. Şekil 3.18. a ve b maksimum noktası deneysel bölge içinde bulunan yüzeyleri temsil eder. Şekil 3.18.b özellikle ilgi çekicidir, değişken x_2 ilgili olan plato görünümü bize x_2 'nin seviye çeşitliliğinin, çalışma sistemini etkilemediğini göstermektedir. Şekil 3.18.c yüzeyi, maksimum noktanın deneysel bölgenin dışında olduğunu ve mümkünse, yeni bir tasarımın gerekli olduğunu göstermektedir. Şekil 3.18.d yüzeyi, minimum nokta ve Şekil 3.18.e yüzeyi ise eyer noktası gibi bir kritik nokta sunar (Bezerrra vd. 2008).



Şekil 3.18 İki değişkenli optimizasyonun kuadratik modelleri için üretilmiş bazı cevap yüzey profilleri

a. maksimum, b. plato, c. maksimum nokta deneysel bölgenin dışında, d. minimum, e. eyer noktası

3.4.4 Çok amaçlı optimizasyon

Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin hedefe olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir. Herhangi bir optimizasyon prosedürü, genellikle hedef fonksiyonu adı verilen önceden tanımlanmış kriterleri maksimize veya minimize etmek için karar (bağımsız) değişkenleri adı verilen belirlenen koşulların değiştirilmesini içerir. Optimizasyon proses tasarımlarını verimli hale getirmek için kullanılmaktadır.

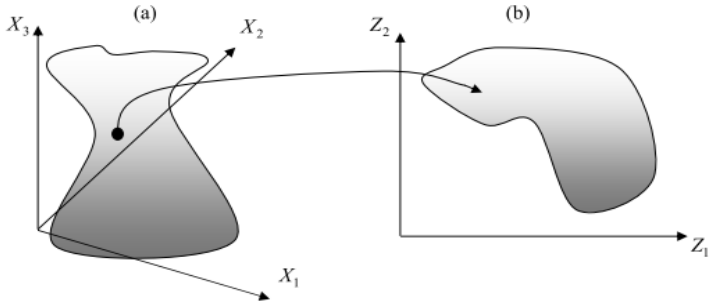
Çok cevaplı yüzey problemlerinde, cevap fonksiyonlarını tek bir cevap fonksiyonuna dönüştürüp, tek amaçlı optimizasyon problemi gibi çözümleme yapmak kolay bir yaklaşım olsa da, her bir cevap fonksiyonuna en iyi değeri verecek optimal girdi değişken değerleri elde edilemeyecektir. Çünkü, bir cevap fonksiyonunu optimum yapacak koşullar, diğer cevaplar için genellikle optimumdan uzaktır. Bu nedenle çok cevaplı yüzey problemlerinin optimizasyonunda tek bir çözüm vektörü yerine alternatif çözümler önem kazanır. Buna göre çok cevaplı yüzey problemi, çok amaçlı optimizasyon problemi olarak ele alınabilir.

3.4.4.1 Çok amaçlı optimizasyon problemi

Çok amaçlı optimizasyon probleminde maksimum veya minimum değeri elde edilecek birden fazla amaç fonksiyonu ile ilgilenilir. Genel olarak, bir çok amaçlı optimizasyon problemi

$$\min/\max\{f_1(X), f_2(X),\ldots, f_r(X)\} \quad X \in S \tag{3.17}$$

biçiminde tanımlanabilir. Burada, $X = [X_1 X_2 \ldots X_k]$ biçiminde tanımlı girdi değişkenleri vektörü olup, S kümesi kısıt fonksiyonlarını içeren kısıt kümesi olarak tanımlıdır. Çok amaçlı optimizasyonda girdi değişkenlerinin oluşturduğu karar uzayına ek olarak, amaç fonksiyonları uzayı oluşturulur. Amaç uzayı olarak da adlandırılan bu uzay, Z ile gösterilir. Karar uzayındaki her bir X vektörü için, amaç uzayında $Z = [Z_1 Z_2 \ldots Z_r]$ ile tanımlı bir fonksiyon vektörü bulunur. n boyutlu karar vektörü ve r boyutlu amaç vektörü arasında şekil 3.19'daki gibi bir eşleme vardır. Şekil 3.19'da $S \subset R^3$ için uygun bir çözüm bölgesi ve $Z \subset R^2$ için uygun bir amaç bölgesi gösterilmiştir (Deb 2004).



Şekil 3.19 a. Karar uzayı, b. amaç uzayı arasındaki ilişki (Deb 2004)

Doğrusal ve Doğrusal Olmayan Çok Amaçlı Optimizasyon

Bir çok amaçlı optimizasyon probleminde, tüm amaç fonksiyonları ve kısıt fonksiyonları doğrusal ise problem, doğrusal çok amaçlı optimizasyon problemi olarak adlandırılır. Amaç veya kısıt fonksiyonlarından en az bir tanesi doğrusal değil ise, problem doğrusal olmayan çok amaçlı optimizasyon problemi olur.

Dışbükey ve Dışbükey Olmayan Çok Amaçlı Optimizasyon

$f_j : R^n \to R,\ j = 1,2,\ldots,r$ ile tanımlı bir fonksiyon ve her $X^1 \in R^n$ ve $X^2 \in R^n$ için,

$$f_j\left(\lambda X^1 + (1-\lambda)X^2\right) \le \lambda f_j(X^1) + (1-\lambda) f_j(X^2), 0 \le \lambda \le 1 \tag{3.18}$$

eşitsizliği sağlanıyor ise , f_j , $j = 1,2,\ldots,r$ fonksiyonuna dışbükey (convex) fonksiyon denir. Bir çok amaçlı optimizasyon probleminde, tüm amaç fonksiyonları ve uygun çözüm bölgesi dışbükey ise, problem dışbükey çok amaçlı optimizasyon problemi olarak adlandırılır. Amaç fonksiyonları için (3.18) eşitsizliğinin sağlanmaması durumunda problem, dışbükey olmayan çok amaçlı optimizasyon problemidir (Apaydın 2002; Türkşen 2011).

Pareto Optimallik

Eğer, her $j = 1,2,\ldots,r$ için $f_j(X^*) \le f_j(X)$ ve en az bir p indisi için $f_p(X^*) \langle f_p(X)$ olacak biçimde bir başka karar vektörü $X \in S$ yoksa, $X^* \in S$ Pareto optimaldir. Bir başka ifade ile eğer, her $j = 1,2,\ldots,r$ için $Z_j^* \le Z_j$ ve en az bir t indisi için $Z_t^* \langle Z_t$ olacak

biçimde bir başka amaç vektörü $Z \in Z$ yoksa, $Z^* \in Z$ Pareto optimaldir (Miettinen 2002).

Çok amaçlı optimizasyon probleminin çözümünde, tek amaçlı optimizasyon problemlerinin çözümünde olduğu gibi bir tek optimal çözüm elde edilemez. Genel olarak elde edilen hiç bir çözüm bütün amaç fonksiyonlarını aynı anda optimize edemeyecektir. Bu nedenle çok amaçlı optimizasyonda ideal çözüme ulaşılamaz. İdeal çözüm yerine etkin, uzlaşık, baskın çözümler olarak adlandırılan Pareto çözümler ile çok amaçlı optimizasyon problemlerinin çözümleri karakterize edilir. Pareto Optimallik kavramı 1900'lü yılların başlarında, İtalyan iktisatçı ve sosyolog olan Vilfredo Pareto tarafından ortaya atılmıştır. Pareto optimallik felsefesinde, bir amacı iyileştirme ancak ve ancak diğer amaçlardan fedakarlık etme yoluyla sağlanmaktadır. Matematiksel olarak her Pareto optimal çözüm, çok amaçlı optimizasyon probleminin aynı derecede kabul edilebilir bir çözümüdür. Uygulamada ideal çözümler yerine genellikle Pareto optimal çözümler önem kazanır (Deb 2004, Türkşen 2011).

Baskınlık Kavramı

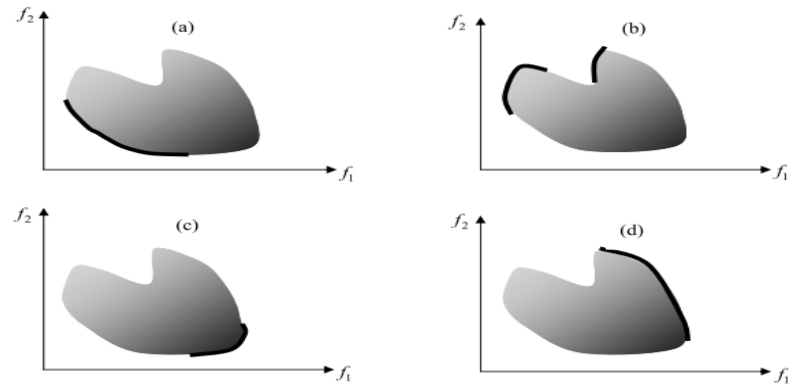
$X^1, X^2 \in S$ olmak üzere, minimum değeri elde edilmek istenilen tüm amaç fonksiyonları üzerinde X^1 çözümü, X^2 çözümünden daha kötü değil ve en az bir amaç fonksiyonu için X^1 çözümü, X^2 çözümünden daha iyi $(f_j(X^1) \langle f_j(X^2), \exists j = 1,2,\ldots r)$ ise X^1 çözümünün X^2 çözümüne baskın olduğu ve X^2 çözümünün ise basılgın olduğu söylenir. Herhangi bir amaç fonksiyonu değerinde azalma yaratan bir çözüm, diğer amaçların en az birinde herhangi bir artmaya neden olmuyorsa elde edilen çözüm baskındır. Sonlu sayıdaki bir çözüm kümesi için, tüm mümkün çözümler ikili karşılaştırılarak çözümler arasındaki baskınlık ya da basılgınlık ilişkisi ortaya konabilir. Eğer, X^1 çözümü ***r*** amaç fonksiyonu için X^2 çözümünden kesin olarak daha iyi çözüm veriyor ise X^1 çözümü X^2 çözümüne güçlü baskındır denir. Sonuçta, herhangi iki çözümün birbirine baskın olmadığı bir çözüm kümesine ulaşılması istenir. Elde edilen çözüm kümesindeki bir çözüm, bu kümenin dışındaki herhangi bir çözümü kapsar. Bu kümeye baskın çözüm kümesi adı verilir. Bir Pareto çözüm kümesi her zaman bir baskın çözüm kümesidir.

Çok amaçlı optimizasyonda iki hedef vardır. Bunlar

i. Pareto optimal yüzeye mümkün olduğu kadar yakın çözümler bulmak,

ii. Mümkün olduğu kadar çeşitli çözüm elde edebilmektir.

İlk hedef, tek amaçlı optimizasyon problemine benzer bir hedeftir. Elde edilen çözümlerin optimal çözümlere yakın olması istenir. İkinci hedef, çok amaçlı optimizasyon için temel hedeftir. Çözümlerin birbirlerine göre baskınlığını belirleyebilmek için Pareto optimal yüzeyde çok sayıda farklı alternatif çözüm elde edilmesi, diğer bir ifade ile çözüm çeşitliliğinin sağlanması gerekir. Bir optimizasyon algoritması ile elde edilen baskın çözümlerin, gerçek Pareto optimal çözüm kümesi olması her zaman mümkün olmayabilir. Fakat, elde edilen çözümlerin doğru Pareto optimal bölgeye yakınsaması istenir (Deb 2004). Şekil 3.20, optimal değeri elde edilmek istenilen iki amaç fonksiyonu için amaç uzayında olabilecek dört farklı durumda baskın çözümlerden oluşan Pareto yüzeyleri göstermektedir.



Şekil 3.20 İki amaç fonksiyonu için olabilecek dört farklı durumda elde edilen Pareto çözüm kümeleri (Deb 2004)

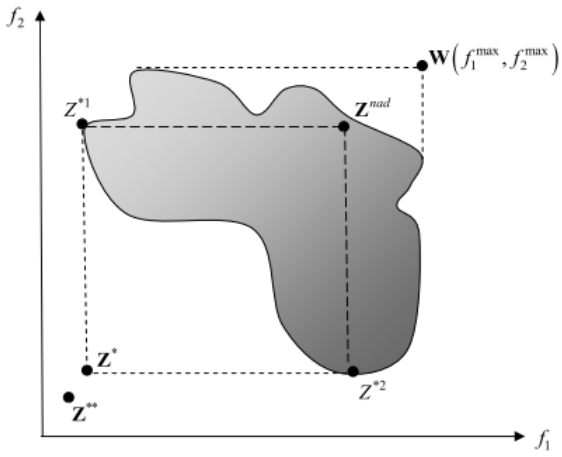
a. min f_1 ve min f_2, b. min f_1 ve max f_2, c. max f_1 ve min f_2, d. max f_1 ve max f_2

İdeal Amaç Vektörü

Bir çok amaçlı optimizasyon probleminde ilgilenilen her bir amaç için bir optimal çözüm vardır. Optimal çözümlerin oluşturduğu bu çözüm vektörüne ideal amaç vektörü denir. İdeal amaç vektörü Z^*'ın j. bileşeni

$$\min f_j(X),\ j=1,2,\ldots,r \qquad X \in S \tag{3.19}$$

ile tanımlı kısıtlı minimizasyon probleminin çözümüdür. Burada, $Z^* = f^* = \left[f_1^* f_2^* \ldots f_r^* \right]$ dır. İdeal amaç vektörü gerçekte olmayan bir çözümdür. Pareto optimal çözüm arayan çok sayıda çok amaçlı optimizasyon algoritması, ideal amaç vektörünü referans çözüm olarak kullanır. Şekil 3.21'de iki amaçlı bir problemin ideal amaç vektörü Z^* ile gösterilmiştir. Çok amaçlı optimizasyon probleminde, ideal amaç vektörüne yakın çözümlere ulaşılması istenir.



Şekil 3.21 $\min\{f_1, f_2\}$ problemi için ideal, ütopik (Z^{**}) ve nadir (Z^{nad}) amaç vektörleri (Deb 2004)

Ütopik Amaç Vektörü

İdeal amaç vektörü her bir amaç fonksiyonu için Pareto optimal kümesinin bir alt sınırını tanımlar. Bazı algoritmalar, arama uzayında amaç fonksiyonuna daha iyi çözüm veren çözümlere ulaşmak isterler. Ütopik amaç vektörü, her bir bileşeni ideal amaç vektörünün ilgili elemanından daha küçük değer alan amaç fonksiyonlarının oluşturduğu vektördür. Şekil 3.21'de Z^{**} ile gösterilmiş ve $Z^{**} = Z^* - \epsilon_i, \epsilon_i \rangle 0, i = 1,2,\ldots,r$ biçiminde tanımlıdır. İdeal amaç vektörü gibi gerçekte olmayan bir çözümdür.

Nadir Amaç Vektörü

Nadir amaç vektörü, Z^{nad}, her bir amaç fonksiyonu için Pareto optimal çözüm kümesinde en kötü çözüm vektörü tanımlar. Bu çözüm, şekil 3.19'da **W** ile gösterilen çözümden farklıdır. **W** amaç vektörü, tüm arama uzayı üzerinden elde edilen fonksiyon değerlerinden oluşurken, Z^{nad} uygun çözüm bölgesi içindedir. İyi tanımlanmış bir çok amaçlı optimizasyon probleminde nadir amaç vektörü, ideal amaç vektörünün ödünleşim değerlerinden yararlanılarak elde edilebilir. $Z^{*1} = \left[f_1(X^{*1}) f_2(X^{*1}) \right]$ ve $Z^{*2} = \left[f_1(X^{*2}) f_2(X^{*2}) \right]$ sırası ile f_1 ve f_2 fonksiyonlarının çözüm değerlerinin koordinatları olsun. Nadir amaç vektörü, $Z^{nad} = \left[f_1(X^{*2}) f_2(X^{*1}) \right]$ ile tanımlıdır.

Amaç Fonksiyonlarının Normalizasyonu

Çok amaçlı optimizasyonda bazı durumlarda yeniden ölçeklendirme tavsiye edilen bir yaklaşımdır. Amaç fonksiyonlarının normalleştirilmesi ile amaç değerleri yaklaşık olarak aynı büyüklüğe dönüştürülür. Pareto optimal çözüm bölgesinde her bir amaç fonksiyonunu normalleştirmek için, nadir ve ideal amaç vektörlerinden yararlanılır. Normalizasyon;

$$f_j^{norm} = \frac{f_j - Z_j^*}{Z_j^{nad} - Z_j^*}, \; j = 1, 2, \ldots, r \tag{3.20}$$

ile tanımlanır (Deb 2004).

Çok Amaçlı Optimizasyonda Klasik Yaklaşımlar

Çok amaçlı problemin optimizasyonu sonucunda elde edilen Pareto çözümlerin belirli bir önem sırasında değerlendirilmesi istenir. Bu nedenle bir karar vericiye ihtiyaç duyulur. Çok amaçlı optimizasyon probleminin çözümü, karar verici-analist işbirliği ile gerçekleştirilir. Analist, çözüm sürecinin matematiksel ve teorik yönünden sorumlu kişi ya da bilgisayar programlarıdır. Çok amaçlı optimizasyon yöntemlerinin çoğunda karar uzayı yerine, amaç uzayı ile ilgilenilir. Karar verici için amaç değerleri değişken değerlerinden daha önemli iken, problemin matematiksel modellemesi karar uzayı üzerinde gerçekleşir. Çok amaçlı optimizasyon için kullanılacak yöntemi seçerken

ilgilenilen problemin özelliklerine dikkat edilmesi gerekir (Köksoy ve Hocaoğlu 2005, Türkşen 2011).

Klasik çok amaçlı optimizasyon yaklaşımları ile genel olarak amaç fonksiyonları tek amaç fonksiyonuna dönüştürülerek, tek amaçlı optimizasyon problemi gibi çözümleme yapılır. Elde edilen çözüm Pareto kümesindeki çözümlerden yalnızca biri olacaktır. Algoritmanın bir kez işletilmesi ile Pareto çözüm kümesine ulaşılamamaktadır. Bu durum Pareto kümesindeki tüm çözümlere ulaşmakta zaman kaybı yaratacaktır. Ayrıca klasik algoritmalara özgü çeşitli parametrelerin kullanıcıya göre tanımlanması (ε-hata, hedef değerler, ağırlık katsayıları, …) yöntemlerin kullanımında zorluk yaratmaktadır. Çok amaçlı optimizasyon problemlerinin dışbükey olmadığı durumlarda klasik algoritmalarla Pareto çözüm kümesinin elde edilmesinin mümkün olmadığı görülmüştür. Klasik yaklaşımların yetersiz olduğu bu durumda, son yıllarda çok amaçlı problemlerin optimizasyonu için çok amaçlı metasezgisel yöntemler kullanılmaktadır.

3.5 Öğrenme Algoritmaları

Birçok öğrenme algoritması mevcuttur, en sık kullanılanı Delta-kuralı veya Geriyayılım (backpropagation) olarak adlandırılan algoritmadır. Küçük ve orta çaplı problemlerde oldukça iyi sonuç vermesine rağmen aynı etkiyi büyük çaplı problemler üzerine gösterememektedir. Bir diğer dezavantajı da hesaplamalarda saklanması gereken Jacobian matriks verilerinin, hafızada büyük yer tutmasıdır. Tüm bunlara ilaveten hesaplamalardaki zaman ihtiyacının da fazla olması eklenince, üzerinde birkaç modifikasyon yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Levenberg-Marquardt algoritması geriyayılım öğrenme algoritması olarak kullanılan algoritmalardan biridir. Hatayı ikinci derece denklem kullanarak yaklaştırır. Kenneth Levenberg–Donald Marquardt'ın önerdiği hızlı ve istikrarlı yakınsayan bir modeldir. Eğim düşümü (gradient descent) ile Gauss-Newton metotlarının kombine şekilde kullanımı ile oluşturulan Levenberg-Marquardt algoritması öğrenme algoritmaları arasında en etkili olduğu kabul edilen yöntemdir (İmer 2010).

Levenberg-Marquardt metodu, lineer olmayan en küçük kareler sorunlarını çözmek için kullanılan standart bir tekniktir. Veri noktaları ve fonksiyon arasındaki hataların kareler toplamının minimizasyonu ile ölçülen veri noktalarının kullanıldığı parametreli fonksiyon ayarlandığı zaman, en küçük kareler sorunları ortaya çıkar. Doğrusal olmayan en küçük kareler sorunları, fonksiyon parametreleri doğrusal olmadığı zaman ortaya çıkar. Levenberg-Marquardt yöntem parametreleri optimal değere uzak olduğunda daha fazla eğim düşümü yöntemi gibi davranır ve daha fazla parametre optimum değere yakınsa Gauss-Newton yöntemi gibi davranır (Gavin 2013).

Levenberg-Marquardt algoritması eğim düşümü ve Gauss-Newton arasındaki parametre güncellemeleri ile değişir ve

$$\left[J^T W J + \lambda I \right] h_{lm} = J^T W \left(y - \hat{y} \right) \tag{3.21}$$

eşitliği ile tanımlıdır. (3.21) eşitliğinde, eğim düşümü güncellemesinde algoritmik parametre λ büyük değerleri, Gauss-Newton güncellemesinde λ küçük değerleri tanımlıdır. Parametre λ büyük değerlerle başlatılır. Eğer iterasyon daha kötü çözümlere neden olursa, λ artar. Çözümler minimuma yaklaşırsa, λ artar ve Levenberg-Marquardt metodu Gauss-Newton yöntemine yaklaşır, çözüm genellikle hızla yerel minimuma yakınsar.

Marquardt'ın önerdiği güncelleme ilişkisi

$$\left[J^T W J + \lambda diag(J^T W J) \right] h_{lm} = J^T W (y - \hat{y}) \tag{3.22}$$

(3.22) eşitliğini kullanan Levenberg-Marquardt algoritması MATLAB'da *lm.m* uygular.

3.6 Ters Faz Sıvı Kromatografide Temel İfadeler ve Optimizasyon Parametreleri

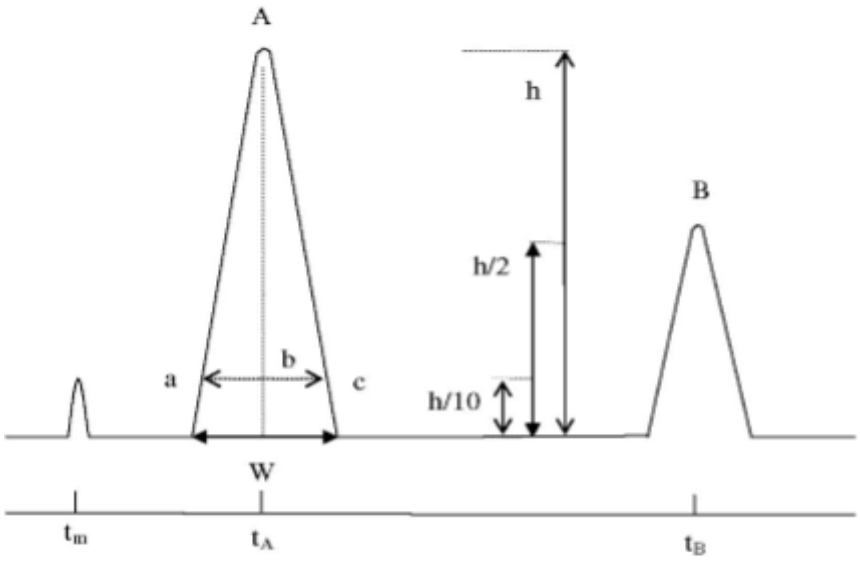
3.6.1 Ters faz sıvı kromatografide temel ifadeler

Kromatografik bir sistemde veriler kromatogramlarla yorumlanmaktadır. Kromatogram; tayini yapılan örneğin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir dedektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafiktir. İki bileşenli bir örneğe ait kromatogram şekil 3.22'de verilmiştir. Bir kromatogramı yorumlamada kullanılan ana parametreler şunlardır;

1.Alıkonma zamanı, t_R
2. Seçicilik , α
3.Kolon etkinliği, N
4. Kapasite faktörü, k'
5. Ayırma Gücü, R

Alıkonma Zamanı, t_R

Örneğin enjekte edilmesinden sonra analit pikinin dedektöre gelmesine kadar geçen süreye alıkonma zamanı denir.



Şekil 3.22 HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogram

Şekil 3.22'de tm; sabit faz ile etkileşmeyen maddelerin veya hareketli fazın alıkonma zamanını, t_A; A maddesinin alıkonma zamanını, t_B; B maddesinin alıkonma zamanını göstermektedir. Alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi de denilmektedir. Ayrılamayan piklerin veya hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim (V_0) olarakta adlandırılır. Bir maddenin alıkonma hacmi ayırımı yapılacak olan maddenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmidir. Alıkonma hacmi; alıkonma zamanı ile hareketli faz akış hızını (F) çarpılması ile hesaplanabilir.

$$V_0 = t_m \text{ x } F \tag{3.23}$$

Seçicilik, α

Seçicilik, esas olarak sabit fazın özelliğine göre değişiklik gösterse de seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden birisi de hareketli fazın bileşimidir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi eşitlik 3.24'de gösterilmiştir. Bu eşitlikte kolonda daha uzun süre tutulan maddeye ait kapasite faktörünün daha kısa süre tutulan maddeye ait kapasite faktörüne oranlanması ile hesaplanabilir. Bu tanıma göre seçicilik daima 1'den büyüktür (Meyer 2004; Adıgüzel 2009).

$$\alpha = \frac{k_B^{'}}{k_A^{'}} \tag{3.24}$$

Kolon etkinliği, N

Kolon verimliliğinin bir ölçüsü olarak, genel olarak birbiri ile bağlantılı iki terim kullanılmaktadır. Bunlar, tabaka yüksekliği, H ve tabaka sayısı N'dir. Bu iki terim arasında eşitlik 3.25'de ki bağıntı vardır,

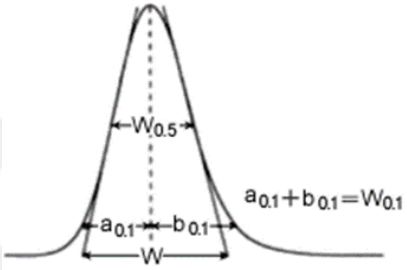
$$N = L/H \tag{3.25}$$

L, kolon dolgu uzunluğudur. Kolon verimliliği kolon tipi, sabit faz tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına göre değişebilmektedir. Kolonun eşdeğer tabaka sayısı (N), kolon etkinliğinin bir ölçüsüdür. Genel olarak N değerinin hesaplanması eşitlik 3.25'de gösterilmiştir. Eşitlik 3.26'da ise teorik plaka sayısının hesaplanması verilmiştir.

Eşitlik 3.26 ve 3.27'de W_A, A maddesine ait zemin çizgisindeki pikin cm cinsinden genişliğidir (Şekil 3.22) (Meyer 2004, Adıgüzel 2009).

$$N = 16\left(\frac{t_A}{W_A}\right)^2 \tag{3.26}$$

$$N_{et} = 16\left(\frac{t_A - t_m}{W_A}\right)^2 \tag{3.27}$$



Şekil 3.23 Pik genişliği

W pik genişliği, Gaussian pikinin teğet çizgisinin temel çizgiyi kestiği yere dayanır ve burada pik yüksekliğinin % 13,4'ü pik genişliğine denk gelir. Bununla birlikte**,** Gaussian olmayan pikler için, farklı eşitlikler önerilmiştir. Çizelge 3.3'de N için uygulamalarda kullanılan hesaplama yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 3.3 N; Kolon Etkinliği Hesaplama Metodları

N Hesaplama Metodu	Eşitlikler	
Tanjant Çizgisi Metodu	$N = 16\left(\frac{tr}{W}\right)^2$	
Yarı Pik Yüksekliği Metodu	$N = 5.54\left(\frac{tr}{W_{0.5}}\right)^2$	$W_{0.5}$:Yarı-pik yüksekliğindeki genişlik
Alan Yükseklik Metodu	$N = 2\pi\left(\frac{tr \cdot H}{A}\right)^2$	A: Alan H: Yükseklik
EMG Metodu (Exponentially Modified Gaussian)	$N = 41.7\frac{\left(\frac{tr}{W_{0.1}}\right)^2}{\frac{b_{0.1}}{a_{0.1}} + 1.25}$	$W_{0.1}$:%10pik yüksekliğindeki genişlik

Alıkonma faktörü, k'

Kolon içerisinde çözünen maddenin ilerleme hızını ifade eden bir faktördür. A çözüneni için alıkonma faktörü,

$$k_A^{'} = \frac{K_A V_S}{V_M} \tag{3.28}$$

Eşitlik (3.28)' de K_A; A maddesi için dağılma katsayısı, V_S; sabit faz hacmi, V_M; hareketli faz hacmidir. Dağılma katsayısını ise, K çözünenin sabit fazdaki molar deişiminin (C_S), hareketli fazdaki molar derişimine (C_M), oranı ile hesaplanır (Eşitlik 3.29).

$$K = \frac{C_S}{C_M} \tag{3.29}$$

Alıkonma faktörü, hareketli fazın sabit akış hızında, eşitlik 3.30'daki gibi alıkonma zamanları kullanılarak da hesaplanabilir. İyi bir ayırım için alıkonma faktörü değerinin 1 ile 10 arasında olması gerekmektedir.

$$k^{'} = \frac{t_A - t_M}{t_M} \tag{3.30}$$

Kapasite faktörü maddenin kimyasal ve fiziksel özelliklerine, uygulanan yönteme göre farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Kromatografik sistemde en önemli parametrelerden biridir.

Ayırma Gücü, R

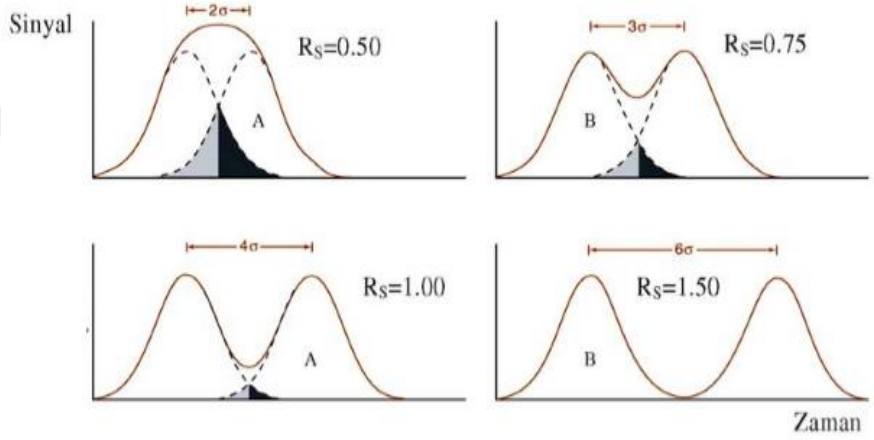
Ayırma gücü kolon etkinliğinin ve çözücü etkinliğinin bir ölçüsüdür. Eşitlik 3.31-32'de ayırma gücünün matematiksel olarak hesaplanması verilmiştir.

$$R_s = \frac{2(t_B - t_A)}{W_A + W_B} \tag{3.31}$$

ve

$$R = \frac{1}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k^{'}}{k^{'} + 1}\right)\sqrt{N} \tag{3.32}$$

Ayırma gücünün hesaplanmasında, alıkonma faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Genel olarak birbirini takip eden iki pik için R değeri 1,5 ve üzeri iken tam ayırım sağlanmaktadır. R=1,325 iken maddelerden biri diğeri içine % 0,3 oranında girmiş durumda, R=1 iken, maddeler birbiri içine % 4 oranında girmiş durumdadır ve R=0,75'de ayırım olmamaktadır. R=1,5 olduğu zaman maddeler %95 olasılıkla birbirlerinden ayrılmış olarak kabul edilebilir (Şekil 3.24) (Meyer 2004, Adıgüzel 2009).

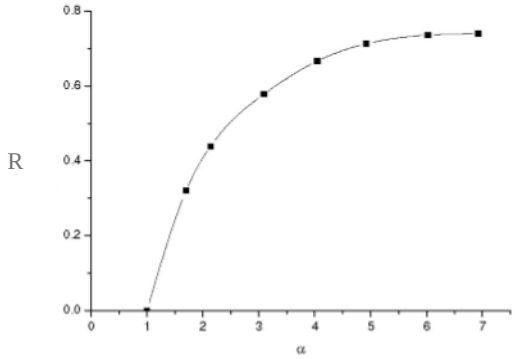


Şekil 3.24 Ayırma gücünün piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi (σ: sabit)

Seçiciliğin Ayırma Gücü Üzerine Etkisi: Genelde seçicilik arttığı zaman ayırma gücünün de artması beklenir. Eşitlik 3.6.10'daki tek değişken α olduğunda bu ifade aşağıdaki gibi ifade edilebilir (Hamilton, 1982).

$$R = C_1\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \tag{3.33}$$

C_1; bir sabittir ve α'ya karşı R grafiğe geçirildiğinde α'nın artmasıyla R değeri belli bir değere kadar artıp daha sonra sabit kalmaktadır (Şekil 3.25). α=1 olduğunda iki bileşik arasında ayırım gerçekleşmemektedir.

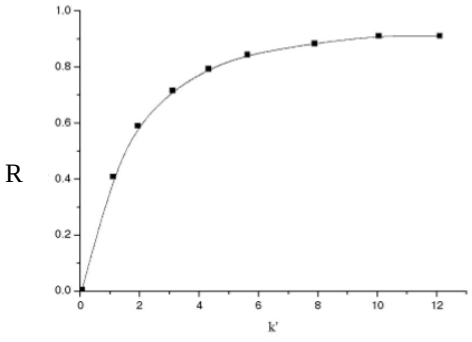


Şekil 3.25 Seçiciliğin ayırma gücü üzerine etkisi

Alıkonma Faktörünün Ayırma Gücü Üzerine Etkisi: Ayırma gücü ile alıkonma faktörü arasındaki ilişki tek değişken k' olduğunda eşitlik 3.34'deki gibi ifade edilir.

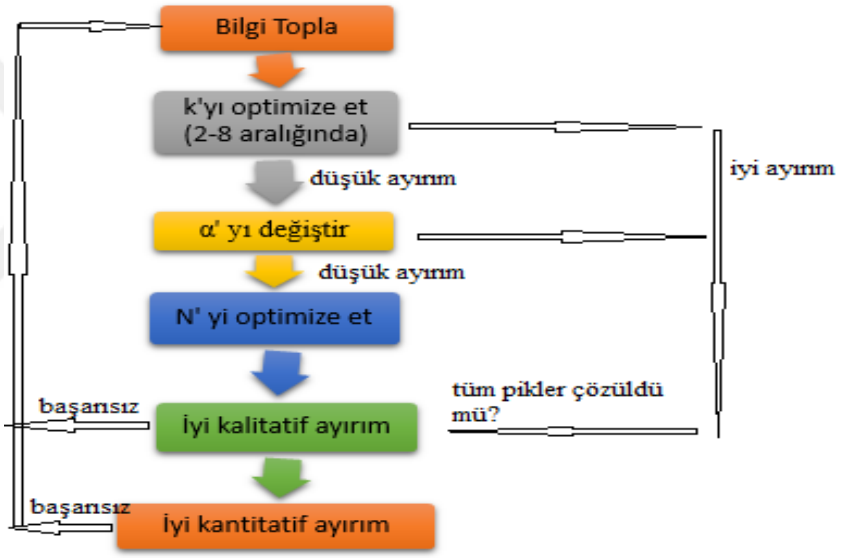
$$R = C_2\left(\frac{k'}{1+k'}\right) \tag{3.34}$$

Burada C_2 sabittir ve k'=0 iken ayırım gerçekleşemez. Büyük k' değerlerinde eşitlik 3.6.12'nin sağ tarafı 1 olur ve ayırma gücünde bir farklılık olmaz. Optimum k' değeri 1 ile 10 arasında olduğunda istenilen ayırma gücüne ulaşılır. k' ye karşı R grafiğe geçirildiğinde k' 10 değerine gelene kadar R değeri artıp daha sonra sabit kalmaktadır (şekil 3.26) (Meyer, 2004).



Şekil 3.26 Alıkonma faktörünün ayırma gücü üzerine etkisi

Kromatografide kuramsal olarak kolonda ayrılan maddelere ait bantların normal dağılım (Gauss dağılımı) göstermesi beklenir. Normal dağılımda sabit fazdaki madde derişimi ile hareketli fazdaki madde derişimi arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Ancak bu her zaman mümkün değildir. Çoğunlukla ideal koşullar gözlenmez ve pikler non-Gaussian ya da Lorentzian dağılım gösterirler. Temel kabuller, R tayininde iki komşu pikin birbirinden ne oranda iyi ayrıldığı ile ilgilidir ve tüm kromatogramın analiz süresi ile ilişkilendirilmez. Klasik olarak k, α ve N tanımları bize HPLC de ayırım için bir strateji sunar ancak bu aşamalar oldukça zaman alıcı, deneme yanılmaya dayalı ve her seferinde bir değişkenin tanımlanarak hedefe ulaşılmasını sağlayan bir metodolojidir. Şekil 3.27 bize HPLC de klasik metod geliştirme aşamalarını sunmaktadır.



Şekil 3.27 HPLC'de metod geliştirmek için klasik strateji (Kromidas 2006)

Son yıllardaki çalışmalar; HPLC'nin temel parametrelerinden R kavramına yeni bir bakış açısı getirmiş ve Kromatografik Cevap Faktörü yaklaşımının doğmasına neden olmuştur. Bu konu ile ilgili çalışmaların literatür örnekleri bölüm 2.8'de verilmiştir.

3.6.2 Ters Faz Sıvı Kromatografisi

1970'lerden günümüze, HPLC tekniği, laboratuarlarda organik maddeler için ayırma, analiz ve saflaştırmanın vazgeçilmez seçeneği olmuştur. Yüksek performans sıvı

kromatografisi (HPLC) günümüzde geniş çaplı moleküler analiz ve saflaştırmalarında öncü teknik olarak tam yer edinmiştir. HPLC'nin büyük başarısını sağlayan, yenilenebilirlik, seçici manipülasyon yapma kolaylığı ve genelde yüksek saflaştırma yetenekleridir. En mükemmel özelliği birbirine çok benzeyen ya da farklı moleküller için bile belirli şartlar altında sağladığı olağanüstü ayırma gücüdür.

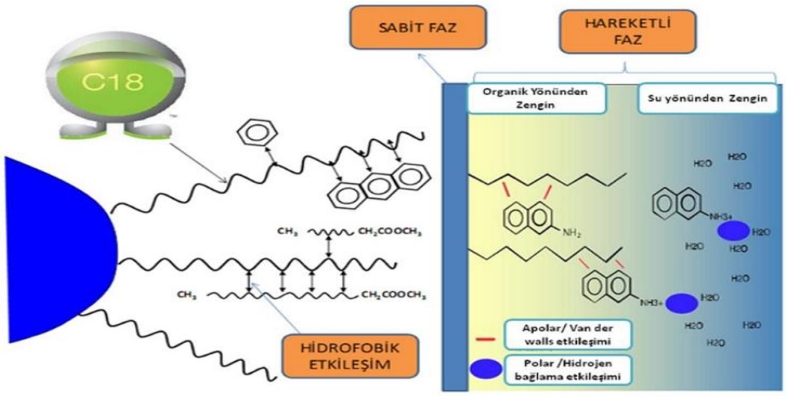
Ters faz kromatografisi literatürde en yaygın kullanılan sıvı kromatografisi metodu haline gelmiştir. Burada sabit faz apolar, hareketli faz polardır. Analitler yüzeye apolar fonksiyon gösteren gruplarıyla bağlanırlar. En polar analit kolondan ilk önce çıkar. Ters faz kromatografisi orta-yüksek polarlığa sahip analitler için en kullanışlı yöntemdir.

Ters faz sıvı kromatografi, apolar maddelerin ayrılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu özellikteki maddeleri ayırmak için sabit faz apolar özellikte, hareketli faz da polar özellikte seçilmektedir. Ters faz ayırma tekniği, örnek ile apolar bağlanma fazı ve polar sabit faz arasında basit ayrıma dayanır. En polar örnek bileşenleri, apolar bileşiklerin apolar sabit fazla etkileşimine dayalı olarak en önce gelmelidir. Ancak en ileri "end-capped" kolonlarda bile altta bulunan anyonik silika işe karışır ve ayırmayı etkiler. Polimer temelli kolonlarla karşılaştırıldığında diğer kolonların ulaşamayacağı ayırımları yapan kolona bu özelliğini silika verir. Silika ters faz kolonu yaşlandıkça daha çok silika bölgesinin hidrolizle serbest kalmasından dolayı, alıkonma karakteristikleri değişir.

Aşağıda ters faz sıvı kromatografi yöntemine ait sabit ve hareketli fazlara örnekler verilmiştir.

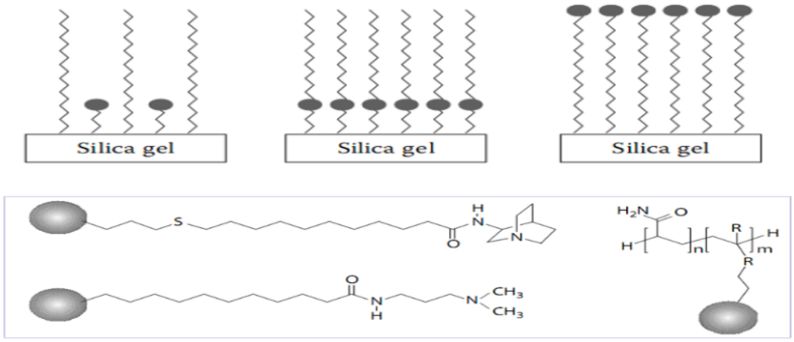
Sabit Faz (apolar): Silika-C18, Silika-C8, Polimer…

Hareketli Faz (polar): MeOH/H_2O, CH_3CN/H_2O, MeOH/Tampon…



Pek çok analizde, istenilen bileşikler bir karışımın parçası olarak bulunurlar ve kromatografik tekniklerin bu noktada ayırma işlemleri için devreye girmesiyle nicel analizler veya tanılama mümkün olmaktadır. Kromatografinin yetersizliği, bileşikler tamamen birbirlerinden ayrılsa bile açık ve anlaşılır şekilde bir tanılama sağlayamamasından kaynaklanmaktadır. Tanılama, optimum deney koşullarında referans malzemelerinin alıkonma karakteristikleriyle yapılır. Fakat bu noktada analist hiçbir zaman aynı alıkonma zamanına sahip iki bileşiğin aynı madde olduğuna tam emin olamaz. Her ne kadar analistin elinde ayarlayabileceği pek çok kromatografik koşul da olsa, karışımın tüm bileşenlerini tamamen ayırmak mümkün olmaz ve bu durum istenilen analitin tam ve doğru nicel analizini engeller. Bu amaçla PDA dedektör sistemlerinde pik saflığı (peak purity) modu geliştirilmiştir.

Sıvı kromatografi tekniğinde polar ve hidrofilik türlerin ayrılmasında sorunlarla karşılaşılmasından dolayı alternatif karma mod sabit fazlar geliştirilmiştir. Bu sabit fazların içine iyonize olabilen yapılar eklenerek polar özellik ve iyon değişimi özelliği kazandırılmaktadır. Bu sayede C-18 ya da C-8 kolonlara da polar türlerin ayrılması da verimlilik arttırılmaktadır.



Şekil 3.28 Ters faz - İyon Değişimi Özelliği Gösteren Karma Mod Kolonların Sabit Fazlarının Yapıları

3.7 Sıvı Kromatografide İzokratik ve Gradient Elüsyonda Alıkonma Modeli Teorisi

Ters faz sıvı kromatografi popüler ve çok yönlü analitik tekniklerden biridir. Bu teknikte, basit izokratik, izotermal ve isorheic (sabit, değişmez) koşullar altında gradient elüsyon uygulamalarında tek modlu ya da çok modlu, zamanla eşanlı deneysel parametrelerin değiştirilmesi ile çalışılabilir. Literatürde bu teknikle ilgili, ters faz ayırma sürecini ilgilendiren makroskopik- termodinamik ve ya moleküler düzeyde ayırmaları içeren pek çok yayın mevcuttur. Ancak ters faz sıvı kromatografi kolonu ile ilişkili, ayırma mekanizmalarının kullanımı ile geliştirilmiş, ayırma karakteristiklerini ve en uygun kromatografik parametreleri bulmak için yapılan çalışmalar oldukça azdır..

Bu amaçla yapılan optimizasyon prosesinin ilk adımı, inceleme altındaki analitlerin alıkonma (elüsyon) zamanının t_R tahminlenmesidir. Genellikle alıkonma (elüsyon) zamanınının t_R belirlenmesi ile alıkonma faktörü k hesaplanır. k; kolon sıcaklığı T, mobil fazın pH'ı, ve çözücülerin hacim oranlarının (φ1, φ2, ...) bilinmesi koşulu ile değerlendirilir. $k=g(T,pH,\varphi 1,\varphi 2, ...)$ bilindiği zaman t_R (3.35) eşitliği ile hesaplanabilir.

$$t_R=t_0\,(1+k) \qquad (3.35)$$

İzokratik elüsyon modunda, (3.36)'daki integral denkleminin çözümü gradient elüsyon modunu verir.

$$\int_0^{tR} \frac{F dt_c}{t_0(1+k)} = 1 \qquad (3.36)$$

Burada t_0 gecikme zamanı, t_R zaman değişkeninin φ1, φ2, ..., *pH vs.*etkilendiği görülmektedir (Snyder ve Dolan 2007; Nikitas ve Pappa-Louisi 2009a,b). Eşitlik (3.36) gradyan elüsyon için Snyder'ın önerdiği ilk geleneksel temel denklem değildir. Denklemin dezavantajı kolay çözülememesidir, bu nedenle her zaman kolay çözülecek ve özyinelemeli sayısal yaklaşımlar ileri sürülmüştür (Nikitas ve Pappa-Louisi 2009a).

Denklem 3.36'nın iki sınır ifadesi ile kullanımı oldukça yararlıdır ve mobil faz bileşimi sabit akış hızı ve kolon sıcaklığında değiştiğinde aşağıdaki denklem uygulanır.

$$\int_0^{t_R - t_0} \frac{dt}{t_0 k} = 1 \qquad (3.37)$$

Bu denklem Snyder ve Dolan (2007), tarafından tekli gradient elüsyonu için ileri sürülen ilk temel denklemdir. Eğer F veya T değişkenleri bu denkleme transfer edilirse,

$$\int_0^{t_R} \frac{dt}{t_0(1+k)} = 1 \qquad (3.38)$$

denklemi elde edilir.

Seçenek olarak k, *k=h(g1, g2, ..., gm)* olarak ifade edilebilir. *g1, g2, ..., gm* burada gradient elüsyon şartlarını temsil eden değişkenlerdir, yani doğrusal gradientin gradient adımları veya mobil fazın başlangıç yada bitiş kompozisyonu gibi. Bu durumda t_R

$$k = g(T, pH, \varphi 1, \varphi 2, ...) \qquad (3.39.a)$$

veya

$$k = h(g1,g2,...,gm) \quad (3.39.b)$$

(3.39.b) denklemi optimizasyon çalışmaları için en temel denklemdir. Alıkonma modeli olarak adlandırılan bu denklem, alıkonma mekanizmasını açıklamak için matematiksel yada direkt olarak kullanılır.

3.7.1 Alıkonma mekanizması için temel modeller

Ters faz sıvı kromatografide alıkonma ifadesini tam olarak tarif etmek oldukça zordur ve çok fazla etkileşim içeren, karmaşık bir süreçtir. Bu etkileşimlerin en önemlileri sabit ve hareketli fazın her ikisi içinde analit-analit etkileşimleri, hareketli faz içinde çözücü-çözücü ve analit-çözücü etkileşimleri (belki durgun fazda da olabilecek etkileşimler) ve analit ve çözücü molekülleri ile durgun fazdaki alkil zincirlerinin kendi aralarındaki etkileşimleridir. Geleneksel ters faz kromatografide silika bazlı kolonların yaklaşık % 30-50 sinin kaplama ve end-capped durumlarına göre, çözücü ve analitlerin silanol grupları ile etkileşimde olduğunu eklemek gerekir. Bu grupların zayıf asidik olduğu ve alıkonma mekanizmasını etkilediği düşünülmektedir.

Solvofobik teori; kromatografik alıkonmayı tanımlamak için klasik termodinamiğe dayalı ilk girişimlerden biridir. Bu teori, termodinamik döngü için kromatografik alıkonma prosesinin iki prosese ayrışmasını kabul eder ve alıkonma serbest enerjisini hesaplar. Özellikle alıkonma prosesi için standart serbest enerji değişimi, çözünme için standart serbest enerji değişim miktarı ve alkil zinciri ile analitin birleşimi için standart serbest enerji değişimi ifade edilir. Her bir tür için çözme işlemi üç adımdan oluşur: analit moleküllerini yerleştirmek için mobil fazda bir boşluk oluşturmak, serbest hacim azalması ve çözücü molekülleri ile sarılmış boşlukta yerleşen analit moleküllerinin bu moleküllerle etkileşimi. Ancak alıkonma prosesinin serbest enerji değişiminde ki bu katkılar, *lnk* için oldukça karmaşık ifadeler verir (Nikitas ve Pappa-Louisi 2009b)

Solvofobik teori Dill tarafından (Dill, 1987) şiddetli bir şekilde eleştirilmiş ve bunun yerine *partitisyon (ayırma) modeli* geliştirilmiştir. Bu model durgun faz boyunca mobil

fazdan analit moleküllerinin ayırımını dikkate alan bir alıkonma modelidir. Bu teori özellikle analit molekülünün sabit fazın alkil zincirleri içinde tamamen tutulduğunu varsayar ve üç ana adım içerir: durağan faz içindeki bir boşluğun oluşturulması, mobil fazdaki analitin bu boş kaviteye transferi, mobil faz içindeki boşluğun kapatılması. Bu durumda ayırma prosesi, hareketli ve sabit fazların analit molekülleri ile moleküler etkileşimindeki farklılıklar ile kontrol edilir.

Alternatif bir yaklaşımda, alıkonma prosesini açıklamak için *adsorpsiyon modeli* önerilmiştir. Buna göre analit molekülleri, durağan fazın hidrokarbon zincirlerinin uçlarında oluşturulan yüzey çözeltisinde adsorplanır. Yüzey çözeltisi mobil faz ile aynı bileşenleri içerir ancak farklı konsantrasyonlardadır. Çalışmaların çoğunda, adsorpsiyon modeli tercih edilen prosestir; çözücü moleküllerinin yerine, analit molekülleri ve organik değiştirici moleküllerin beraber adsorplanacağını varsayar (Nikitas ve Pappa-Louisi 2009b).

Adsorpsiyon ve partitisyon modellerinin kombinasyonu Jaroniec ve Martire (1986) tarafından önerilmiştir. Burada alıkonma modeli bir yer değiştirme mekanizması aracılığıyla, adsorbe katmanı oluşum süreci üzerinden modellenmiştir ve ayırma mekanizmaları üzerinden durgun faz ile adsorbe katmanı arasında analitin dağılımını modeller.

Adsorpsiyon, partitisyon ve bunların kombinasyonları, ters faz sıvı kromatografide yoğun bir şekilde kullanılır ve bu modeller, istatistik veya klasik termodinamik varyasyonları ile bunların düzenli kombinasyonlarını kullanır (Nikitas ve Pappa-Louisi 2009b).

Ters faz sıvı kromatografi uygulamalarında mevcut yazılımlar; mobil faz kompozisyonu, akış oranı ve kolon sıcaklığını programlayabileceğimiz faydalı program modları içerirler. Bu modlar sayesinde mobil faz kompozisyonundaki değişiklikler gradient elüsyonun karakteristiklerini programlar.

Gradient program aşağıdaki şekilleri kapsayabilir:

a) doğrusal gradient

b) kavisli profil ile doğrusal olmayan gradient

c) adım adım gradient

d) bölümlü gradient-genellikle farklı eğim bölümleri ve izokratik peryotlarla doğrusallık içerir (elüsyonun başlangıcında ve sonunda kullanılır).

Genel durum gözönüne alındığında çoklu-mod gradient profili kromatografik sistemin mikserinde oluşturulur. Burada x1, x2,… koordinatları; φ1, φ2, ..., hacim fraksiyonları (mobil fazın bileşenleri, bu fazdaki pH) F akış oranı; T kolon sıcaklığı olarak alınır ve mikserdeki bu değişkenlerin değerlerindeki herhangi bir farklılanma, kromatografik kolonda hıza dayalı, ayırma değişkenlerini biçimlendirir. Tek modlu gradient için φ en sık kullanılan doğrusal alıkonma modeli (3.40)'da verilmiştir;

$$\ln k(\varphi) = c_0 + c_1\varphi \tag{3.40}$$

Bu model, φ' nın çok dar aralığında geçerli olmakla birlikte, geniş aralığı için kuadratik model önerilir (3.41)

$$\ln k(\varphi) = c_0 + c_1\varphi + c_2\varphi^2 \tag{3.41}$$

rasyonel fonksiyon modeli ise; denklem (3.42)'de verilmiştir.

$$\ln k(\varphi) = c_0 - \frac{c_1\varphi}{1 + c_2\varphi} \tag{3.42}$$

Her iki modelde, benzer uygulanabilirlik gösterir. Kuadratik denklem (3.41) basit bir forma ve bilinen özelliklere sahiptir. Hesaplamalardaki kullanımı da kolaydır. En büyük sınırlaması kolaylıkla over-fitting (veri setinin gerçek uzaydan çok küçük olduğu durum) sorunları yaratmasıdır. Rasyonel fonksiyon modeli (3.42); over-fitting sorunları

göstermeksizin çok iyi uygunluk performansı sergiler, ancak yakınsama problemleri ortaya çıkarabilir (Nikitas ve Pappa-Louisi 2009a).

T(sıcaklık) gradient profilinde kullanıldığında denklem;

$$\ln k(T) = c_0 + \frac{c_1}{T} + c_2 g(T) \tag{3.43}$$

bu fonksiyon *g(T)* ile düzenlenirse;

$$g(T) = \begin{cases} 0 & \Delta H^0 = \Delta H_0 \\ \ln T & \Delta H^0 = \Delta H_0 + \Delta H_1 T \\ T & n\Delta H^0 = \Delta H_0 + \Delta H_1 T^2 \\ 1/T^2 & \Delta H^0 = \Delta H_0 + \Delta H_1 / T \end{cases} \tag{3.44}$$

burada, ΔH^0 alıkonma prosesinin standart entalpisi, ΔH_0 ve ΔH_1, ΔH^0katsayısının sabitleridir.

Mobil fazın pH'ı iyonlaşabilen analitlerin alıkonmasını etkiler. Monoprotik asit ve bazlarda benzer ifadelerle, tek modlu gradientde pH için tanımlanabilir.

$$k = \frac{k_0 + k_1 10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \tag{3.45}$$

(3.45) denklemi, (3.42) ile kombine edildiğinde, alıkonma modeli pH ve φ etkilerini de içerir.

$$k = \frac{k_0^0 e^{-c_0\varphi/(1+c_2\varphi)} + k_1^0 e^{-c_1\varphi/(1+c_2\varphi)} 10^{pH-pK^0-r_1\varphi-r_2\varphi^2}}{1+10^{pH-pK^0-r_1\varphi-r_2\varphi^2}} \tag{3.46}$$

k_0^0 ,pK^0, c_0, c_1, c_2, r_1 ve r_2 ayarlanabilir değişkenlerdir. Eğer bu denklem aktivite k_1^o katsayılarını içersede aynı ifadeler elde edilir. İkili sistemlerde alıkonma için (3.47) denklemi kullanılabilir.

$$\ln k(\varphi_B, \varphi_C) = c_0 + c_1\varphi_B + c_2\varphi_C + c_3\varphi_B^2 + c_4\varphi_C^2 + c_5\varphi_B\varphi_C \tag{3.47}$$

φ_B φ_C burada iki bileşenli mobil fazın hacim kesirleridir. Sonuç olarak alıkonma sıcaklık ve mobil faz kompozisyonunun değişken durumlarında;

$$\ln k(\varphi, T) = c_0 + c_1\varphi + c_2\varphi^2 + (c_3 + c_4\varphi + c_5\varphi^2)/T + c_6 + c_7\varphi + c_8\varphi^2)g(T) \tag{3.48}$$

halini alır. Genellikle lnk'nın çok değişkenli ifadesi için kullanılabilir basit bir ilişki aşağıda verilmiştir.

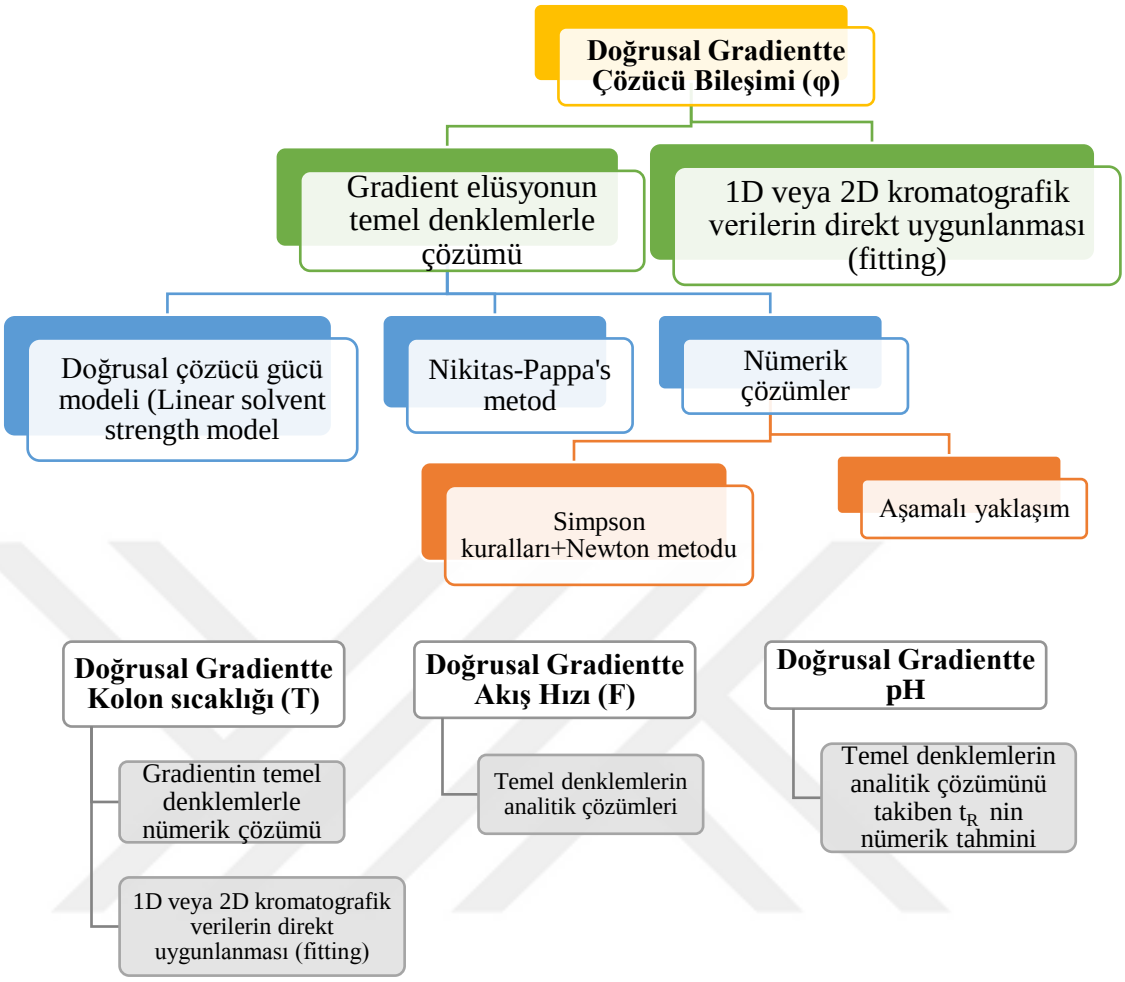
$$\ln k(\varphi_1, \varphi_2, ..., T) = \ln k(\varphi_1).\ln k(\varphi_2)...\ln k(T) \tag{3.49}$$

(Nikitas ve Pappa-Louisi 2009a).

3.7.2 Tek-Mod Gradient Elusyonda Tahmin (Prediction)

Tek modlu gradient elusyonunda sadece bir ayırma değişkeni belirlenir; örneğin mobil faz bileşimi **φ**,kolon sıcaklığı **T**, akış hızı **F** veya zamanla **pH** değişimi. Şekil 3.29'da şematik olarak, tek modlu doğrusal gradient elüsyon altında çözünen bir örneğin, alıkonma zamanını tahmin etmek için kullanılan çeşitli yaklaşımlar verilmiştir. Özellikle aşağıdaki yaklaşım önemlidir (denklem 3.50). Doğrusal gradient elüsyonda, mobil faz bileşimi **φ** zaman **t** ile doğrusal olarak değişir ise ifade de aşağıdaki (denklem 3.50) kabuller yapılır.

$$\varphi = \begin{cases} \varphi_{in} & t \le t_{in} \\ \varphi_{in} + b(t - t_{in})/t_0 & t_{in} \langle t \langle t_{fin} \\ \varphi_{fin} & t \ge t_{fin} \end{cases} \tag{3.50}$$



Şekil 3.29 Tek modlu doğrusal gradient elüsyon altında çözünür numunenin, alıkonma zamanının çeşitli yaklaşımlar kullanılarak tahminlenmesi

Çoklu doğrusal gradient, sıklıkla elüsyonun başında veya sonundaki izokratik bölümleri ve farklı eğimle doğrusal segmentleri kapsar. Tahmine; temel denklem (3.37) çözülerek yada alıkonma verilerini direkt uygunlayarak (fitting) ulaşılabilir (Nikitas ve Pappa-Louisi 2009a).

3.7.3 1D veya 2D Kromatografik Verilerin Direkt Uygunlanması

1D veya 2D verileri; t_R'nin **b (eğim)** veya **b** ve φ_{in}' ye üzerinden bağımlı özelliklerinden yararlanılarak seçilen uygun alıkonma modelleri ile uygunlanır. Bu amaçla aşağıdaki denklem 1D kromatografik veriler için kullanılabilir.

$$y = c_0 + c_1 b + c_2 b^2 \tag{3.51}$$

2D kromatografik veriler için;

$$y = c_0 + c_1 b + c_2 b^2 + c_3 \varphi_{in} + c_4 (\varphi_{in})^2 + c_5 b \varphi_{in} \tag{3.52}$$

burada $y=t_R$ veya lnk'dır.

Bu denklemlerden yararlanılarak, denenecek gradientin, **b** ve **φin**, e karşı düz dik bölgesinde uygunlanma prosedürü kullanılarak, tekli doğrusal gradient altında çözünmüş numune alıkonma zamanının tahmini yapılır.

3.7.4 Gradiet Elüsyonun Temel Alıkonma Modeli Denklemleri ile Çözümü

Gradient profilin başlangıç izokratik bölgesi için denklem (3.37) düzenlenerek yazılır.

$$\int_0^{t_R - t_D - t_0 - t_{in}} \frac{dt}{t_0 k} = 1 - \frac{t_D + t_m}{t_0 k(\varphi_{in})} \tag{3.53}$$

burada **tD** bekleme zamanıdır, yani mobil faz gradient mikserinde bir değişiklik yapıldığında kolon girişine ulaşmak için gerekli süredir. t zaman değişkeninin sıfır noktası, **tin** noktasıdır (Nikitas ve Pappa-Louisi 2005). Denklem (3.50) de örneğin **φ** için t profili düzenlenirse;

$$\varphi = \begin{cases} \varphi_{in} + bt / t_0 & t \langle t_{fin} - t_{in} \\ \varphi_{fin} & t \rangle t_{fin} - t_{in} \end{cases} \tag{3.54}$$

elde edilir. Kolaylık olması açısından ; **Is** miktarı göstermek üzere,

$$I_S = \frac{t_D + t_{in}}{t_0 k(\varphi_{in})} = \frac{t_D + t_{in}}{t_0 k_{in}} \tag{3.55}$$

Eğer $I_S > 1$; analit, denklem 3.50'nin gradient profilin ilk izokratik bölümü boyunca elüe edilir. Bu nedenle;

$$t_R = t_0(1+k_{in}) \tag{3.56}$$

I_g integral alınarak ifade edilirse;

$$I_g = \int_0^{t_{fin}-t_{in}} \frac{dt}{t_0 k} \tag{3.57}$$

Bu integral ya analitik olarak ya da eğer mümkünse, örneğin Simpson kuralı ile nümerik çözüm kullanılarak hesaplanabilir. Eğer $I_g < 1-I_S$, ise analit t_{fin} zamanında önce ve denklem (3.53) ile, son izokratik basamak boyunca elüe edilir. Alıkonma zamanı, kolaylıkla denklem (3.58) ile hesaplanır.

$$t_R = t_0 + t_D + t_{fin} + t_0 k_{fin}(1 - I_S - I_g) \tag{3.58}$$

Denklem 3.50 'de **φ** veya ***t*** profilinin izokratik bölümleri boyunca çözünen numune elüsyonu ifadesi bize t_R nin kolaylıkla tahmin edilebilir olduğunu göstermektedir. Eğer elüsyonu yapılan numune **φ'**nın değişikleri boyunca tahminlenirse, *Doğrusal Çözücü Güç Modeli (Linear Solvent Strength Model)* yaklaşımdan yararlanılır.

3.7.5 Doğrusal Çözücü Gücü Modeli (Linear Solvent Strength Model)

Eğer lnk, denklem 3.40 doğrusal ifadesi ile verilirse, eşitlik 3.53, analitik çözüme sahiptir. Denklem 3.40'ın doğrusal gradient ile kombinasyonu *Doğrusal Çözücü Gücü Modeli (Linear Solvent Strength Model)* olarak adlandırılır. Denklem 3.40'ın içinde (3.54) yaklaşımı tanımlanırsa, $t < t_{fin} - t_{in}$ olduğunda

$$\ln k = A + Bt \tag{3.59}$$

olur.

Burada

$$A = c_0 + c_1\varphi_{in}$$

ve

$$B = c_1 b / t_0 \quad \text{dir.}$$

Denklem 3.53 ve 3.59 bir arada değerlendirildiğinde t_R aşağıdaki yaklaşım yardımı ile tahmin edilebilir.

$$t_R = t_0 + t_D + t_{in} - \frac{1}{B}\ln\left\{1 - t_0 B e^{A}(1 - I_S)\right\} \tag{3.60}$$

Bu nedenle çözünen örneğin alıkonma zamanı; $I_S > 1$ ise denklem (3.56), $Ig < 1 - I_S$ ise denklem (3.58), diğer tüm durumlar için denklem (3.60) ile tahminlenir. Bu aşamadan sonra, çoklu doğrusal gradient aşaması için genişletme basittir (Snyder ve Dolan 2007).

Doğrusal çözücü gücü modeli oldukça basit bir yaklaşımdır ve t_R için oldukça açık bir ifade sunar. Ancak temeli, oldukça dar bir yaklaşım olan denklem (3.40)'a dayanır. Bu model genellikle sulu-MeOH mobil fazı ve **φ'**nın dar sınırları içinde geçerlidir. Deneysel sisteme bağlı olarak, denklem 3.60, deneysel olanlardan farklı alıkonma zamanları verebilir. Bunun yanında t_R için analitik ifadeyi, doğrusal alıkonma modelinde denklem 3.40'ı kullanmadan elde edebiliriz, 3.53 denklemi tek başına bu amaçla kullanılarak Nikitas–Pappa yaklaşımı olarak adlandırılmıştır (Nikitas ve Pappa-Louisi 2005).

Literatürde şu ana kadar önerilmiş kromatografik alıkonma modelleri çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Literatürde mevcut alıkonma modeli örnekleri (Fasoula vd. 2015)

No	Model
1	$\ln k(\phi) = c_0 - c_1\phi$
2	$\ln k(\phi) = c_0 - c_1\phi + c_2\phi^2$
3	$\ln k(\phi) = c_0 - c_1 \ln\phi$
4	$\ln k(\phi) = c_0 - c_1 \ln(1 + c_2\phi)$
5	$\ln\ k(\phi) = c_0 + 2\ \ln(1 + c_1\phi) - \frac{c_2\phi}{1+c_1\phi}$
6	$\ln\ k(\phi) = c_0 - \frac{c_2\phi}{1+c_1\phi}$
7	$\ln\ k(\phi_1, \phi_1) = c_0 + c_1\phi_1 + c_2\phi_2 + c_3\phi_1^2 + c_4\phi_2^2 + c_5\phi_1\phi_2$
8	$k(\mathrm{pH}) = \frac{k_0 + k_1 10^{i(\mathrm{pH}-\mathrm{p}K)}}{1+10^{i(\mathrm{pH}-\mathrm{p}K)}}$
9	$k(\phi, \mathrm{pH}) = e^{c_0 - c_1\phi}\frac{1+r10^{i(\mathrm{pH}-\mathrm{p}K)}}{1+10^{i(\mathrm{pH}-\mathrm{p}K)}}$
10	$k(\phi, \mathrm{pH}) = \frac{e^{c_{00}-c_{01}\phi} + e^{c_{10}-c_{11}\phi}10^{i(\mathrm{pH}-\mathrm{p}K)}}{1+10^{i(\mathrm{pH}-\mathrm{p}K)}}$

Gradient elüsyon zamanının belirlenmesinin doğruluğu çeşitli faktörler tarafından belirlenir.

Bunlar:

- Kolonun başlangıcına ulaşmak için karıştırıcıda belirli bir değişim için geçen süre olan dwell zamanının (dwell time) doğru belirlenmesi,
- çözünen örneğin izokratik davranışlarının doğru tespit edilerek temsil edilmesi,
- gradient profilinin olası bozulma durumlarının tespiti
- gradient prosesi boyunca kolonun dengelenmesi.

Bütün bu etkiler, çözünenin gradient alıkonma zamanının doğru tahmini için kontrol edilmelidir ve programlanmış optimizasyon tekniği, etkili bir şekilde uygulanmalıdır.

Uygulamalar göstermiştir ki; MeOH ve MeCN gibi modifiyerler ile modifiye edilmiş sulu mobil fazlarda, deneysel ve hesaplanmış alıkonma zamanları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, 2-propanol için çarpıcı görüş ayrılıkları bulunmaktadır.

Çalışmalar, yukarıda belirtilen ilk üç faktörün kolaylıkla kontrol edilebilmesine karşılık, son faktör olan kolon dengelenmesi sorununun, deneysel ve hesaplanmış değerler arasında ki farka neden olabileceğini göstermiştir. Literatürde birkaç farklı olgu gradient elüsyondaki dengeli olmayan kararsız etkilere dayandırılmaktadır. Örneğin;

a) Mobil fazın başlangıcında tamamlanmamış kolon dengelenmesi (Eğer mobil faz sadece saf sudan oluşuyorsa bu etki çok daha fazla artmaktadır).

b) Gradient boyunca çözücünün karıştırılması

c) Mobil faz kompozisyonundaki değişikliklerin bir sonucu olarak sabit fazın alkil zincirlerinin konformasyonunda yavaş değişiklikler;

d) Mobil faz kompozisyonundaki değişiklikler nedeni ile çözünen moleküllerin konformasyonunda değişiklikler verilebilir (Pappa-Louisi vd. 2006).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyal

*Olea Europaea L.*cv bitki örneklemesi; 2013 yılı Kasım ayında, Balıkesir-Ayvalık bölgesi $39^0$16'40.55K ve $26^0$42'47.77D lokasyonunda, 270 m yükseklikten bölgeye özgü Ayvalık türüne ait yaprakların toplanması ile yapılmıştır. Zeytin yaprakları yıkanıp temizlenerek, hava akımsız bir ortamda, gölgede 15 günde, kurutma kağıtları üzerinde yığın oluşturmayacak şekilde kurutulmuştur. Ayrıca preslenerek kurutulan dal, meyve, çiçek ve yaprak içeren zeytin bitkisi dal örneği, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik Enstritüsü Herbaryumuna (Herbarium Turcicum, Voucher No: 60542) konulmuştur. Kurutulup, öğütülen yapraklar, ekstraksiyon ve analiz işlemleri için cam kavanozlarda, ışıktan etkilenmeyecek şekilde dolaplarda saklanarak kullanılmıştır.

4.2 Kullanılan Cihaz, Yazılım ve Kimyasallar

Cihaz

Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı	: Heidolph MR
UV-Vis Spektrofotometresi	:Shimadzu 1700 Pharma Spec UV-Vis Spektrofotometre
HPLC Cihazı	:Shimadzu HPLCSPD-M10AVP PDA (Photo diode array) dedektör, SIL-10AXL Otomatik örnekleyici, CTO-10A Kolon fırını, LC20AT Pompa, DGU-20A Gradient valf, CBM-20A Prominence Kontrol ünitesi
Hasas Terazi	:Shimadzu AUX 220
Ultrasonik Banyo	:Everest Cleanex 911
Ultrasonik prob	:Hielscher Ultrasound Technology UP 100H Ultrasonic Processor
Sirkülatörlü soğutma banyosu	:PolyScience 912 model Sirkülatörlü, Soğutmalı Su Banyosu, Chiller

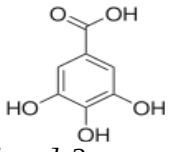
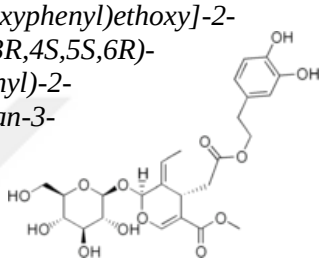
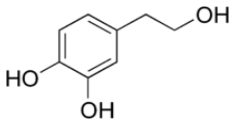
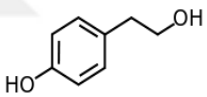
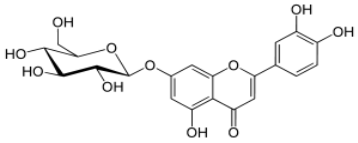
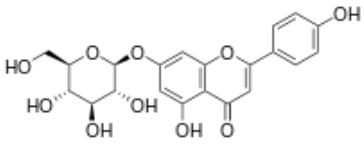
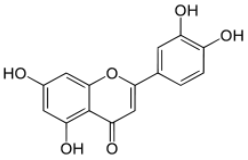
Yazılımlar

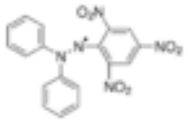
Stat-Ease Design-Expert 7.0.0 : Deneysel tasarım ve optimizasyon

Shimadzu LC Solution–Lab Solution : Kromatografik analiz ve Kromatografik veriler

MATLAB R2015b (Academic) : Algoritmalar, Modelleme,Optimizasyon ve Simülasyon

Kimyasallar

Gallik asit	*3,4,5-Trihydroxybenzoicacid* Sigma(»%99HPLCsaflıkta) M.A: 170,12g/mol CAS 5995-86-8 
Oleuropein	*(4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-2-oxoethyl]-5-ethylidene-6-[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-tetrahydropyranyl]oxy]-4H-pyran-3-carboxylicacid,methyl ester* Fluka(»%98,6HPLCsaflıkta) M.A: 540,5g/mol CAS 32819-42-4 
Hidroksitirozol	*3,4-dihydroxyphenolethanol(3,4-DHPEA)* Sigma(»%98HPLC saflıkta) M.A: 154,16g/mol CAS:10597-60-1 
Tirozol	*2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol* Fluka(»%99,5HPLCsaflıkta) M.A: 138,16g/mol CAS :501-94-0 
Luteolin-7-glikozit	*2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one* Fluka(»%98HPLCsaflıkta) M.A: 448,38g/mol CAS :5373-11-5 
Apigenin-7-glikozit	*5-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one* Fluka(»%97HPLCsaflıkta) M.A: 432,38g/mol CAS :578-74-5 
Luteolin	*2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-chromenone*; Fluka(»%97HPLC saflıkta, M.A:286,24g/mol) CAS 491-70-3 
MeOH	Metanol (CH_3OH) Sigma(»%99,9HPLC saflıkta, M.A:32,04g/mol) CAS 67-56-1

EtOH	Etanol (CH_3CH_2OH) Sigma(»%99,8 HPLC saflıkta, M.A:46,07g/mol) CAS 64-17-5
MeCN	Asetonitril (CH_3CN) Sigma Chromasolv®(»%99,5HPLC saflıkta, M.A:41,05g/mol) CAS 75-05-8
Saf su	Ultra saf su 18,3 Mohm kalitede (Human Power II cihazı)
Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR)	*Molibdofosfotungstik heteropoliasit* (2N Lowry metod) Sigma, F9252
DPPH	*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH* Aldrich, M.A:394,32g/mol) CAS 1898-66-4 
Sodyum Karbonat	Na_2CO_3 (Analitik saflıkta) Sigma-Aldrich, M.A:105,99g/mol) CAS 497-19-8
Asetik Asit (AcOH)	CH_3COOH; Merck(»%96saflıkta M.A:394,32g/mol CAS 64-19-7

4.3 *Olea Europaea* L. Yapraklarından Polifenollerin Ekstraksiyonu için Kullanılan Yöntemler ve Koşulları

4.3.1 MeOH/H_2O ekstraksiyonu

Öğütülmüş zeytin yaprağı örnekleri, 1,00g olacak şekilde tartılmıştır. Tartım için Shimadzu AUX 220 model (0,0000g hassasiyetli) cihaz kullanılmıştır. Ekstraksiyon çalışmasında deneysel tasarım yapılmış ve 30 çalışma noktası tespit edilmiştir. Deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmaları için *Stat-Ease Design-Expert 7.0.0* yazılım programı kullanılmıştır. MeOH ekstraksiyonu için; farklı oranlarda *MeOH/H_2O çözücü karışımları, sıcaklık, süre* ve *çözücü/katı oranı* bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Her bir değişken için ölçüm aralığı, literatür bilgisine ve ön çalışmalara dayalıdır. Çalışma aralıkları; *MeOH/H_2O çözücü karışımı* %5-85 (v/v) , *sıcaklık* 15-75 C^o, *süre* 0-100 dk. ve çözücü/katı oranı için 0,5-18,5 (mL/g) ‘dır. Toplam polifenol (GAE ve OLE eşdeğeri) ve oleuropein miktarı (HPLC Farmakope 5.0 analizi ile) cevabı bağımlı değişken olarak kullanılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi için 10 ve 20mL’lik koyu renkli (amber) cam şişeler kullanılmıştır. Dibi düz ve ultrasonik etkinin bütün yüzeye eşit dağılımını sağlamak amaçlı taban et kalınlığı incedir. Ağız kısımları termometre girişine izin verecek şekilde, mantar tıpalarla

kapatılmıştır. Isıtma ve karıştırma işlemleri Heidolph MR model, çoklu manyetik karıştırıcılı ısıtıcılarda yapılmıştır. Sistemde kütle aktarımını artırmak amacı ile karıştırma yapılmış ve karıştırma hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir.

Ekstraksiyon öncesinde zeytin yapraklarına kurutma ve öğütme dışında herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Farklı oranlarda MeOH/H_2O karışımı ile yaprağın muamelesi sırasında, çözücü karışımının bir kısmı öğütülmüş yaprak örneğinin ıslanması sırasında kaybedilmektedir. Bu nedenle kaba süzgeç kağıtlarından süzülen yaprak ekstrelerinin hacimleri ölçülmüş, çalışma noktalarındaki MeOH/H_2O karışım oranları dikkate alınarak, bu MeOH/H_2O çözücü karışımları ile 25mL'ye tamamlanmıştır.

4.3.2 EtOH/H_2O ekstraksiyonu

EtOH/H_2O ekstraksiyonu için aynı MeOH/H_2O ekstraksiyonunda olduğu gibi, öğütülmüş zeytin yaprağı örnekleri, 1,00 g olacak şekilde tartılmıştır. Ekstraksiyon çalışmasında deneysel tasarım yapılmış ve 30 çalışma noktası tespit edilmiştir. Deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmaları için *Stat-Ease Design-Expert 7.0.0* yazılım programı kullanılmıştır. EtOH ekstraksiyonu için; farklı oranlarda *EtOH/H_2O çözücü karışımları, sıcaklık, süre* ve *çözücü/katı oranı* bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Her bir değişken için ölçüm aralığı, literatür bilgisine ve ön çalışmalara dayalıdır. Çalışma aralıkları; *EtOH/H_2O çözücü karışımı* %5-85 (v/v) , *sıcaklık* 15-75 ^oC, *süre* 0-100 dk ve çözücü/katı oranı için 0,5-42,5 (mL/g)'dır. Toplam polifenol (GAE ve OLE eşdeğeri) ve oleuropein miktarı (HPLC Farmakope 5.0 analizi ile) cevabı bağımlı değişken olarak kullanılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi için 10, 20, 40 ve 50 mL'lik koyu renkli (amber) cam şişeler kullanılmıştır. Dibi düz ve taban et kalınlığı incedir. Ağız kısımları termometre girişine izin verecek şekilde, mantar tıpalarla kapatılmıştır. Isıtma karıştırma (Heidolph MR) yapılmış ve karıştırma hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir

Ekstraksiyon öncesinde zeytin yapraklarına kurutma ve öğütme dışında herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Farklı oranlarda EtOH/H_2O çözücü karışımı ile yaprağın ekstraksiyonu sonrası, Whatman No:1 süzgeç kağıtlarından süzülen yaprak ekstrelerinin hacimleri ölçülmüş, çalışma noktalarındaki EtOH/H_2O karışım oranları dikkate alınarak, bu EtOH/H_2O oranındaki çözücü karışımı ile 50mL' ye tamamlanmıştır.

4.3.3 MeOH-H_2O, EtOH-H_2O çözücü karışımlarında ultrasonik banyo ile ekstraksiyon

MeOH/H_2O ve EtOH/H_2O çözücü karışımları ile yapılan klasik çözücü ekstraksiyonuna ait deneysel tasarım noktalarının, optimum bölge ve tasarımın zorlanmış bölgeye ait çalışma noktalarında, ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi incelenmiştir. Ses ötesi dalga uygulaması; Everest Cleanex 911 model Ultrasonik banyoda (9 litre hacim, 220V, 50Hz sabit frekans, Ultrasonik güç (peak/off): 500/250 Watt, Isıtıcı gücü 450 Watt) yapılmıştır. Sıcaklık digital olarak ölçülmüştür. MeOH/H_2O ve EtOH/H_2O ekstraksiyonlarında kullanılan tüm işlem basamakları geçerlidir, ultrasonik banyoda 100 rpm'lik karıştırma işlemi uygulanmamıştır.



Şekil 4.1 Çözücü ekstraksiyonunda ses ötesi dalga uygulaması için kullanılan ultrasonik banyo

4.3.4 MeOH-H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile ekstraksiyon

Ultrasonik prob ile ses ötesi dalga etkisinin incelendiği ekstraksiyon çalışması için ilk olarak MeOH-H_2O çözücü karışımı kullanılmıştır.

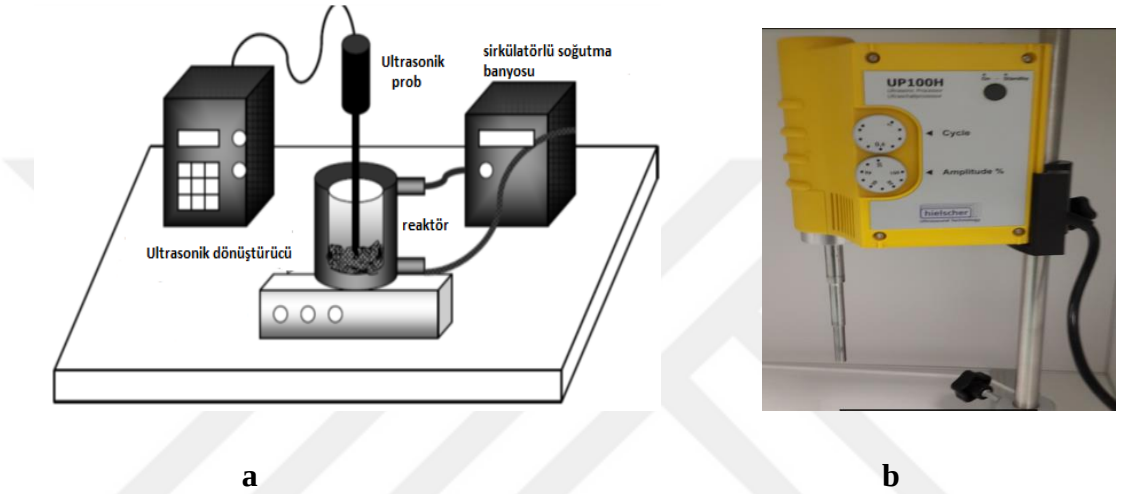
Zeytin yaprağından ultrasonik prob ile polifenollerin ekstraksiyonu için, MeOH-H_2O çözücü ekstraksiyonuna ait çalışma aralığı, optimum koşulları ile ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisinin sonuçları değerlendirilmiştir. Ultrasonik banyo etkisinin sonuçları dikkate alınarak, sıcaklık ve sürenin yüksek değerlerinde, ultrasonik probla ses ötesi dalga uygulamasında negatif etki yapacağı göz önüne alınmıştır. Probun düşük sıcaklıklarda etkin olması nedeni ile sıcaklık 30^oC'de sabit tutularak, değişken olarak değerlendirilmemiştir. Ses ötesi dalga ekstraksiyonunda çözücü/katı oranı 12,78'de sabit tutularak, probun etki ucunun girebileceği açıklıkta boşluk bulunan ağzı kapalı cam beherler içinde, 50 mL MeOH-H_2O çözeltisi/3.9 g yaprak oranı kullanılarak çalışılmıştır.

Prob uygulamalarında en önemli etkenin enerji yoğunluğu olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kontrol edilmesi gereken temel parametreler süre ve güç olarak belirlenmiştir. Gücü tanımlayan temel değişkenler ise genlik (amplitude) (ultrasonik şiddetin % oranı), probun ses ötesi dalga uygulama süresinin (irridation süresi) tamamında çalışıp-çalışmayacağını belirleyen görev döngüsü (duty cycle) kavramıdır. Sisteme sürekli (S) ve belirli periyotlarda (P) ses ötesi dalga verilmiştir. Ses ötesi dalganın uygulama süresinin etkisini belirlemek amacıyla, farklı sürelerde sisteme ses ötesi dalgalar uygulanmıştır. Tepkime ortamını istenen sıcaklıkta tutmak için soğutmalı sirkülatörden yararlanılmıştır. % genlik (amplitude) seçeneği ile farklı enerji şiddetlerinde çalışılmasına imkan tanınmıştır.

Ultrasonik probun dalga yayan yüzeyinin yakınlarında, maksimum ultrasonik güç bulunmaktadır. Proba olan uzaklık arttıkça ultrasonik yoğunluk (etki) azalmaktadır (bölüm 3.2.2). Bu nedenle prob pozisyonu bir diğer değişken olarak seçilmiştir.

MeOH'ün çalışma aralığı belirlenirken, bir önceki optimizasyon çalışmasının verisi orta nokta olacak şekilde alınmış, maksimizasyonu en iyileyecek aralık seçilmiştir. En temel kısıtlar ise ultrasonik prob cihazından kaynaklanmıştır. Ses ötesi dalgalar, Hielscher Ultrasound Technology UP 100H Ultrasonic Processor (13 mm çaplı çubuk baglantılı) cihazı ile üretilmiştir.

Deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmaları için *Stat-Ease Design-Expert 7.0.0* yazılım programı kullanılmıştır. Deneysel tasarımda beş tane bağımsız değişken; % genlik (amplitude), ses ötesi dalga uygulama süresi (irridiation zamanı), %MeOH oranı, prob pozisyonu, %görev döngüsü (duty cycle) tanımlanmış, toplam fenol (GAE ve OLE eşdeğeri), oleuropein miktarı (HPLC Farmakope 5.0 analizi ile) ve toplam antioksidan cevabı bağımlı değişken olarak kullanılmıştır.



a **b**

Şekil 4.2 Ultrasonik prob ekstraksiyon sistemi

a. şematik gösterimi b. resim gösterimi

4.3.5 EtOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile ekstraksiyon

Ultrasonik prob ile ses ötesi dalga etkisinin incelendiği ekstraksiyon için, ikinci çalışmada EtOH/H_2O çözücü karışımı kullanılmıştır. MeOH/H_2O çözücü karışımının kullanıldığı ekstraksiyonda verilen çalışma koşullarına benzer koşullarda ve aynı ultrasonik prob sistemi ile çalışılmıştır.

EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonuna ait çalışma aralığı, optimum koşullar ile ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisinin sonuçları değerlendirilmiştir. Probun düşük sıcaklıklarda da etkin olması nedeni ile sıcaklık 30 ºC'de sabit tutularak, değişken olarak değerlendirilmemiştir. Ses ötesi dalga ekstraksiyonunda çözücü/katı oranı 28,00'de sabit

tutularak, probun etki ucunun girebileceği açıklıkta boşluk bulunan ağzı kapalı cam beherler içinde, 50 ml EtOH/H_2O çözeltisi/1,785 g yaprak oranı kullanılarak çalışılmıştır.

Deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmaları için *Stat-Ease Design-Expert 7.0.0* yazılım programı kullanılmıştır. Deneysel tasarımda beş tane bağımsız değişken; % genlik (amplitude), ses ötesi dalga uygulama süresi (irridiation time), %MeOH oranı, prob pozisyonu, %görev döngüsü (duty cycle) tanımlanmış, Toplam fenol (GAE ve OLE eşdeğeri), oleuropein miktarı (HPLC Farmakopi 5.0 analizi) ve toplam antioksidan cevabı bağımlı değişken olarak kullanılmıştır.

4.4 *Olea Europaea* L Yapraklarından Polifenollerin Analiz Yöntemleri

4.4.1 *Olea Europaea* L. yaprak ekstrelerinde FCR yöntemi ile toplam fenol tayini

Toplam fenol tayini spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir

(3 $H_2O.P_2O_5.13WO_3.5MoO_3.10\ H_2O$). Varsayılan aktif merkezi Mo(VI) dır.

Mo (VI)(sarı) + e-(antioksidan) → Mo (V)(mavi)

FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından (örneğin vitamin C, aromatik aminler, Cu(I) gibi) indirgenebileceği için, sadece fenolik bileşiklere spesifik değildir. FC metodu gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer. Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler (sodyum karbonat çözeltisiyle pH 10'a ayarlanır). Fenolik bir protonun ayrılması, FCR'yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun oluşmasına neden olur.

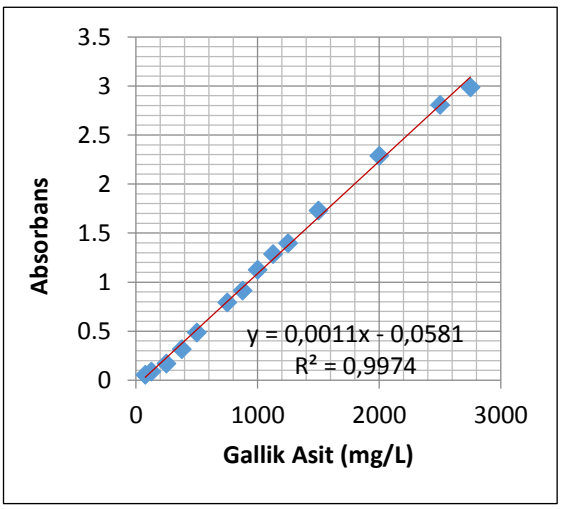
Son absorbans değerleri genellikle reaksiyona giren fenolik hidroksil gruplarının sayısıyla orantılıdır ve molekülün yapısına bağlıdır. Eğer kalibrasyon için kullanılan standart madde yüksek reaktiflikte ise ve yüksek bir absorbans veriyorsa, ölçülen numune değerleri düşük olacaktır. Örneğin, kafeik asitin (iki reaktif OH) absorbans değeri, tek reaktif OH grubu olan bir fenolün absorbansından iki kat daha yüksek

olacağı düşünülmektedir. Literatürde bu yöntemle ilgili olarak gallik asit, tannik asit, kafeik asit gibi çok çeşitli standart bileşiklerle çalışılmıştır. Bu nedenle farklı reaktif OH gruplarına sahip olan, gallik asit ve zeytin yaprağının temel bileşimi olan oleuropein için ayrı ayrı toplam polifenol sonuçları değerlendirilmiştir.

Silva vd. (2006), tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Kullanılan yöntemde 20 µl zeytin yaprağı ekstraktı 4,28 ml saf H_2O ile seyreltilmiştir. Ardından 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi (2N) ile karıştırılmıştır. Karışım 5 dak. karanlıkta bekletilmiş, daha sonra üzerine 600 µl, % 20'lik doygun sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek iyice çalkalanmıştır. Elde edilen karışım 75 dak., 40ºC' de karanlıkta inkübe edildikten sonra, oluşan mavi rengin absorbansı spektrofotometrede (Shimadzu 1700 Pharma Spec UV-Vis Spektrofotometre) 765 nm'de ölçülmüştür.

4.4.1.1 Gallik asit kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

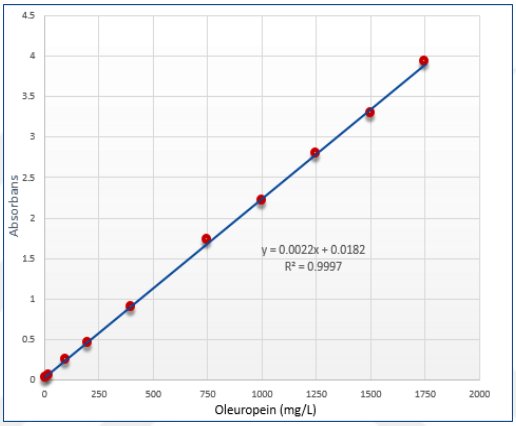
Gallik asit standardı 0,5 g tartılıp 100mL saf su ile çözülmüştür. Hazırlanan bu stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanan, 50-2750 mg/L aralığındaki 13 farklı konsantrasyon ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (R^2= 0.9974) (y = 0.0011x – 0.0581). Sonuçlar elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve mg/g yaprak gallik asit eş degeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.3 FCR ile toplam fenol analizinde gallik asit standardı için kalibrasyon grafiği

4.4.1.2 Oleuropein kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

FCR ile toplam polifenol analizi için standart oleuropein 0,020 g tartılıp 10 mL 80:20 (v/v) MeOH/H_2O karışımı ile çözülmüştür. Hazırlanan bu stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanan, 25-1750 mg/L aralığındaki 10 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (R^2= 0.9997) (y=0.0022x– 0.0182). Sonuçlar elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve mg/g yaprak oleuropein (OLE) eş degeri olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.4 FCR ile toplam fenol analizinde oleuropein standardı için kalibrasyon grafiği

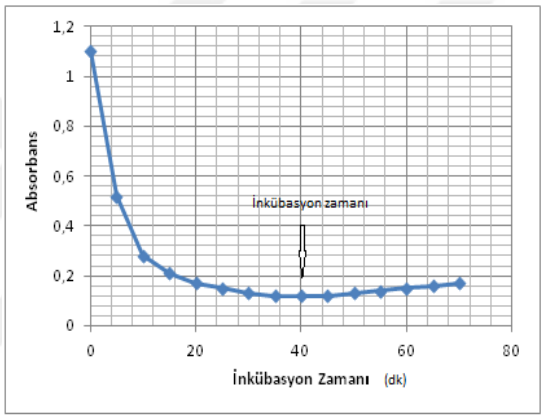
4.4.2 *Olea Europaea* L. yaprak ekstraktlarında DPPH yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini

DPPH, bitki özütlerinin antioksidan potansiyelini belirlemek için yaygın olarak kullanılan basit, hızlı ve nispeten ucuz yöntemlerden biridir. Yu vd. (2005) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek çalışılmıştır.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi DPPH• radikali esaslıdır ve bu radikal birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. Koyu menekşe renktedir. UV-Vis absorpsiyon maksimumu 520 nm'dir. Bu metot DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. Metanolik DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve

absorbanstaki azalma UV-Vis spektrofotometresiyle ölçülür. Sonuçlar % inhibisyon olarak verilmiştir.

Zeytin yaprağı ekstreleri için temel polifenol oleuropein olduğundan, oleuropein için DPPH metoduna ait inkübasyon zamanı belirlenmiştir. Bunun için oleuropein 40 µg/ml, DPPH 6.10^{-5} M olacak şekilde MeOH'de hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden, 4 ml oleuropein üzerine 10mLDPPH eklenerek başlangıçtan itibaren her 5 dakikada bir 70 dk boyunca 520nm de absorbans ölçülmüştür. Değerler grafiğe geçirilerek oleuropein için en uygun inkübasyon zamanının 40 dk olduğu belirlenmiştir. Grafik, şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5 Oleuropein için DPPH metoduna ait inkübasyon zamanının belirlenmesine ait grafik

Zeytin yaprağı ekstreleri için % inhibisyon değerleri aşağıda verilen metoda göre çalışılmıştır.

100 µLyaprak ekstraktı + 2,9 mL DPPH (6.10^{-5} M DPPH =2,4mg DPPH/100mL MeOH)

↓

40 dakika karanlıkta bekle (30 ºC) (520 nm'de ölçüm)

Kontrol olarak MeOH kullanılmıştır. Denklem (4.1) ile % İnhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(Kontrol\ Abs. - Örnek\ Abs)}{(Kontrol\ Abs.)} \text{ x } 100 \qquad (4.1)$$

4.4.3 *Olea Europaea* L. yaprak ekstraktlarında polifenollerin tayini için kullanılan HPLC yöntemleri

4.4.3.1 HPLC Cihazı

Shimadzu marka yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı ile çalışılmıştır. Cihaz; SPD-M10AVP PDA (Photo diode array) dedektör, SIL-10AXL Otomatik örnekleyici, CTO-10A Kolon fırını, LC20AT Pompa, DGU-20A Gradient valf, CBM-20A Prominence Kontrol ünitesi ve Shimadzu *LC Solution* yazılım programı bölümlerinden oluşmakta ve düşük basınç gradient modu ile çalışmaktadır.

Ters faz sıvı kromatografi çalışmalarında kullanılan Inertsil marka analitik kolon; ODS-4 (250x4mm; 5µm) (monomerik, spesifik yüzey alanı 450 m^2/g, pore çapı 100 Å, pore hacmi 1,05 mL/g, karbon içeriği % 11) özelliktedir. ODS-4 kolon yüksek su oranlarına ve geniş pH (2-7,5) aralığına imkan vermesi açısından önemli bir kolon dolgu maddesi özelliği taşımaktadır. Aynı zamanda % 60 oranında end-capped özellik taşıması, Si-OH grupları ile ayırmak istediğimiz polifenolik maddelerin moleküler etkileşiminin önlenmesine imkan vermektedir.

Ters faz kolonlarına ait seçicilik (selectivity) parametreleri; H(Hydrophobicity-Hidrofobiklik), S*(Stearic resistance-Stearik direnç), A (Hydrogen bond acidity-Hidrojen bağı asitliği), B (Hydrogen-bond basicity Hidrojen-bağı bazlığı) ve C (Cation Exchange-Katyon değişimi)'dir. Bu parametrelere ait değerler Inertsil ODS-4 kolon için; H:1,35; S*: 0,011; A:-0,11; B:-0,004; C(2,8):-0,064' dür.

HPLC sisteminde PDA dedektör ile 190-550 nm dalga boyu aralığında çalışılmıştır. Bu aralıkta tarama yapılmış ve kantitatif ölçümler için 280nm dalga boyu kullanılmıştır. Her bir polifenolik bileşen için 190-550nm arasında spektrum taraması yapılarak, maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları tespit edilmiştir.

Ön temizleme işlemi uygulanmamış, alkollü yaprak ekstraktları gibi bitkisel kaynaklı matrikse sahip kompleks örneklerde, kromatografik ayırım çok zor ve işin içinden

çıkılmaz boyutlardadır. Bir çok pikin birbirinin içerisine girmesi, pik şekillerinin bozulması, kuyruklanma gibi örnekler verilebilir. Bu zorlukları aşmak amacı ile özellikle piklerin birbirinin içine girip girmediğinin kontrolünün yapılabilmesi için, yazılımın desteklemesi koşulu ile PDA dedektörlü sistemlerde, pik saflığı (peak purity) yaklaşımından yaralanılır. Bu amaçla çalışmalar, *LC Solution* yazılım programının desteklediği, pik saflığı kontrolü ile yapılmıştır. Her pikin saflık kontrolü ve spektrum tanımlaması yapılarak, spektrum benzetim ve alıkonma zamanlarına göre yerleri tespit edilmiştir. Aynı zamanda yazılım, temel çizgi (baseline) düzeltmesine imkan vermektedir. Her farklı gradient elüsyon çalışması öncesi, temel çizgi düzeltmesi yapılmıştır.

4.4.3.2 Avrupa Farmakope 5.0 yöntemine göre polifenollere ait kalibrasyon standartlarının hazırlanması

Hidroksitirozol, tirozol, luteolin-7-glikozit, oleuropein, apigenin-7-glikozit ve luteoline ait saf standartlardan %80:20 MeOH/H_2O çözücüsü ile stok çözeltiler hazırlanmış, bu stoklardan seyreltme ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dilüsyonlardan kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

Çizelge 4.1 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrileri için kullanılan doğrusallık ve çalışma aralıkları

Bileşik	Doğrusallık aralığı (mg/L)	Çalışma aralığı (mg/L)	Kalibrasyon noktası
Hidroksitirozol	0,5-100	0,37-43,00	7
Tirozol	0,01-20,00	0,05-8,75	7
Luteolin-7-glikozit	0,01-20,00	0,5-5,00	6
Oleuropein	2,50-1750	9,00-1240,00	10
Apigenin-7-glikozit	0,25-50,00	0,39-40,00	7
Luteolin	0,010-20,00	0,022-12,00	7

Polifenolik bileşiklere ait kalibrasyon eğrisi denklemi, LOQ ve LOD değerleri çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrisi denklemi, LOQ ve LOD değerleri

Bileşik	Kalibrasyon Denklemi	R^2	LOD(mg/L)	LOQ(mg/L)
Hidroksitirozol	y=191262x+123121	0,9979	0,012	0,042
Tirozol	y= 258476x+114873	0,9968	0,005	0,015
Luteolin-7-glikozit	y= 3.10^7x-87408	0,9993	0,008	0,026
Oleuropein	y= 65974x+1.10^6	0,9952	$0,4.10^{-3}$	$1,7.10^{-3}$
Apigenin-7-glikozit	y= 295601x+196496	0,9983	0,011	0,037
Luteolin	y= 634194x+300382	0,9921	$0,6.10^{-3}$	$2,0.10^{-3}$

4.4.3.3 Yeni geliştirilen HPLC yöntemine göre polifenollere ait kalibrasyon standartlarının hazırlanması ve kalibrasyon setinin tasarımı

Zeytin yaprağı ekstresindeki konsantrasyonlarını içerecek şekilde, çalışılan polifenollerin kalibrasyon setinin tasarımı yapılmıştır. Rastgele kalibrasyon setinin hazırlanması yerine analiz edilecek maddelerin konsantrasyonlarına göre simetrik bir kalibrasyon setinin hazırlanması ile sonuçların doğruluğu ve hataların minimize edilmesi amaçlanmıştır. Ortagonal çok değişkenli kalibrasyon setinin hazırlanması için Brereton (1997; 2003) çalışmalarından yararlanılmıştır. Altılı karışım için, beş noktalı tasarımda 25 kalibrasyon noktası belirlenmiştir. Standartlar %80/20(v/v) MeOH/H_2O çözücü karışımı ile hazırlanmıştır.

Çizelge 4.3 Polifenollerin kalibrasyon seti tasarımı

	A B C D E F		A B C D E F
1	0 0 0 0 0 0	14	0 +2 +2 -2 +1 -2
2	0 -2 -2 +2 -1 +2	15	+2 +2 -2 +1 -2 0
3	-2 -2 +2 -1 +2 0	16	+2 -2 +1 -2 0 +1
4	-2+2 -1 +2 0 -1	17	-2 +1 -2 0 +1 +1
5	+2 -1 +2 0 -1 -1	18	+1 -2 0 +1+1 -1
6	-1 +2 0 -1 -1 +1	19	-2 0 +1 +1 -1 -2
7	+2 0 -1 -1 +1 +2	20	0 +1 +1-1 -2 -1
8	0 -1 -1 +1 +2 +1	21	+1 +1 -1 -2 -1 0
9	-1 -1 +1 +2 +1 0	22	+1 -1 -2 -1 0 -2
10	-1 +1 +2 +1 0 +2	23	-1 -2 -1 0 -2 -2
11	+1 +2 +1 0 +2 +2	24	-2 -1 0 -2 -2 +2
12	+2 +1 0 +2 +2 -2	25	-1 0 -2 -2 +2 -1
13	+1 0 +2 +2 -2 +1		

A:hidroksitirozol, B:tirozol, C:luteolin-7-glikozit
D: oleuropein, E:apigenin-7-glikozit, F:luteolin

Çizelge 4.4 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrileri için kullanılan doğrusallık aralığı

Bileşik	Doğrusallık aralığı (mg/L)	Kalibrasyon noktası
Hidroksitirozol	2,5-62,5	5
Tirozol	2,0-60,0	5
Luteolin-7-glikozit	10,0-100,0	5
Oleuropein	200-2000	5
Apigenin-7-glikozit	5,0-60,0	5
Luteolin	0,12-20,00	5

Polifenolik bileşiklere ait kalibrasyon eğrisi denklemi, LOQ ve LOD değerleri çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Polifenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrisi denklemi, LOQ ve LOD değerleri

Bileşik	Kalibrasyon Denklemi	R^2	LOD(mg/L)	LOQ(mg/L)
Hidroksitirozol	y=166740x+502478	0,9971	0,008	0,030
Tirozol	y= 185468x+96524	0,9973	0,004	0,013
Luteolin-7-glikozit	$y= 2,5.10^7x-68925$	0,9994	0,006	0,022
Oleuropein	y= 56538x+77380	0,9985	$0,35.10^{-3}$	$1,5.10^{-3}$
Apigenin-7-glikozit	y= 248632x+186597	0,9979	0,009	0,030
Luteolin	y= 598254x+298523	0,9945	$0,5.10^{-3}$	$1,8.10^{-3}$

4.4.3.4 Avrupa Farmakope 5.0 HPLC yönteminin kromatografik çalışma koşulları

Avrupa Farmakope 5.0 (2005) yönteminde kullanılan kromatografik koşullar aşağıda verilmiştir.

Dedektör: PDA, polifenoller 280 nm de analizlenmiştir. Enjeksiyon: otomatik örnekleyici ile yapılmıştır. Örnekler ve standartlar 25 µL hacimde enjekte edilmiştir.25 µL'lik enjeksiyonlar için, otomatik enjektör hacim tekrarlanabilirliği test edilmiş ve kesinliği yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Düşük basınç gradient elüsyonu uygulanmıştır. ODS-4 kolon sisteminde çalışılmıştır. Sıcaklık kolon fırını ile 30ºC'da sabit tutulmuştur. Akış hızı: 1,0 mL/dk' dır.

Mobil faz; A: H_2O (%1 asetik asit'li) B: MeOH

Gradient Program:

0- 5dak; %85-40 A
5-12 dak; %40-20 A
12-15 dak; %20-85 A

4.4.3.5 Yeni geliştirilen (alternatif yöntem) HPLC yönteminin kromatografik çalışma koşulları

Matematiksel modeller ve çözücü gücü modeli ile alıkonma zamanı modelinin bir arada değerlendirildiği metodolojiler kullanılarak, yeni kromatografik cevap faktörü (NCRF) temelli geliştirilen, alternatif HPLC yöntemi için kromatografik koşullar aşağıda verilmiştir.

Dedektör, enjeksiyon, kolon sıcaklığı ve kolon özellikleri Farmakopi 5.0 yöntemi ile aynı koşullardadır. Akış hızı: 1,4 mL/dk olarak uygulanmıştır.

Mobil faz; A: H_2O (%4,8 asetik asit'li) B: MeCN

Gradient Program:
0-15 dak; %100-85 A
15-30 dak; % 85-70 A
30-40 dak; % 70-50 A

5. ARAŞTIRMA BULGULARI I

Bu bölümde zeytin yaprağından fitomoleküllerin ekstraksiyonu için geliştirilmiş metodlara ait; deney tasarımları, modelleme aşamaları ve optimizasyon çalışmaları sonuçları verilmiştir.

5.1 MeOH/H_2O Çözücü Ekstraksiyonu için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması

MeOH/H_2O çözücü sistemi ile kurutulmuş öğütülmüş zeytin yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonuna dayalı çalışma kapsamında; deney tasarımı metodlarından sisteme etki eden değişkenlerden en önemli olanların tespiti, ürün özellikleri üzerinde birbiri ile etkileşimlerinin etkin olup olmadığı belirlenmiştir. Deney tasarımı metotlarından olan cevap yüzey metodu ile sistemin optimum yanıtına, yani ürün özelliklerini optimuma ulaştıracak değişkenlerin değerleri tespit edilmiştir. Cevap yüzey metodu ile dört farklı değişken yardımı ile tanımlanan yüzeylerin, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin yardımıyla modellemesi yapılmıştır. Süreçlerin optimizasyonunda sistemin performansını veya ürün kalitesini belirleyen üç yanıtla eş zamanlı çalışılmıştır. Cevaplar maksimum seviyede tutulurken, sisteme kabul edilebilir ve hedef olması gerekli değerler girilmiştir. Cevap yüzeyi metodundan, deneysel bir çalışmada sonuç üzerinde etkin olan çok sayıdaki faktörden oluşan bir tasarımda, istenen özellikleri sağlayan bölgeyi ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmek için yararlanılmıştır.

Deneysel tasarımda, merkezi kompozit tasarım (Box Wilson tasarımı) kullanılmıştır. (2^4+yıldız tasarımı) 4 faktör için, döndürülebilir ve ortogonal tasarım yapılmıştır. Eksenel mesafe 2,00'dir. Deney Sayısı; $2k+2^k+6 = 2*4 + 2^4+6 = 30$ (k: bağımsız değişken sayısı) eşitliğinden 30 olarak hesaplanmıştır.

Bölüm 3.4 de verilen, eşitlik 3.9'dan yararlanılarak $y= f(x1,x2) + \varepsilon$ denklem'de, ε; kurulan modelin hatası olarak tanımlanmıştır. İkinci dereceden kurulan modelin hataları sabit varyansla normal dağılmış olup birbirinden bağımsızdır. Optimizasyon

çalışmasında sistemi karakterize eden tüm yanıtlar birlikte ele alınmış, çok yanıtlı optimizasyon, çok amaçlı pareto bölgeler yardımı ile çözülmüştür.

Çizelge 5.1 Üç bağımlı değişken için dört faktörlü CCD tasarımda (Merkezi Kompozit Tasarım) kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı

Sıralama ve Seviyeleri					
Faktörler(Bağımsız Değişkenler)	**+2 (+α)**	**+1**	**0**	**-1**	**-2 (-α)**
A: MeOH (%v/v)	85	65	45	25	5
B : Sıcaklık (C^o)	75	60	45	30	15
C : Süre (dk)	100	75	50	25	0
D:Çözücü/Katı Oranı (mL/g)	18,50	14	9,5	5	0,5

Bağımlı değişken olarak;

y_1 : Toplam Fenol miktarı (GAE) mg/g yaprak

y_2 : Toplam Fenol miktarı (OLE eşdeğeri) mg/g yaprak

y_3 : Oleuropein miktarı (HPLC ölçümü) mg/g yaprak

belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve deneysel sonuçlar çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.2 MeOH/H_2O ekstraksiyonu deneysel tasarım noktaları ve deneysel sonuçlar

Std	Run	Blok	Faktör1 A:MeOH %v/v	Faktör2 B:Sıcaklık °C	Faktör3 C:Süre dakika	Faktör4 D:Ç/K oranı	Cevap 1 T. Fenol GAE.	Cevap 2 T. Fenol OLE	Cevap 3 Oleuropein HPLC
1	28	{1}	25(-1)	30(-1)	25(-1)	5(-1)	7,37	3,54	1,71
2	14	{1}	65(+1)	30(-1)	25(-1)	5(-1)	8,47	4,09	2,76
3	19	{1}	25(-1)	60(+1)	25(-1)	5(-1)	9,20	4,45	2,21
4	6	{1}	65(+1)	60(+1)	25(-1)	5(-1)	11,70	5,71	2,49
5	26	{1}	25(-1)	30(-1)	75(+1)	5(-1)	9,06	4,39	2,34
6	13	{1}	65(+1)	30(-1)	75(+1)	5(-1)	8,88	4,29	4,33
7	5	{1}	25(-1)	60(+1)	75(+1)	5(-1)	10,04	4,88	2,06
8	1	{1}	65(+1)	60(+1)	75(+1)	5(-1)	12,74	6,23	4,79
9	20	{1}	25(-1)	30(-1)	25(-1)	14(+1)	11,21	5,13	1,73
10	18	{1}	65(+1)	30(-1)	25(-1)	14(+1)	15,74	7,39	5,07
11	24	{1}	25(-1)	60(+1)	25(-1)	14(+1)	14,93	6,98	2,49
12	2	{1}	65(+1)	60(+1)	25(-1)	14(+1)	16,55	7,79	3,19
13	8	{1}	25(-1)	30(-1)	75(+1)	14(+1)	15,60	7,33	2,82
14	22	{1}	65(+1)	30(-1)	75(+1)	14(+1)	22,01	10,53	5,24
15	27	{1}	25(-1)	60(+1)	75(+1)	14(+1)	21,35	10,20	2,98
16	30	{1}	65(+1)	60(+1)	75(+1)	14(+1)	27,13	13,09	6,10
17	3	{1}	5(-2)	45(0)	50(0)	9,5(0)	10,89	5,14	1,02
18	29	{1}	85(+2)	45(0)	50(0)	9,5(0)	20,55	9,97	4,62
19	16	{1}	45(0)	15(-2)	50(0)	9,5(0)	11,04	5,21	1,79
20	7	{1}	45(0)	75(+2)	50(0)	9,5(0)	20,73	10,06	3,45
21	15	{1}	45(0)	45(0)	0(-2)	9,5(0)	2,36	0,87	0,37
22	21	{1}	45(0)	45(0)	100(+)	9,5(0)	17,76	8,57	4,55
23	23	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	5(-1)	9,96	4,84	2,27
24	25	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	18,5(2	21,79	10,25	4,07
25	11	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	9,5(0)	14,59	6,99	2,92
26	17	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	9,5(0)	16,58	7,98	3,48
27	10	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	9,5(0)	16,28	7,83	2,72
28	9	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	9,5(0)	15,86	7,62	2,87
29	4	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	9,5(0)	18,45	8,92	2,67
30	12	{1}	45(0)	45(0)	50(0)	9,5(0)	12,08	5,74	3,31

Her bir cevap faktörü için tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. Oluşturulan bu modelin deneysel verileri ne kadar karşıladığı ise yine varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle herbir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri % 95

güven seviyesinde Fischer F testi uygulanarak belirlenmiştir. Bir model sistemin gerçek cevaba uygun olup olmadığına uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun %95 güven seviyesinde önemli olması koşulu ile karar verilmiş ve istatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelden çıkarılmıştır. Uyum eksikliği için F testinin önemli olduğu durumda, verilerle uygun olması için daha karmaşık bir modele ihtiyaç duyulmuş ve model değiştirilmiştir.

İlişki katsayıları (R^2 ve $R^2_{Düzeltilmiş}$) değerleri, istatistiksel olarak; regresyon modelindeki bağımlı değişkenlerin ortalamadan sapmalarının, deneysel olarak elde edilen bağımlı değişkenlerin ortalamadan sapmalarına oranı olarak ifade edilir ve bağımlı değişkenin bağımsız değişkenler tarafından ne kadar iyi açıklandığını göstermek için kullanılır. R^2'nin değeri 0,7 ile 1,0 arasında olması bize modelin doğruluğu hakkında bilgi vermektedir. Regresyon denkleminde bu çalışmada olduğu gibi, bağımsız değişken sayısı arttıkça determinasyon katsayısı sürekli artış gösterir ve bu durum yanıltıcı olabilir. Bu yüzden düzeltilmiş regresyon katsayısıda incelenmelidir.

P değerleri, her bir katsayının önemini kontrol etmek için bir araç olarak kullanılmaktadır. P değerinin küçük olması, katsayıya ilişkin bağıntının önem derecesinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

İkinci dereceden model denklemi dört bağımsız değişken için;

$$y = f(x) = \beta o + \sum_{i=1}^{4} \beta i x i + \sum_{i,j=1}^{4} \beta j i x i x j + \sum_{i=1}^{4} \beta i i \, x_i^2 + r_i$$

denklemi ile tanımlanmıştır.

5.1.1 Cevap Faktörü 1:Toplam Fenol (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve toplam fenol (GAE) cevap faktörüne ilişkin regresyon katsayılarının önemini bulmak için faktörlerin (değişkenlerin) orta noktalarında yapılan bir dizi paralel deneyden yararlanılmış ve uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden

regresyon modelin geçerliği sınanmış olup cevap faktörü için sonuçlar ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.3'te verilmiştir.

Çizelge 5.3 MeOH/H_2O ekstraksiyonu: Toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	789,46	14	56,39	13,84	**<0,0001**	**geçerli**
A-MeOH	79,85	1	79,85	19,60	**0,0005**	
B-Sıcaklık	83,19	1	83,19	20,42	**0,0004**	
C-Süre	162,43	1	162,43	39,87	**<0,0001**	
D-Ç/K Oranı	337,22	1	337,22	82,78	**<0,0001**	
AB	0,035	1	0,035	$8,491.10^{-}$	0,9278	
AC	1,54	1	1,54	0,38	0,5485	
AD	9,34	1	9,34	2,29	0,1508	
BC	2,34	1	2,34	0,58	0,4599	
BD	1,89	1	1,89	0,46	0,5064	
CD	35,06	1	35,06	8,61	**0,0103**	
A^2	0,14	1	0,14	0,034	0,8568	
B^2	0,35	1	0,35	0,085	0,7747	
C^2	50,50	1	50,50	12,40	**0,0031**	
D^2	5,06	1	5,06	1,24	0,2828	
Arta Kalan	61,11	15	4,07			
UyumEksikliği	38,10	10	3,81	0,83	**0,6277***	**geçerli**
Hata	23,01	5	4,60			
Düzeltilmiş top.	850,57	29				

Önemli Model Terimleri	**A, B, C, D, CD, C^2**
R^2: 0,9282	$R^2_{\textbf{düzeltilmiş}}$:0,8611

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,9282 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile %92,82 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin toplam fenol (GAE mg/g yaprak) tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini göstermektedir.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,6277 hesaplanmış ve önemli ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH-H_2O ekstraksiyonunda MeOH oranı, sıcaklık, süre, çözücü/katı

oranının, toplam fenol tayinine (GAE) etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları çizelge 5.3'de verilmiştir. Tasarım kullanılarak 30'lu deney seti (çizelge 5.2) çalışılmış, deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmış ve elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.Fenol/GallikAsit}$= **15,54**+**1,82**A+**1,86**B+**2,60**C+**4,24**D + **0,046**AB + **0,31**AC + **0,76**AD + **0,38**BC + **0,34**BD + **1,48**CD + **0,070**A^2 + **0,11**B^2 – **1,34**C^2 – **0,56**D^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$= **1,258**–**0,043**A–**0,027**B+**0,120**C+**0,195**D+**1,550.10^{-4}**AB+**6,195.10^{-4}**AC +**8,489. 10^{-3}**AD+**1,021.10^{-3}**BC+**5,089.10^{-3}**BD+**0,013**CD+**1,752.10^{-4}**A^2+**4,949.10^{-4}**B^2–**2,152.10^{-3}**C^2 – **0,027** D^2

(P) PROP değeri; her bir terimin sahip olduğu katsayının sistem için önemini gösterir. PROP değerinin 0,05 den küçük olduğu terimler sistem için önemlidir, ihmal edilemez. PROP değeri küçük olan terimin modele olan etkisi daha fazladır. Bu durumda model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiş olup aşağıda verilmiştir:

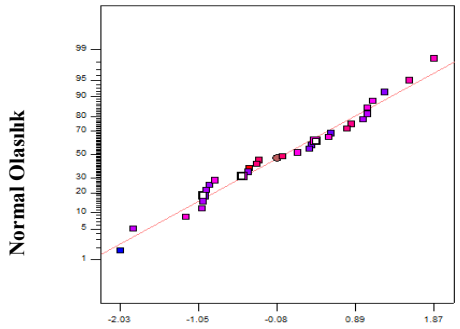
Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$= **15,54**+**1,82**A + **1,86**B + **2,60**C + **4,24**D + **1,48**CD **-1,34** C^2

Gerçek Değerlerle;

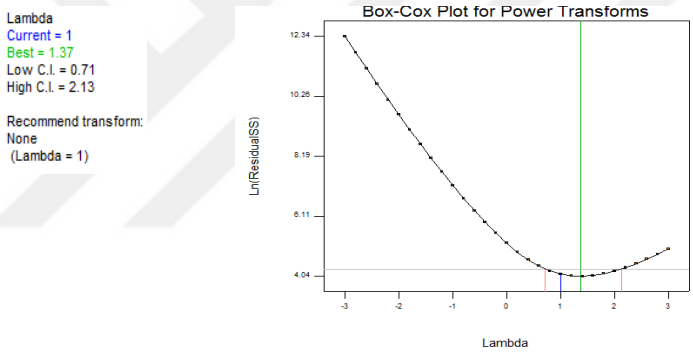
$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$= **1,258 - 0,043**A – **0,027**B + **0,120**C+ **0,195**D + **0,013**CD- **2,151** $10^{-3}C^2$

Cevap faktörü 1 Toplam Fenol (GAE)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1 Toplam Fenol miktarı (GAE) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği

Hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek amacı ile normal olasılık (dağılım) grafiğinden yararlanılmıştır.



Şekil 5.2 Box-Cox grafiği

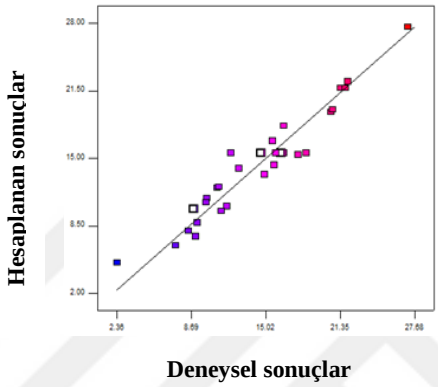
Şekil 5.2 verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının doğal logaritması (ln) ile lambda (λ) değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=1,37 bulunmuş çalışmanın cevap değeri için %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Box-Cox regresyon yöntemi, regresyon fonksiyonunun doğrusal olmayan durumu, sabit olmayan hata varyansları ve hata terimlerinin dağılışlarının çarpıklığını düzeltmek için Y'nin üzerinde dönüşüm yapılması açısından oldukça uygundur.

Hata terimi ile bağımlı değişkenin süreklilik ve normal dağılma varsayımı bozulduğu durumlarda, λ_j , j = 1, 2, ..., k, kuvvet dönüşümü ile tanımlanan Box-Cox regresyon

yöntemi kullanılmaktadır. Y'ler üzerindeki λj , j = 1, 2, ..., k, kuvvet dönüşümünün hangi λj değerinde hata kareler toplamını minimum yaptığı durum ele alınmaktadır (Göktaş vd. 2012).

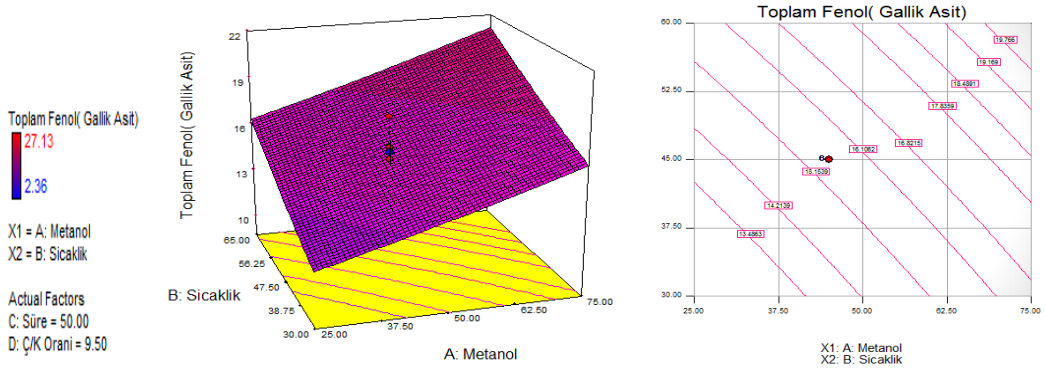
Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.3'de verilmiştir.



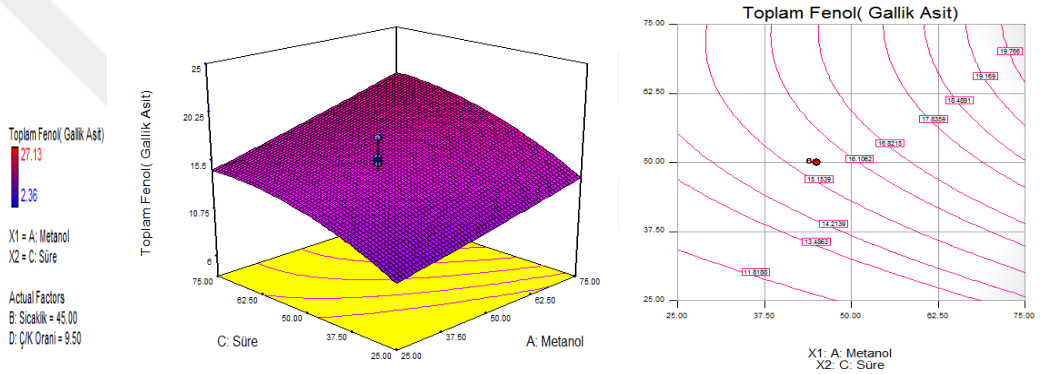
Şekil 5.3 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

Model denkleminde MeOH oranı, sıcaklık, süre ve çözücü/katı oranının önemli parametreler olduğu, süre-Ç/K oranı arasındaki ilişki ile sürenin iç etkileşiminin (süre^2) önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden iki tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin Toplam fenol (GAE) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.

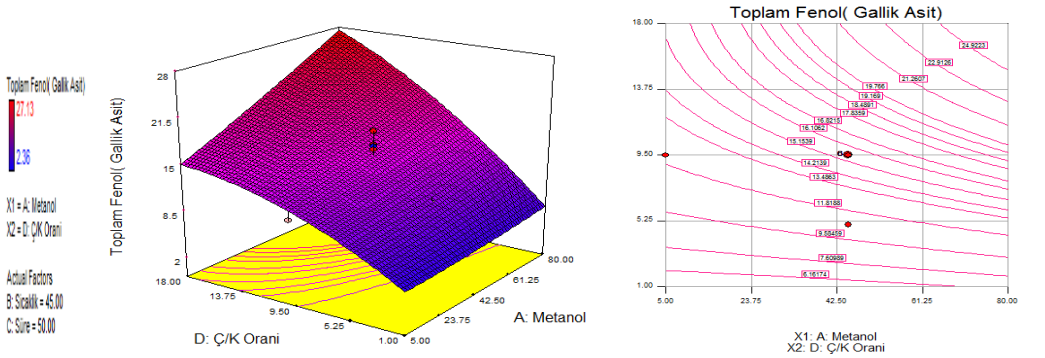
Parametrelerin etkileşimi ve sonuç üzerindeki etkisi üç boyutlu yüzey grafiklerle ve izohips eğrileri ile gösterilmiştir. İzohips eğrilerinin dairesel veya eliptik olması, değişkenler arasındaki etkileşimlerin anlamlı olup olmadığına işaret eder. Eğer bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimler anlamlı ise eliptik izdüşüm grafikleri elde edilir.



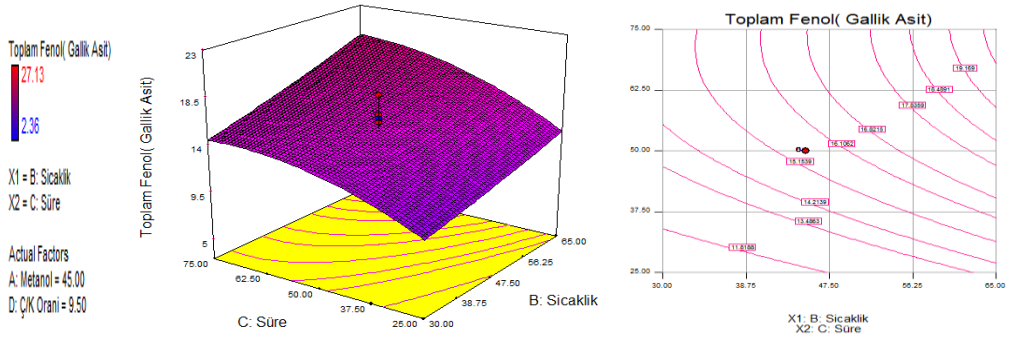
Şekil 5.4 Sıcaklık-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=f(x)= +**15,54**+ **1,82**A +**1,86**B +**0,046**AB +**0,070**A^2+**0,11**B^2



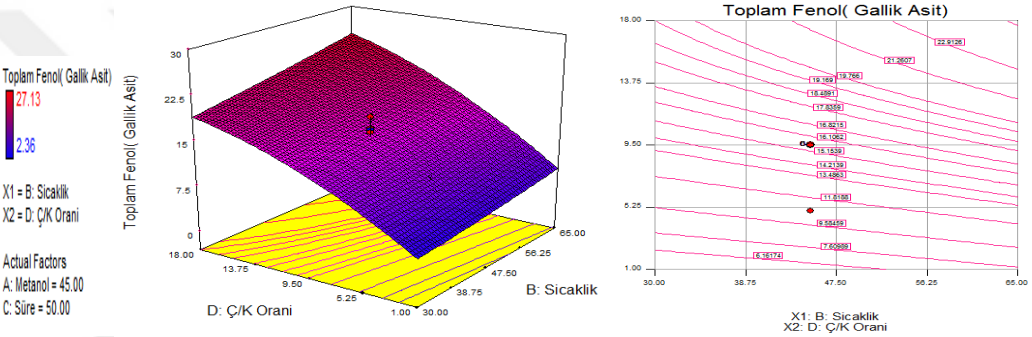
Şekil 5.5 MeOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +**15.54**+**1.82*** A+**2.60*** C +**0.31***A*C +**0.070***A^2 -**1.34***C^2



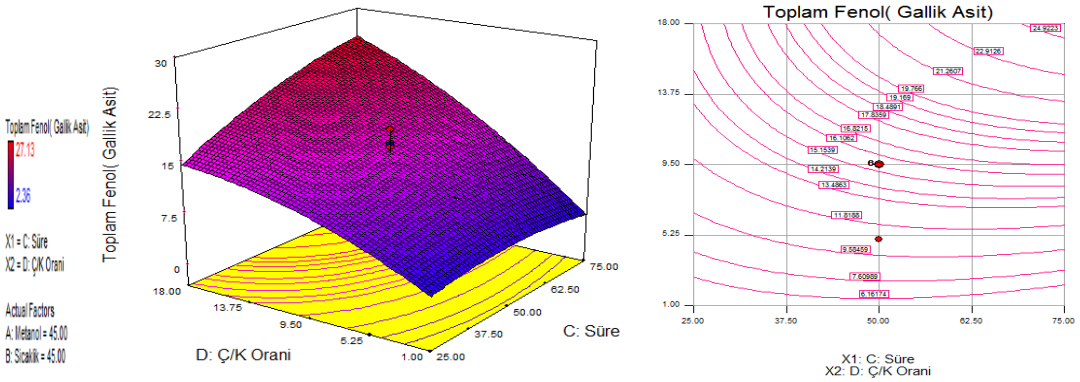
Şekil 5.6 MeOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +**15.54**+**1.82*** A +**4.24*** D +**0.76***A*D +**0.070***A^2 -**0.56***D^2



Şekil 5.7 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +**15.54** +**1.86*** B+**2.60*** C +**0.38***B* C +**0.11***B^2-**1.34***C^2



Şekil 5.8 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +**15.54** +**1.86*** B +**4.24*** D +**0.34***B*D +**0.11***B^2 -**0.56***D^2



Şekil 5.9 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +**15,54** +**2,60**C +**4,24**D +**1,48CD-1,34**C^2-**0,56**D^2

Şekil 5.4' de verilen izohips eğrileri ve üç boyutlu yüzey grafikleri MeOH-sıcaklık arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Model denklemi ile uyumludur. Modelde AB (MeOH-sıcaklık) için p değeri (0,9278) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Her iki parametrede cevap faktörüne artan oranlarda etki ederken üç boyutlu yüzey grafiğinde MeOH etkisinin sıcaklığın artan oranlarında daha fazla etkili olduğu görülmektedir. Şekil 5.5'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (MeOH-süre) için p değeri (0,5485) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. MeOH-süre arasındaki yüzey profili bize bir plato bölgesi oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.6'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (MeOH- çözücü/katı oranı) için p değeri (0,1508) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. MeOH-çözücü/katı oranı arasındaki yüzey profili bize çözücü-katı oranı çalışma aralığının biraz daha genişletilebileceği hakkında bilgi vermektedir. Ancak yine de yüzey profilinde bir maksimizasyon noktası belirlenebilmesi, işin ekonomisi açısından en önemli iki parametre için kısıtlarımızdan vazgeçmemeyi gerektirmiştir. Şekil 5.7'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Model denklemi ile uyumludur. Modelde BC (sıcaklık-süre) için p değeri (0,4599) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde her iki parametrede artan oranlarda etki etmektedir. Şekil 5.8' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (sıcaklık- çözücü/katı oranı) için p değeri (0,5064) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, sıcaklık parametresi ve çözücü/katı oranı cevap faktörüne, pozitif etki etmektedir. Şekil 5.9'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde CD (süre-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,0103 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, süre parametresi ve çözücü/katı oranı cevap faktörüne pozitif etki etmiştir. Çözücü/katı oranı arttıkça toplam fenol (GAE) miktarı artmaktadır.

5.1.2 Cevap Faktörü 2:Toplam Fenol (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve toplam fenol (OLE) cevap faktörüne ilişkin regresyon katsayılarının önemini bulmak için faktörlerin (değişkenlerin) orta noktalarında yapılan bir dizi paralel deneyden yararlanılmış ve uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve cevap faktörü için bulunan sonuçlar ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.4'de verilmiştir.

Çizelge 5.4 MeOH/H_2O ekstraksiyonu Toplam fenol (OLE eşd.) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	183,67	14	13,12	12,91	**<0,0001**	**geçerli**
A-MeOH	19,95	1	19,95	19,63	**0,0005**	
B-Sıcaklık	20,79	1	20,79	20,46	**0,0004**	
C-Süre	40,72	1	40,72	40,06	**< 0,0001**	
D-Ç/K Oranı	71,56	1	71,56	70,40	**<0,0001**	
AB	0,010	1	0,010	$9,839\ 10^{-3}$	0,9223	
AC	0,38	1	0,38	0,37	0,5510	
AD	2,33	1	2,33	2,29	0,1511	
BC	0,59	1	0,59	0,58	0,4569	
BD	0,46	1	0,46	0,45	0,5103	
CD	8,79	1	8,79	8,65	**0,0101**	
A^2	0,034	1	0,034	0,034	0,8564	
B^2	0,085	1	0,085	0,083	0,7766	
C^2	12,67	1	12,67	12,47	**0,0030**	
D^2	1,28	1	1,28	1,26	0,2794	
Artık	15,25	15	1,02			
UyumEksikliği	9,52	10	0,95	0,83	**0,6257***	**geçerli**
Hata	5,73	5	1,15			
Düzeltilmiş	198,92	29				
Önemli Model Terimleri			**A, B, C, D, CD, C^2**			
R^2=0,9234			R^2_{Adj}=0,8518			

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,9234 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 92,34 ihtimal ile açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç, elde edilen model denklemin toplam fenol (OLE, mg/g) miktarının tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini göstermektedir.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,6257 hesaplanmış ve önemli ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH ekstraksiyonunda MeOH oranı, sıcaklık, süre, çözücü/katı oranının, toplam fenol miktarına (OLE eşdeğeri) etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Tasarım kullanılarak 30'lu deney seti (çizelge 5.5) çalışılmış, deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=**7,46** + **0,91**A + **0,93**B + **1,30**C + **1,95**D + **0,025**AB + **0,15**AC + **0,38**AD + **0,19** BC + **0,17**BD + **0,74**CD + **0,035**A^2 + **0,055**B^2 – **0,67**C^2 – **0,28**D^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$= 0,658–0,02A–0,013B+006C+0,063D + $8,33.10^{-5}$AB + $3,075.10^{-4}$AC + $4,24.10^{-3}$ AD + $5,133.10^{-4}$BC + $2,518.10^{-3}$BD + $6,589.10^{-3}$CD + $8,780.10^{-5}A^2$ + $2,45.10^{-4}B^2$ – $1,078.10^{-3}C^2$ – 0,014D^2

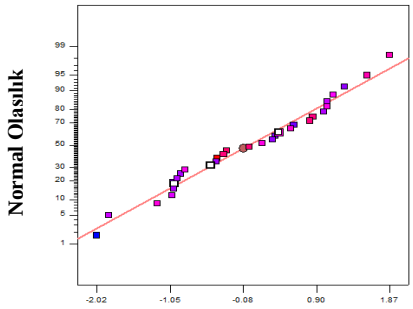
Bu durumda model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenerek aşağıda verilmiştir:

Kodlanmış değerlerle;
$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$= +**7,46**+**0,91**A+**0,93**B+**1,30**C + **1,95**D + **0,74**CD -**0,67**C^2

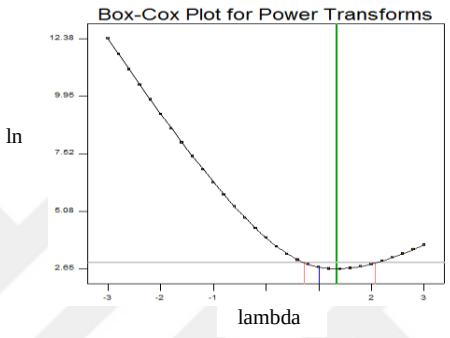
Gerçek değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$= **+0,658 - 0,217**A – **0,013**B + **0,060**C + **0,063**D + **$6,589.10^{-3}$** CD – **$1,078.10^{-3}$** C^2

Toplam fenol (OLE)'ün maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek amacı ile çizilmiş ve grafik, şekil 5.10'da verilmiştir.

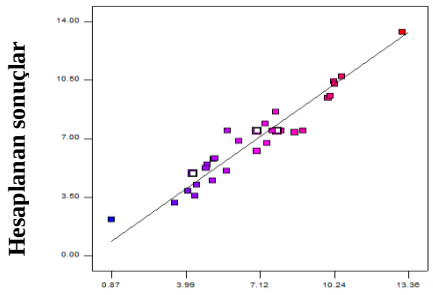


Şekil 5.10 Toplam Fenol miktarı (OLE eşd.) maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık grafiği



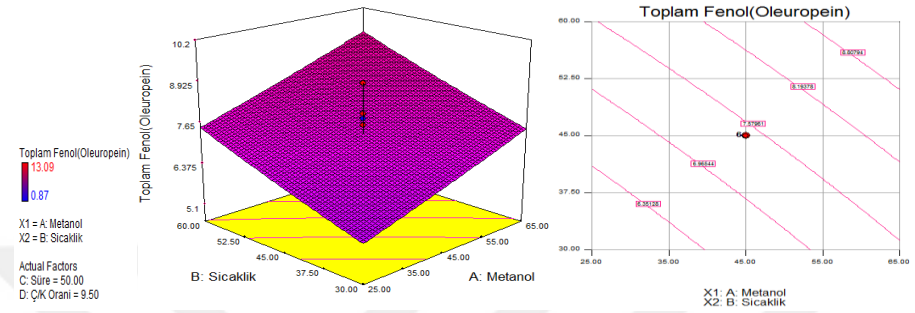
Şekil 5.11 Box-Cox grafiği

Şekil 5.11 verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının doğal logaritması (ln) ile lambda (λ) değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=1,28 bulunduğundan çalışmanın cevap değeri için %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.12'de verilmiştir.

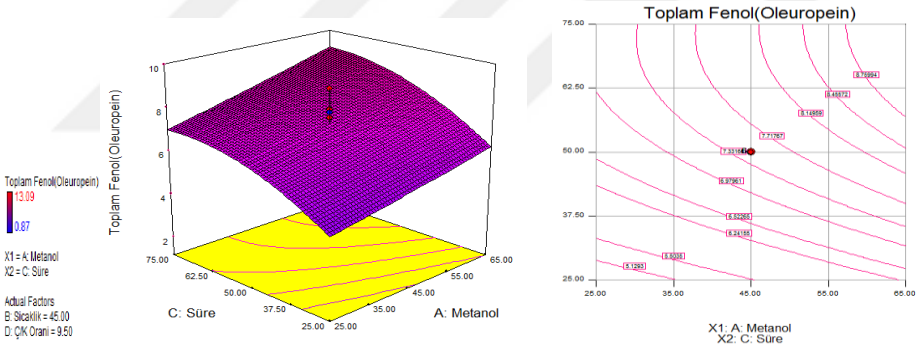


Şekil 5.12 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

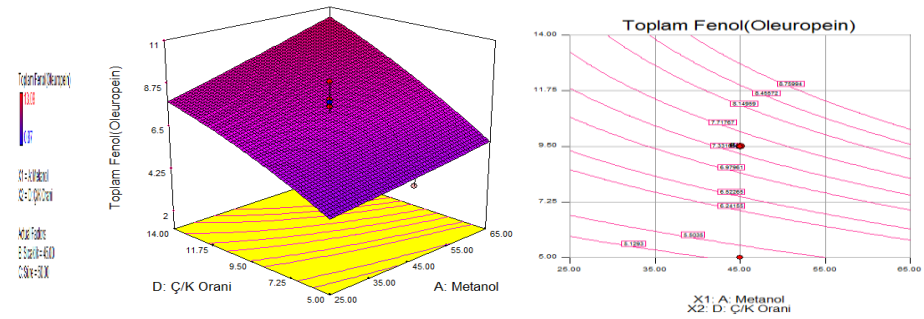
Model denkleminde MeOH oranı, sıcaklık, süre ve çözücü/katı oranının önemli parametreler olduğu, süre-çözücü/katı oranı arasındaki ilişkinin ve sürenin iç etkileşiminin (süre^2) önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden iki tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin Toplam fenol (OLE) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



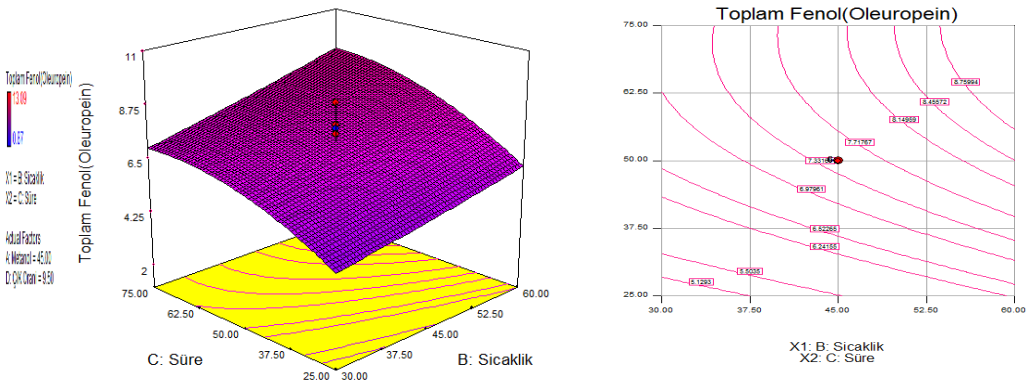
Şekil 5.13 Sıcaklık-MeOH modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, ($Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= **7,46**+ **0,91**A+ **0,93**B+ **0,025**AB +**0,035**A^2 +**0,055B^2)**



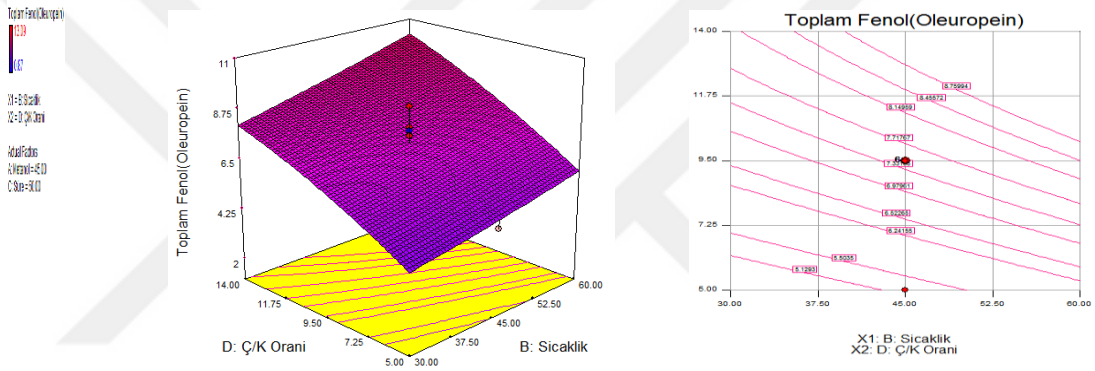
Şekil 5.14 MeOH-süre modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi ($Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)=**7,46**+**0,91**A +**1,30**C +**0,15** AC+**0,035**A^2-**0,67**C^2)



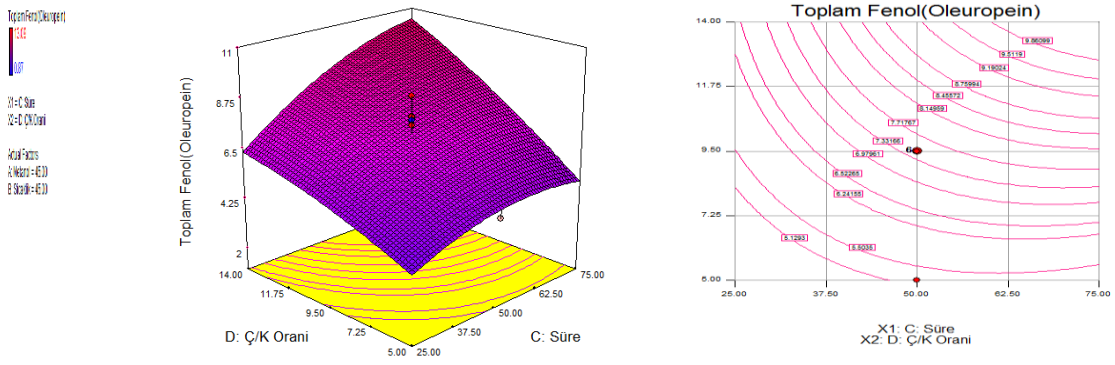
Şekil 5.15 MeOH-çözücü/katı oranı modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=f(x)=**7,46**+**0,91**A +**1,95**D +**0,38**AD +**0,035**A^2-**0,28**D^2



Şekil 5.16 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +**7,46** +**0,93**B+**1,30**C +**0,19**BC +**0,055**B^2-**0,67**C^2



Şekil 5.17 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +**7.46** +**0.93*** B +**1.95*** D +**0.17***B*D +**0.055***B^2 **-0.28***D^2



Şekil 5.18 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +**7,46** + **1,30** C +**1,95*** D +**0,74**C*D **-0,67***C^2**-0,28***D^2

Şekil 5.13'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-sıcaklık arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AB (MeOH-sıcaklık) için p değeri (0,9223) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Her iki parametrede yüzey profilinde cevap faktörüne pozitif etki etmektedir. Şekil 5.14'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (MeOH-süre) için p değeri 0,5510 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profili bir plato görüntüsündedir ve MeOH parametresi cevap faktörüne anlamlı etki vermemekte, süre pozitif etki etmektedir. Şekil 5.15' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (MeOH- çözücü/katı oranı) için p değeri 0,1511 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde çözücü katı oranının daha fazla etkili olduğu görülmektedir. Şekil 5.16'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (sıcaklık-süre) için p değeri 0,4569 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde sıcaklık parametresi cevap faktörüne etki vermezken, süre pozitif etki etmektedir. Şekil 5.17'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (sıcaklık- çözücü/katı oranı) için P değeri (0,5103) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır Yüzey profilinde sıcaklık parametresi cevap faktörüne etki etmezken, çözücü/katı oranı pozitif etki etmektedir. Şekil 5.18' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde CD (süre-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,0101 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde süre parametresi ve çözücü/katı oranı cevap faktörüne pozitif etki etmiştir. Çözücü/katı oranı arttıkça toplam fenol (OLE eşd.) miktarı artmaktadır.

5.1.3 Cevap Faktörü 3: Oleuropein miktarı (HPLC ile tayin) deneysel tasarım sonuçları

Tasarım matrisi ve oleuropein (HPLC) cevap faktörüne ilişkin regresyon katsayılarının önemini bulmak için faktörlerin (değişkenlerin) orta noktalarında yapılan bir dizi paralel deneyden yararlanılmış ve uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden

regresyon modelin geçerliği sınanmış ve cevap faktörü için bulunan sonuçlar ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.5'de verilmiştir.

Çizelge 5.5 MeOH/H_2O ekstraksiyonu oleuropein (HPLC) cevap faktörü için tanımlana kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	42,93	14	3,07	7,21	**0,0002**	**geçerli**
A-MeOH	21,72	1	21,72	51,09	< **0,0001**	
B-Sıcaklık	0,55	1	0,55	1,29	0,2736	
C-Süre	12,57	1	12,57	29,58	< **0,0001**	
D-Ç/K Oranı	3,06	1	3,06	7,20	**0,0170**	
AB	0,24	1	0,24	0,57	0,4617	
AC	1,49	1	1,49	3,52	0,0804	
AD	0,78	1	0,78	1,83	0,1959	
BC	0,27	1	0,27	0,64	0,4354	
BD	0,016	1	0,016	0,038	0,8476	
CD	$6{,}006\ 10^{-3}$	1	$6{,}006\ 10^{-3}$	0,014	0,9070	
A^2	0,052	1	0,052	0,12	0,7313	
B^2	$1{,}302\ 10^{-3}$	1	$1{,}302\ 10^{-3}$	3,064	0,9566	
C^2	0,061	1	0,061	0,14	0,7096	
D^2	0,64	1	0,64	1,50	0,2394	
Arta Kalan	6,38	15	0,43	5,44	0,0378	
Uyum Eksikliği	5,84	10	0,58	7,21	0,2002	**geçerli değil**
Hata	0,54	5	0,11			
Düzeltilmiş	49,30	29				

Önemli Model Terimleri	**A, C, D**
R^2 =0,8707	$R^2_{\text{Düzeltilmiş}}$ =0,7500

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8707 olarak elde edilmiştir. Bu sonuç elde edilen model denklemin oleuropein (HPLC) tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri (0,2002) hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH-H_2O ekstraksiyonunda MeOH oranı, sıcaklık, süre, çözücü/katı oranının, oleuropein miktarına (HPLC) etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları çizelge 5.7'de verilmiştir. Tasarım kullanılarak 30'lu deney seti çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle;

$Y_{Oleuropein}$= **2,94** + **0,95**A + **0,15**B + **0,72**C + **0,40**D - **0,12**AB +**0,31**AC + **0,22**AD + **0,13**BC + **0,22**AD - **0,032**BD + **0,019**CD + **0,043**A^2 – **6,829** $10^{-3}B^2$ – **0,047**C^2 +**0,20** D^2

Gerçek Değerlerle;

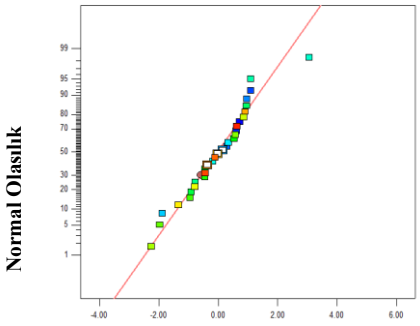
$Y_{Oleuropein}$= 1,149 +2,467.10^{-3}A +0,018B –8,375.10^{-3}C –0,193D-4,104.10^{-4}AB + 6,112.10^{-4} AC +2,451.10^{-3}AD+3,483.10^{-4}BC-4.722.10^{-3}BD–4,722.10^{-4}CD+1,079.$10^{-4}$$A^2$– 3,035.$10^{-5}$ B^2 – 7,492.$10^{-5}$$C^2$ +9,7510.$10^{-3}$$D^2$

Bu durumda model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenerek aşağıda verilmiştir:

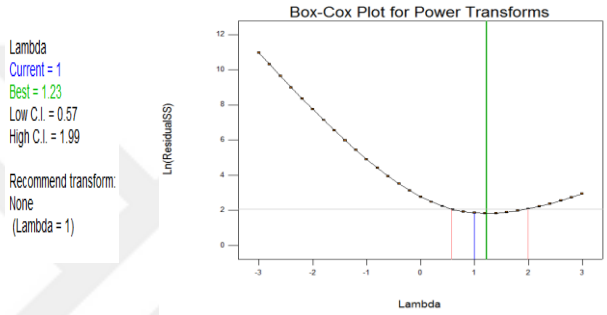
Kodlanmış değerlerle;
$Y_{Oleuropein}$= **+2,94 + 0,95**A +**0,72**C +**0,40**D

Gerçek değerlerle;
$Y_{Oleuropein}$= **+1,149 +2,467.10^{-3}**A **- 8,375.10^{-3}**C **– 0,193**D

Cevap faktörü 3 oleuropein (HPLC)'nin maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.19'da verilmiştir.



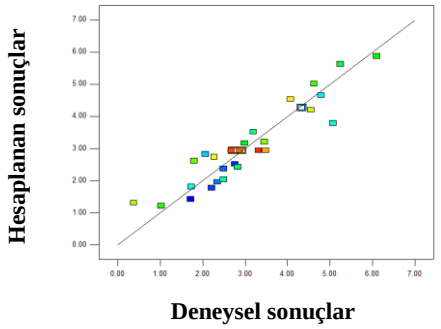
Şekil 5.19 Oleuropein (HPLC) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 5.20 Box-Cox grafiği

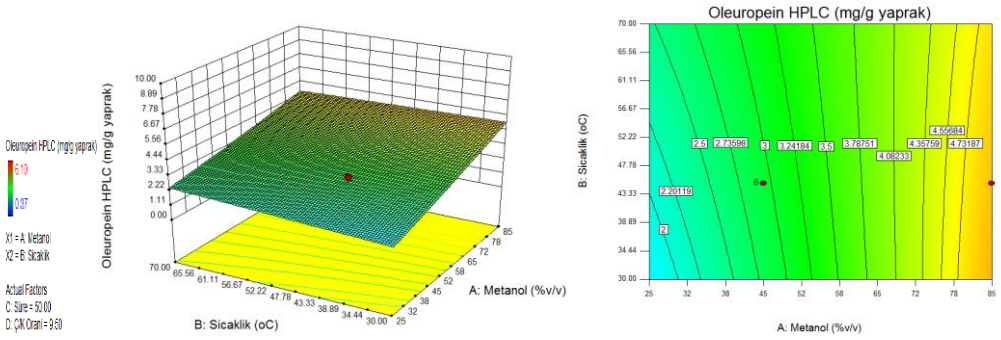
Şekil 5.20 verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln'i ile lambda (λ) değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=1,23 bulunduğundan çalışmanın cevap değeri için % 95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.21'de verilmiştir.

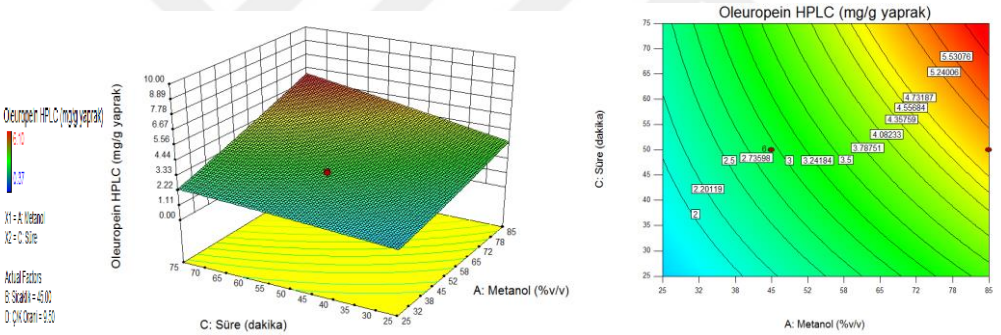


Şekil 5.21 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

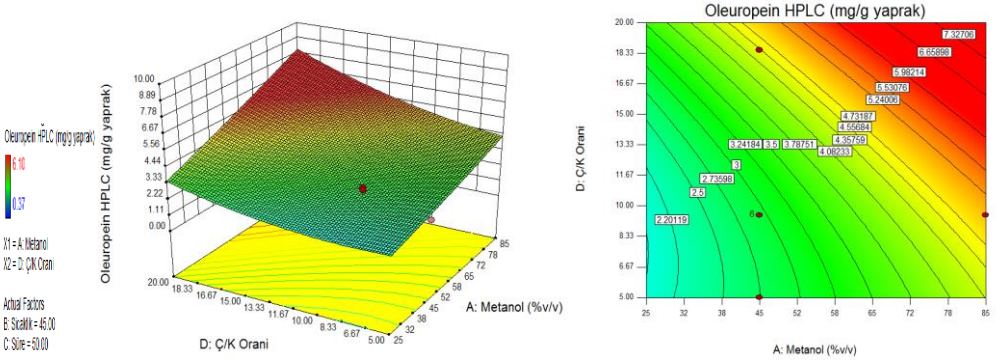
Model denkleminde MeOH oranı, süre ve çözücü/katı oranının önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden iki tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin oleuropein miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



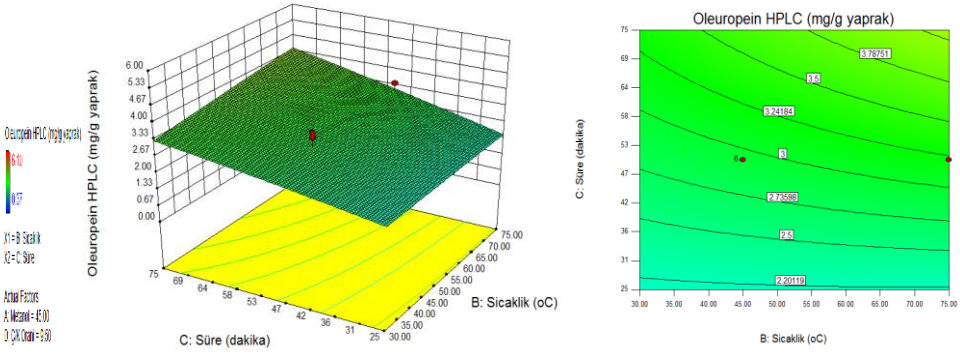
Şekil 5.22 Sıcaklık-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= +**2,94** + **0,95**A +**0,15**B - **0,12** AB +**0,043** *A^2 – **6,829** 10^{-3} B^2



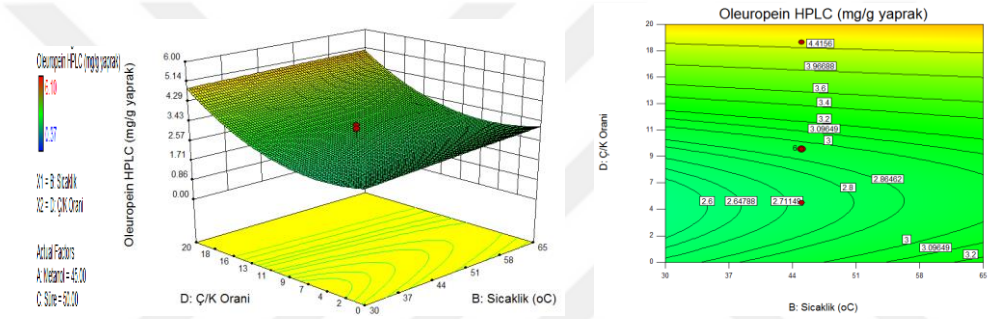
Şekil 5.23 MeOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)=+**2.94** +**0,95***A+ **0,72***C +**0,31***AC +**0,043***A^2– **0,047***C^2



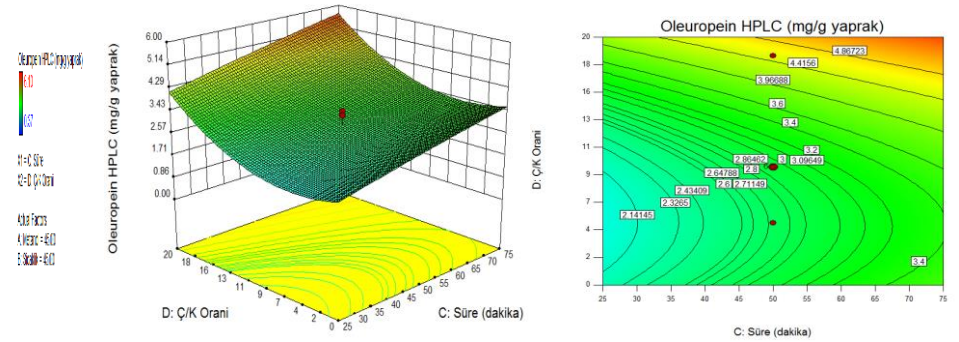
Şekil 5.24 MeOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç bo yutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= +**2,94** + **0,95** A +**0.40** D +**0,22** AD +**0,043** A^2 +**0,20** D^2



Şekil 5.25 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= +**2.94** +**0,15**B +**0,72**C + **0,13** BC– **6,829** 10 $^{-3}$B^2 – **0,047** C^2



Şekil 5.26 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= +**2.94** +**0,15*** B +**0.40** *D - **0,032***BD – **6,829** 10 $^{-3}$ B^2 +**0,20** D^2



Şekil 5.27 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +**7.46** +**1.30**C+**1.95**D +**0.74**CD -**0.67**C^2-**0.28**D^2

Şekil 5.22'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-sıcaklık arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AB (MeOH-sıcaklık) için p değeri (0,4617) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Her iki parametrede yüzey

profilinde cevap faktörüne anlamlı etki etmemektedir. Şekil 5.23'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (MeOH-süre) için p değeri (0,0804) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde MeOH ve süre parametresi cevap faktörüne etki etmemektedir. Şekil 5.24'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (MeOH-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,1959 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, çözücü/katı oranı çalışma aralığının dışında kalmış ve daha yüksek oranlarda çalışılması gerektiğini göstermektedir. Ancak bu parametre ile diğer parametrelerin etkileşimleri de anlamlılık sağlamadığından, yöntemin ekonomisi dikkate alınarak, çalışma kısıtları korunmuş ve çalışma aralığı genişletilmemiştir. Şekil 5.25'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (sıcaklık-süre) için p değeri (0,4354) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde sıcaklık ve süre parametresi cevap faktörüne etki etmemektedir. Şekil 5.26' da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (sıcaklık-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,8476 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profili bir minimumu işaret etmektedir ve sıcaklık parametresi cevap faktörüne etki etmezken, çözücü/katı oranı etki etmektedir. Şekil 5.27'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği süre-çözücü/katı oranı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde CD (süre-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,9070 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştur. Yüzey profilinde süre parametresi etki etmezken, çözücü/katı oranı cevap faktörüne negatif etki etmiştir. Yüzey profili bir minimumu işaret etmektedir.

5.1.4 MeOH/H_2O çözücü ekstraksiyonu için optimizasyon çalışması

MeOH çözücü sistemi ile ekstraksiyonun, deneysel tasarım çalışmaları sonucu üç cevap faktörüne karşı alınan ANOVA sonuçlarında elde edilen yeterli kesinlik sonuçları çalışmanın yeterli veri ile tamamlandığını göstermektedir. Sinyal gürültü oranının 4'ün üstünde olması yeterli kesinliğin (adequate precision), olduğunu göstermektedir. Bu

çalışmada bulunan sinyal gürültü oranları, her bir cevap faktörü için (Toplam fenol-GAE; Toplam fenol-OLE; oleuropein-HPLC) sırası ile 15,917; 15,708 ve 10,126 dır.

Çalışmanın bu aşamasında optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Optimizasyon; bir reel fonksiyonun en küçük değerini ya da en büyük değerini elde etmek amacı ile gerçek ya da tamsayı değerlerini belirli bir aralıkta seçip fonksiyona yerleştirerek sistematik olarak bir problemi incelemek ya da çözmek işlemlerinin tümüne denir. Optimum çözümler için diferansiyel hesap yöntemleri kullanılmıştır.

Bu çalışma kapsamında; doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve kısıtlanmış optimizasyon uygulanmıştır.

Cevap yüzeyi yönteminde optimal deney noktalarının belirlenmesinde iki aşamalı bir yol izlenmiştir;

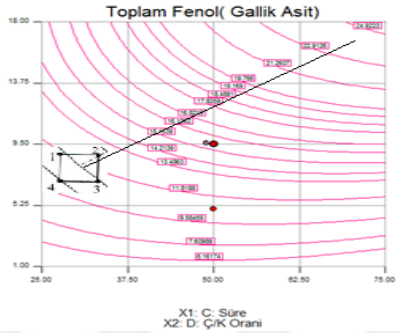
1- Bir deneye dayanarak, bir sonraki deneyde cevap yüzeyi altındaki maksimum (ya da minimum) noktaya doğru nereden hareket edileceğinin belirlenmesi. Bu aşama en dik çıkış (iniş) yöntemi olarak bilinmektedir.

2- Yüzeyin maksimum (ya da minimum) ya da yaklaşık maksimum (ya da minimum) sonucunu belirledikten sonra cevap yüzeyinin bu maksimum (ya da minimum) nokta civarındaki alanda denkleminin belirlenmesi.

Deneysel çalışmalarda cevap yüzeyinin fonksiyonu bilinmez. Bu nedenle herhangi bir yüzey için en iyi durumlar kümesini bulabilmek için en dik çıkış (iniş) yolu (the path of steepest ascent-descent) olarak bilinen yöntem kullanılabilir. En dik çıkış (iniş) yöntemi, deney tasarımı, model tasarım yöntemleri ve ardışık deneyler ile bölgenin araştırılması aşamalarını kapsamaktadır. Bu yöntemdeki düşünce, cevap yüzeyinin küçük bir alanı üzerinde basit bir deney uygulamaktır. Burada uygulamaya yönelik olarak bu yüzey, düzlem olarak düşünülebilir. Bundan sonra bu düzlemin denklemi bulunur ve bu denklemden de yüzeyin en iyi noktasına doğru hareket etmek için gidilecek yön belirlenir. Daha sonraki deney, tepe (dip) noktasına (en iyi nokta) en hızlı şekilde ulaşacak yönde

tasarlandığı için bu yöntem en dik çıkış yöntemi olarak adlandırılır. Bu yöntem, sonradan yapılacak ardışık deneylerin orjinal deneyden ne kadar uzak olacağını belirlemez, ancak, bundan sonraki deneyin hangi yönde yapılacağını gösterir (Myers ve Montgomery 2002).

Çalışmada, en dik çıkış yöntemi için örnek bir çalışma şekil 5.28' de verilmiştir.



Şekil 5.28 MeOH/H_2O çözücü ekstraksiyon optimizasyonu için en dik çıkış yöntemi ile deneysel adımların yönünün belirlenmesi

Çalışmada kullanılan Box-Wilson dik yokuş yöntemi doğrusal bir regresyon modelle açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmıştır. Bu yönteme göre doğrusal modelin katsayıları cevap fonksiyonunun gradientini oluşturmaktadır. Gradient yönünde katsayıların işaretine uygun ve onların değerleri ile orantılı parametrelerin değiştirilmesi gerekir. Bu işlemler birkaç adımdan oluşmaktadır. Her bir adımda bir önceki adımdan alınan cevap fonksiyonu, parametrelerin ortalama değerlerinden elde edilenden ne kadar artmış veya azalmış olduğu hesaplanarak tasarım noktalarındaki çalışmalarla kıyaslandırılır. Dik yokuş yöntemi doğrusal modelin katsayıları önemsiz olana kadar devam ettirilir. Bu da amaç fonksiyonunun optimal bölgeye çıktığını gösterir.

$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + ... + \beta_k x_k$ gradientin hesaplanması aşağıda verildiği şekildedir.

$\frac{\partial y}{\partial x1} = \beta 1$; $\frac{\partial y}{\partial x2} = \beta 2$; $\frac{\partial y}{\partial xk} = \beta k$

$\Delta Uij = \beta j \, \Delta jm$ j=1,2,3…k m: adım uzunluğu olarak alınır. Optimum işletme koşulları için uygulanan örnek çalışma aşağıda ki çizelge 5.6'da verilmiştir.

Çizelge 5.6 MeOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunda dört değişkenin gradient adımlarının belirlenmesi

	x_1	x_2	x_3	x_4
Z^0(Orta değer)	45	45	50	9,5
Δim	20	15	25	4,5
Z^0+ 0,25*Δi	50	48,75	56,25	10,625
Z^0+ 0,50*Δi	55	51	62,5	11,75
Z^0+ 0,75*Δi	60	56,25	68,75	12,875
Z^0+ 1*Δi	65	60	75	14
Z^0+ 1,25*Δi	70	63,75	81,5	15,125

Elde edilen sonuçlara göre maksimum miktarda Toplam Fenol (GAE ve OLE eşd.) ve oleuropein miktarının (HPLC) elde edildiği şartlarda optimizasyon yapılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Tek amaç fonksiyonuna sahip optimizasyon problemlerinde tasarım değişkenleri tek bir optimum değer alabilmelerine rağmen, tanımlanan çok amaçlı optimizasyon problemlerinde birden fazla amaç fonksiyonunu maksimum yapacak tasarım değişkenlerine ait bir çözüm seti elde edilmeye çalışılır ve bu Pareto (Bulanık mantık) optimal olarak adlandırılır. Eşitliklerle ifade edilen doğrusal programlama modelinde değişken sayısı her eşitlik sayısından daha fazla olur. Doğrusal sistemlerde çözümler bağımsız çözümler kümesi sistemdeki eşitsizlik sayısı ($Ax \leq b$), m, ve değişken sayısının (x değişkenleri), n, bir fonksiyonudur. Olabilecek tüm çözümlerin sayısı ise aşağıdaki denklem 5.1'den elde edilir.

$$\binom{m+n}{n} = \frac{(m+n)!}{m!n!} \tag{5.1}$$

Bu durumda 4 bağımsız değişken için yüzlerce çözüm önermemiz gerekir. Özellikle ikili etkileşimler ve üstel ifadelerde söz konusu olduğundan olay işin içinden çıkılmaz hale gelmektedir. Bu amaçla, Pareto optimal sistemi kullanılmıştır.

Çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümünde, doğrusal olmayan programlama yaklaşımı, yanıtların izohips eğrileri çizilerek superimposing (üst üste yerleştirilmesi) ve desirability (istenilen hedefe ulaşma) fonksiyonu yaklaşımı gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır. Superimposing; çok sayıda bağımlı ve bağımsız değişkenin (dört veya daha fazla) bir arada incelendiği durumlar için kullanışlığını kaybetmektedir. Bu nedenle çalışmada desirability değerlendirilmiştir. Desirability (istenilen hedefe ulaşma) fonksiyonunun ilkesi tüm yanıtların, boyutsuz desirability skalasını içeren " desirability fonksiyonu" olarak tanımlanan tek bir fonksiyon altında toplanmasını ve bu fonksiyonunun arzu edilecek sonuçları verecek şekilde maksimize edilmesini içermektedir. Desirability fonksiyonu tüm yanıtların bir araya getirildiği, 0 ile 1 arasında değişen tek bir yanıt indeksidir ve bu değerin 1'e yaklaşması, belirlenen kriterlerin sağlandığını belirtmektedir. Desirability fonksiyonu her bir yanıt için ayrı ayrı hesaplanır ve daha sonra bu bireysel fonksiyonların geometrik ortalaması alınarak tek bir toplu desirability fonksiyonu oluşturulur.

$$D = (d_1 x d_2 x ... x d_n)^{\frac{1}{n}} = \left(\prod_{i=1}^{n} d_i \right)^{\frac{1}{n}} \qquad (5.2)$$

Yukarıdaki denklem 5.1.2'ye göre geometrik ortalama alınarak oluşturulan toplu desirability fonksiyonunu, maksimize eden (x) değişken seviyesi kombinasyonu bulunmuştur. Belirlenen çözüm kümesinden optimum noktanın tespitinde, bu çalışma için yanıt değişkenlerini maksimize eden çözüm noktası yeter koşul olarak belirlenmiştir. Özellikle zeytin yaprağının temel bileşeni oleuropeinin miktarını maksimize eden çözüm noktaları, optimizasyon için tercih edilmiştir.

Optimizasyonda desirability çalışmaları sonucu, elde edilen çözüm kümesi aşağıda verilmiştir.

Number	Metanol	Sicaklik	Süre	Ç/K Orani	Toplam Feno	Toplam Feno	Oleuropein H	Desirability	w/o Intervals	
1	45.000	45.000	50.000	9.500	15.542	7.464	2.937	1.000	1.000	
2	12.313	48.938	55.625	9.194	13.415	6.413	1.644	1.000	1.000	
3	65.000	60.000	25.000	5.000	10.394	5.057	2.371	1.000	1.000	
4	25.000	60.000	75.000	14.000	21.788	10.420	3.167	1.000	1.000	
5	65.000	30.000	25.000	14.000	14.390	6.716	3.786	1.000	1.000	
6	25.000	60.000	25.000	14.000	13.478	6.255	2.031	1.000	1.000	
7	45.000	45.000	0.000	9.500	4.959	2.165	1.303	1.000	1.000	
8	65.000	30.000	25.000	5.000	8.030	3.870	2.512	1.000	1.000	
9	25.000	30.000	25.000	5.000	6.622	3.167	1.416	1.000	1.000	
10	65.000	60.000	75.000	5.000	14.021	6.872	4.652	1.000	1.000	
11	65.000	60.000	25.000	14.000	18.128	8.583	3.517	1.000	1.000	
12	25.000	30.000	75.000	14.000	16.705	7.883	2.421	1.000	1.000	
13	61.750	58.250	71.250	12.775	25.025	12.084	5.223	1.000	1.000	Selected
14	45.000	45.000	50.000	18.500	21.798	10.252	4.535	1.000	1.000	
15	25.000	30.000	25.000	14.000	9.926	4.488	1.807	1.000	1.000	
16	65.000	30.000	75.000	5.000	10.126	4.915	4.271	1.000	1.000	
17	61.750	31.750	71.250	12.775	20.651	9.895	4.983	1.000	1.000	
18	25.000	60.000	75.000	5.000	11.189	5.454	2.826	1.000	1.000	
19	25.000	60.000	25.000	5.000	8.800	4.254	1.767	1.000	1.000	
20	25.000	30.000	75.000	5.000	7.480	3.597	1.952	1.000	1.000	

Optimim koşullar; 61,75 (v/v) MeOH, 58,25 ºC sıcaklık, 71,25 dk süre, 12,78Ç/K oranı olarak belirlenmiştir.

Deney doğrulama (Experimental verification) cevap yüzey yöntemi ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için yapılan üç tekrarlı deney doğrulama sonuçlarından, Toplam Fenol (GAE) mg/g yaprak), Toplam Fenol (OLE eşd) mg/g yaprak ve Oleuropein miktarı,mg/g yaprak değerleri sırası ile **25,025 mg/g yaprak, 12,084 mg/g yaprak, 5,220 mg/g yaprak** ve standart sapma değerleri sırasıyla 2,018; 1,008, ve 0,650 olarak hesaplanmıştır.

5.1.5 MeOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi

Çalışmanın bu aşamasında, ses ötesi dalganın (ultrasonik dalga) MeOH/H_2O ekstraksiyonuna olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla; MeOH'lü ekstraktların optimal bölgede ve zorlanmış bölgede yapılan çalışmaları, aynı zamanda Everest Cleanex 911 model ultrasonik banyo (220V; 50 Hz) ile ses ötesi dalga etkisi verilerek incelenmiştir.

Ses ötesi dalga etkisi ile yapılan çalışmalara ait koşullar ve karşılaştırmalar çizelge 5.7'de verilmiştir.

Çizelge 5.7 MeOH/H_2O ekstraksiyonunda sesötesi dalga (ultrasonik banyo) uygulama sının üç cevap faktörü üzerine etkisi

Koşullar	T.Fenol (GAE)	T. Fenol (GAE) Ses Ötesi Dalga Uygulanmış	T.Fenol (OLE.Esd.)	T.Fenol (OLE Esd.) Ses Ötesi Dalga Uygulanmış	Oleuropein (HPLC)	Oleuropein(HPLC) Ses Ötesi Dalga Uygulanmış	T.Fenol (GAE) Fark, %	Toplam Fenol (OLE Eşd.) Fark, %	Oleuropein (HPLC), %,
72,18 (v/v) MeOH / 64,24 °C / 67,73 dk. /3,70Ç/K	6,1	6,5	2,9	3,2	2,18	2,21	**7,1**	**7,1**	**1,5**
83,39 (v/v) MeOH / 62,71°C / 74,09 dk. / 4,55 Ç/K	7,8	8,3	3,8	4,1	2,9	2,99	**7,3**	**7,6**	**4,1**
77,11 (v/v) MeOH / 64,10 °C / 81,78 dk. / 4.53Ç/K	8,8	8,6	4,3	4,2	3,01	3,07	**-2,3**	**-2,3**	**1,9**
80,47 (v/v) MeOH / 66.27 °C / 76,12 dk./5.77Ç/K	7,6	8,1	3,7	3,9	3,6	4,16	**6,6**	**8,5**	**17,3**
79.49 (v/v) MeOH / 74.55 °C / 32.83dk./ 19,61 Ç/K	12,4	13,6	5,7	6,4	4,2	4,87	**10,9**	**11,2**	**15,0**
41.90 (v/v) MeOH / 42,10°C / 79,28dk. / 9,862 Ç/K	11,7	13,9	5,6	6,7	1,0	1,13	**18,5**	**19,2**	**12,2**
65 (v/v) MeOH / 60 °C / 75dk. / 5 Ç/K	9,6	11,5	4,7	5,6	3,2	3,23	**18,9**	**18,9**	**2,6**
65 (v/v) MeOH/ 60 °C / 25dk./ 5 Ç/K	6,7	8,5	3,2	4,1	2,5	3,06	**26,9**	**27,9**	**21,8**
65 (v/v) MeOH / 60°C /75dk. /15 Ç/K	13,7	16,3	6,5	6,8	5,2	3,47	**9,8**	**5,3**	**-33,2**
25 (v/v) MeOH / 30 °C / 75dk. / 5 Ç/K	6,8	7,9	3,3	3,8	1,857	2,777	**17,8**	**16,0**	**49,5**
25 (v/v)MeOH / 60 °C / 75 dk. / 5 Ç/K	8,5	9,1	4,2	4,5	1,99	2, 796	**6,7**	**7,4**	**40,5**
61,75 (v/v) MeOH, 58,25 °C, 71,25 dk süre , 12,78 Ç/K	25,0	26,8	12,1	13,5	5,2	5,9	**6,7**	**10,3**	**11,9**

Çizelge 5.7'de, her üç cevap değişkeninin optimal bölge çevresinde ve zorlanmış bölgede yapılan ses ötesi dalga etkisinin sonuçları değerlendirilmiştir. İki yöntem arasında %95 güven seviyesinde anlamlı bir fark olup olmadığı veri çifti t-testi uygulaması ile belirlenmiştir. Toplam fenol miktarı (GAE ve OLE) açısından, iki yöntem arasında anlamlı bir fark olduğu, oleuropein miktarı açısından anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiş ve t-testine ait istatistiki sonuçlar, her bir cevap faktörü için ayrı ayrı

değerlendirilerek EK1' de verilmiştir (toplam fenol (GAE) sonuçları EK1-a, toplam fenol (OLE eşd) sonuçları EK1-b ve oleuropein miktarı (HPLC) EK1-c).

Ses ötesi dalga bir ortamdan geçerken kütle transferine olan hem iç ve hem de dış dirence tesir eden bir seri etkide bulunmaktadır. Yüksek frekanslı ultrasonik dalganın, sıvı içinde karıştırma etkisiyle sıvıdaki taşınımı arttırarak, kütle transferinde dış direnci düşürdüğü ve kütle transferinde artışa neden olduğu düşünülmektedir. Ultrasonik dalgaya maruz kalan bitkisel dokularda fiziksel değişimler meydana gelmiş ve ultrasonik dalga etkisiyle hücre duvarları hasar görerek doku içindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin ortaya çıkması kolaylaşmıştır. Çalışma sonuçlarıda bu anlamda zeytin yaprağından MeOH-H_2O ile polifenolik maddelerin ekstraksiyonunda, ses ötesi dalganın anlamlı pozitif etkisinin olduğunu göstermektedir. Bazı çalışma noktalarında, toplam fenol miktarlarında %26,9 (GAE); %27,9 (OLEeşd), oleuropein (HPLC) miktarında %49,5 oranlarında artış gözlenmiştir. Sadece bir noktada toplam fenol miktarları için %2,3 ve %2,3, oleuropein(HPLC) miktarında %33,2 oranında azalma gözlemlenmiştir. Sonuçlar, ses ötesi dalga uygulamasının ekstraksiyon süresine bağlı olarak, toplam fenol miktarı üzerinde negatif olarak etki edebileceğini, süre ile birlikte sıcaklığın da oleuropein miktarı üzerine büyük oranda negatif etki göstereceği bilgisini vermektedir. Aynı zamanda, MeOH oranının %25 gibi düşük değerinde, ses ötesi dalganın oleuropein (HPLC) miktarı üzerine %49,5 ve %40,5 oranlarında pozitif etki etmesi, oleuropeinin ekstraksiyonu açısından, oldukça önemli bir noktadır. Su oranının arttığı noktalarda, MeOH/H_2O çözücü sisteminde ses ötesi dalganın etkisinin önemli oranda yüksek olması, MeOH kullanımının azaltılması açısından avantaj teşkil etmektedir. MeOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunun optimum koşullarında, ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga, pozitif etki vermiştir.

MeOH çözücü sisteminde ses ötesi dalganın toplam fenol ve oleuropein (HPLC) miktarı üzerinde, bazı koşullar dışında pozitif etki etmesi nedeniyle, optimum nokta çevresi ve zorlanmış koşullarda toplam antioksidan aktivitenin etkilenip etkilenmeyeceği ve ne oranda değişeceği de belirlenmiştir. Bu amaçla aynı koşullarda ses ötesi dalga uygulanmış MeOH/H_2O çözücülü ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite tayin edilmiş ve alınan sonuçlar çizelge 5.8'de verilmiştir.

Çizelge 5.8'de verilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ses ötesi dalganın çoğu durumda, MeOH/H_2O'lu ekstraktlardaki antioksidan aktivite değerini, düşürdüğü tespit edilmiştir. t testi sonuçlarına göre, ses ötesi dalga uygulanan ve uygulanmayan koşulların karşılaştırılması ile anlamlı bir fark tespit edilmiş, ancak ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisinin % inhibisyonu azalttığı görülmüştür (t testi, EK1d). Bu açıdan değerlendirildiğinde, ses ötesi dalga etkisinin antioksidan aktiviteyi azaltıcı yönde etki ettiği söylenebilir. Bu olumsuz etkiye rağmen, % inhibisyon değerlerinde çok büyük düşüşler gözlenmemesi, MeOH/H_2O'lu ekstraktlarda, ses ötesi dalga etkisi ile polifenolik yapıların bozulmadığını düşündürmüştür.

Çizelge 5.8 Ses ötesi dalga uygulanmış ve uygulanmamış MeOH/H_2O çözücülü ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite değişimi

Koşullar	Ses Ötesi Dalga uygulanmamış		Ses Ötesi Dalga uygulanmış	
	Abs.	%İnhibisyon	Abs.	%İnhibisyon
72,2 (v/v) MeOH / 64,2 °C / 67,7 dk. / 3,7 Ç /K	0,127	92,42	0,113	93,26
83,4 (v/v) MeOH / 62,7 °C / 74,1 dk. / 4,6 Ç/K	0,095	94,33	0,098	94,15
77,1 (v/v) MeOH / 64,1 °C / 81,8 dk. / 4,5Ç/K	0,107	93,62	0,105	93,74
80,5 (v/v) MeOH / 66,3 °C / 76,1 dk. / 5,8 Ç/K	0,088	94,75	0,090	94,63
61,8 (v/v) MeOH/58,25 °C/ 71,25 dk/12,78 Ç/K	0,051	96,96	0,066	96,06
41,9 (v/v) MeOH / 42,1 °C / 79,3 dk. / 9,9 Ç/K	0,074	95,58	0,075	95,53
65 (v/v) MeOH / 60 °C /75 dk. / 5 Ç/K	0,125	92,54	0,125	92,54
65 (v/v) MeOH / 60 °C / 25 dk. / 5 Ç/K	0,100	94,03	0,113	93,26
65 (v/v) MeOH / 30 °C /75 dk. / 5 Ç/K	0,102	93,91	0,128	92,36
65 (v/v) MeOH/ 60 °C / 75 dk. / 15 Ç/K	0,078	95,35	0,099	94,09
25 (v/v) MeOH / 30 °C / 75 dk. / 5 Ç/K	0,075	95,53	0,092	94,51
25 (v/v) MeOH / 60 °C / 75 dk. / 5 Ç/K	0,083	95,05	0,094	94,39
Kontrol (MeOH)	1,676			
Oleuropein		55,80		

Bu çalışmalar ışığında, tüm cevap değişkenleri için, sabit frekans ve güçte bile ses ötesi dalganın anlamlı etkisinin olması, değiştirilebilir frekans ve güçte, ses ötesi dalga uygulamasının, ekstraksiyonu daha fazla geliştirecek bir durum yaratacağı görüşünü doğurmuştur. Bu amaçla çalışmanın bu aşamasında zeytin yaprağından polifenollerin ekstraksiyonu için yeni bir yöntem geliştirilmesi ve optimum koşullarının belirlenmesi için ultrasonik prob uygulamasına geçilmiştir. Ultrasonik prob için yapılan deneysel

tasarım ve optimizasyon çalışmaları kapsamında, toplam fenol (GAE ve OLE) ve oleuropein miktarı çoklu amaç fonksiyonu ile bir arada değerlendirilirken, toplam antioksidan kapasitenin farklı bir amaç fonksiyonu kapsamında değerlendirilerek tek cevap faktörlü optimizasyon yapılmasına karar verilmiştir.

5.2 MeOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Prob Ekstraksiyonunda Üç Amaçlı Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması

MeOH çözücü sistemine ultrasonik prob etkisi ile kurutulmuş öğütülmüş zeytin yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonuna dayalı çalışma kapsamında; deney tasarımı metodlarından sisteme etki eden değişkenler ve ürün özellikleri üzerinde bu etkileşimlerin etkin olup olmadığı belirlenmiştir. Deney tasarımı metotlarından olan cevap yüzey metodu ile sistemin optimum yanıtına, yani ürün özelliklerini optimuma ulaştıracak değişkenlerin büyüklükleri tespit edilmiştir. Cevap yüzey metodu ile beş farklı değişken yardımı ile tanımlanan yüzeylerin, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin yardımı ile modellemesi yapılmıştır. Süreçlerin optimizasyonunda sistemin performansını veya ürün kalitesini belirleyen üç yanıtla eş zamanlı çalışılmıştır. Aynı zamanda toplam antioksidan aktivite yanıtına karşı ayrı bir tasarım yapılarak, tek cevaplı optimizasyon çalışması da yapılmıştır.

Zeytin yaprağından MeOH çözücülü ultrasonik prob ile polifenollerin ekstraksiyonu için, beş bağımsız değişkenin çalışma aralıkları belirlenirken, MeOH çözücü optimizasyonuna ait optimum koşullardan yararlanılmıştır. MeOH/H_2O çözücü karışımına ait optimum koşullar; bölüm 5.1.4'de 61,75 (v/v) MeOH; 58,25 ^oC; 71,25 dk; 12,78 Ç/K oranı olarak verilmiştir. Ultrasonik banyo etkisinin sonuçları dikkate alındığında, sıcaklık ve sürenin yüksek değerlerde olması durumunda, ultrasonik probla ses ötesi dalga uygulamasının negatif etki yapacağı göz önüne alınmıştır. Probun düşük sıcaklıklarda etkin olması nedeni ile sıcaklık 30^oC'da sabit tutulmuş ve değişken olarak değerlendirilmemiştir. Prob uygulamalarında en önemli etkenin enerji yoğunluğu olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kontrol edilmesi gereken temel parametreler süre ve güç olarak karşımıza çıkmaktadır. Gücü tanımlayan temel değişkenler ise genlik (amplitude: ultrasonik şiddetin ne kadarlık

% oranda verildiği) ve probun ses ötesi dalga uygulama süresinin ne kadarında çalışıp ne kadarında çalışmayacağını belirleyen görev döngüsü/duty cycle kavramıdır.

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi, ultrasonik probun dalga yayan yüzeyinin yakınlarında maksimum ultrasonik güç bulunmaktadır. Proba olan uzaklık arttıkça ultrasonik yoğunluk (etki) azalmaktadır. Bu nedenle prob pozisyonu da bir diğer değişken olarak seçilmiştir. MeOH'ün çalışma aralığı belirlenirken, bir önceki optimizasyon çalışmasının verisi orta nokta olacak şekilde alınmış, maksimizasyonu en optimum yapacak aralık seçilmiştir. En temel kısıtlar ise ultrasonik prob cihazından kaynaklanmıştır.

Deneysel tasarımda, D-optimal tasarım çalışılmıştır. D optimal tasarım, belirtilen model katsayılarının tahminiyle ilgili varyansı en aza indirecek şekilde dizayn noktaları seçmek için geliştirilmiştir. Bir D-optimal tasarım, $(X'X)^{-1}$ matrisinin determinantını en aza indirmektedir. Bu durum katsayılar için güven elipsoidinin hacmini en aza indirecektir. 5 faktör için, kuadretik modelde köşe faktöriyel noktaları, kenarların merkezleri, kısıtlanmış düzlemsel ağırlık merkezleri, eksenel kontrol karışım noktaları, iç noktalar, tüm ağırlık merkezleri hesaplanmış ve 31 noktalı tasarım yapılmıştır.

Çizelge 5.9 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı.

Sıralama ve Seviyeleri		
Faktörler (Bağımsız Değişkenler)	**+1**	**-1**
A : Genlik (amplitude) %	89	32
B :Ses ötesi dalga(SÖD) uygulama süresi (Irridation zamanı) dk.	15	1
C : MeOH %	80	50
D : Prob pozisyonu (cm)	4	1,5
E : Görev döngüsü (duty cycle) %	1	0,3

İlk optimizasyon çalışmasında bağımlı değişken olarak;

y_1 : Toplam Fenol miktarı (GAE) mg/g yaprak

y_2 : Toplam Fenol miktarı (OLE eşd.) mg/g yaprak

y_3 : Oleuropein miktarı (HPLC) mg/g yaprak

belirlenmiştir.

5.2.1 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonunda üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım

Çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5.10 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonu üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları

Std	Run	Faktör1 A:Genlik, %	Faktör2 B: SÖD uyg.süresi, dk	Faktör3 C:MeOH %	Faktör4 D:Prob pozisyonu, cm	Faktör5 E:Görev Döngüsü %	Cevap 1 T. Fenol (GAE). mg/g yaprak	Cevap 2 T. Fenol (OLE eşd) mg/g yaprak	Cevap 3 Oleuropein HPLC mg/g yaprak
1	20	32(-1)	8(0)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	4,28	1,8	0,9
2	10	89(1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	22	10	5,6
3	8	32(-1)	15(+1)	80(+1)	4,0(+1)	1,0(+1)	13	6	3,2
4	2	89(+1)	15(+1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	6,6	2,6	1,36
5	16	60,5(0)	15(+1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	4,8	2,06	1,2
6	19	32(-1)	8(0)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	2,8	1,08	0,4
7	3	89(1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1,0(+1)	6	2,4	1,1
8	25	60,5(0)	1(-1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	7,8	3	1,2
9	30	89(+1)	1(-1)	80(+1)	4,0(+1)	0,65(0)	5,6	2,2	0,96
10	26	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	5,2	2	0,82
11	11	32(-1)	15(1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	8	3,4	1,60
12	17	32(-1)	8(0)	80(+1)	4,0(+1)	0,3(-1)	6,6	2,68	1,26
13	6	32((-1)	1(-1)	65(0)	4,0(+1)	1,0(+1)	2	0,7	0,26
14	18	60,5(0)	15(1)	50(-1)	1,5(-1)	1,0(+1)	3,8	2,6	1,3
15	28	89(+1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1,0(+1)	5,2	2	0,94
16	15	89(+1)	15(1)	80(+1)	4,0(+1)	0,3(-1)	8,6	3,7	1,88
17	24	89(+1)	15(1)	80(+1)	4,0(+1)	1,0(+1)	15	6,88	3,48
18	1	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	9,2	3,66	2,0
19	7	32(-1)	15(1)	50(-1)	4,0(+1)	0,3(-1)	3,2	1,34	0,6
20	4	60,5(0)	1(-1)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	10,1	4,0	2,0
21	9	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	4,0(+1)	0,3(-1)	5,0	2,0	0,7
22	27	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	6,1	2,1	0,9
23	23	89(1)	15(1)	50(-1)	4,0(+1)	0,3(-1)	3,8	1,6	0,72
24	29	32(-1)	8(0)	80(+1)	4,0(+1)	0,3(-1)	12	5,0	2,2
25	22	89(1)	15(1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	17	7,2	3,8
26	14	32(-1)	8(0)	50(-1)	4,0(+1)	1,0(+1)	3,8	1,6	0,76
27	13	89(1)	1(-1)	80(+1)	4,0(+1)	0,65(0)	9,0	3,6	1,54
28	12	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	2,06	0,76	0,33
29	31	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	4,66	1,7	0,7
30	21	89(+1)	15(1)	50(-1)	4,0(+1)	1,0(+1)	19	8,84	6,8
31	5	89(+1)	1(-1)	65(0)	1,5(-1)	0,3(-1)	5,0	1,8	1,1

5.2.1.1 Cevap Faktörü 1:Toplam fenol (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve toplam fenol (GAE) cevap faktörü için sonuçlar çizelge 5.11'de verilmiştir.

Çizelge 5.11 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda, toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri, (P) > F**	
Model	162,09	20	8,10	3,51	**0,0229**	**geçerli**
A-Genlik	28,46	1	28,46	12,31	**0,0056**	
B-SÖD uyg.süresi	7,40	1	7,40	3,20	0,1038	
C-MeOH	23,66	1	23,66	10,23	**0,0095**	
D-Prob pozisyonu	0,54	1	0,54	0,23	0,6405	
E-Görev döngüsü	9,39	1	9,39	4,06	0,0716	
AB	12,54	1	12,54	5,43	**0,0421**	
AC	3,71	1	3,71	1,60	0,2340	
AD	18,35	1	18,35	7,94	**0,0183**	
AE	18,84	1	18,84	8,15	**0,0171**	
BC	8,45	1	8,45	3,66	0,0849	
BD	4,46	1	4,46	1,93	0,1952	
BE	2,30	1	2,30	0,99	0,3424	
CD	7,96	1	7,96	3,44	0,0932	
CE	1,15	1	1,15	0,50	0,4959	
DE	3,44	1	3,44	1,49	0,2505	
A^2	0,76	1	0,76	0,33	0,5782	
B^2	1,885	1	$1,885\ 10^{-3}$	8,152	0,9778	
C^2	5,20	1	5,20	2,25	0,1647	
D^2	14,91	1	14,91	6,45	**0,0294**	
E^2	16,76	1	16,76	7,25	**0,0226**	
Arta Kalan	23,12	10	2,31			
UyumEksikliği	13,26	5	2,65	1,34	**0,3765***	**g.değil**
Hata	9,86	5	1,97			
Düzeltilmiş top.	185,21	30				

Önemli Model Terimleri	**A, B, C, E, AB, AD, AE, D^2, E^2**
R^2 = 0,8752	R^2_{Adj} = 0,6255

Uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.11'de verilmiştir.

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8752 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 87,5 açıklanabileceğini göstermektedir.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,3765 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda genlik, SÖD uygulama süresi, MeOH, prob pozisyonu ve görev döngüsünün toplam fenol miktarına (GAE) etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları çizelge 5.11'de verilmiştir. Tasarım kullanılarak 31 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=+2,94+1,33A+0,62B+1,03C-0,16D+0,64E+0,89AB-0,54AC-1,21AD+1,23AE+ 0,67BC+0,53BD+0,40BE-0,69CD-0,27CE+0,50DE-0,52A^2-0,027B^2+1,70C^2+2,66D^2-2,97E^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/GallikAsit}$==+21,551+0,183A-0,861B-0,755C-6,274D+24,790E+4,458.10^{-3}AB-1,256.10^{-3} AC-0,034AD+0,123AE+6,406.10^{-3}BC+0,061BD+0,162BE-0,037CD-0,051CE+1,145DE– 6,386.10^{-4} A^2-5,507.$10^{-4}$$B^2$+7,564.$10^{-3}$$C^2$+1,703$D^2$-24,283$E^2$

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

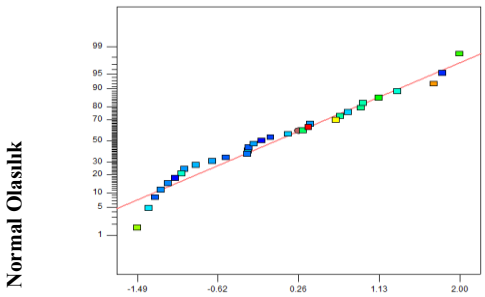
Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$= =+2,94+1,33A+1,03C+ 0,89AB-1,21 AD+1,23AE+2,66D^2-2,97E^2

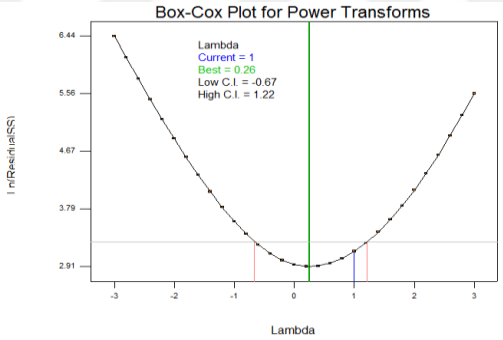
Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$=21,551+0,183A-0,755CMeOH+4,458.10^{-3}AB -0,034AD +0,123AE +1,703D^2-24,283E^2

Cevap faktörü 1, Toplam Fenol (GAE)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğunu tespit etmek amacı çizilmiş olup şekil 5.29' da verilmiştir

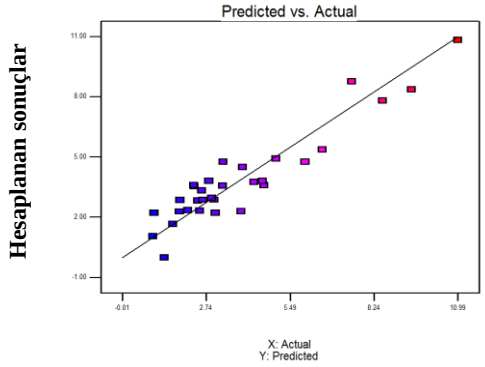


Şekil 5.29 Toplam Fenol miktarı (GAE) maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği



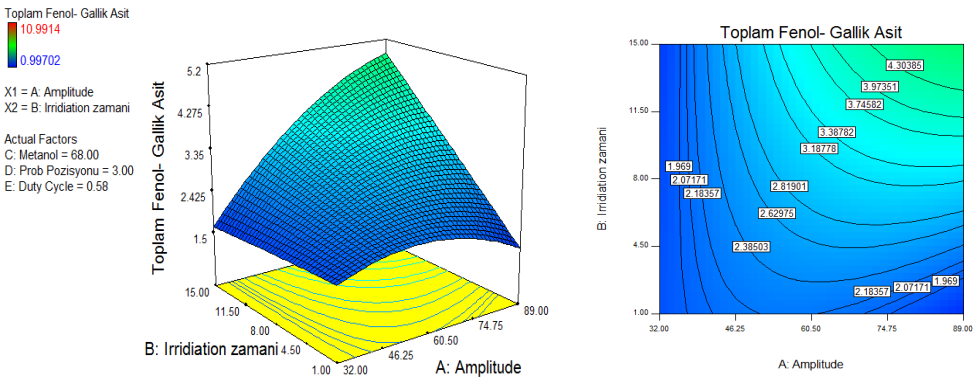
Şekil 5.30 Box-Cox grafiği

Şekil 5.30'da verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,28 bulunmuş ve çalışmanın cevap değeri için çalışmanın % 95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.31'de verilmiştir.

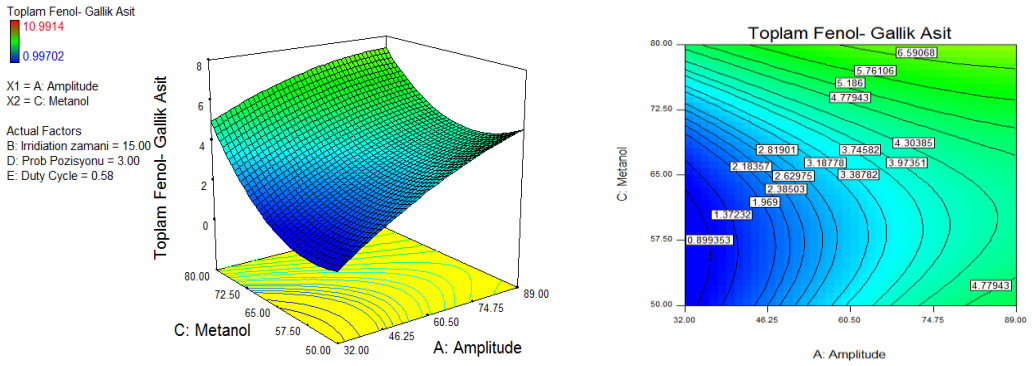


Şekil 5.31 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaş tırılması

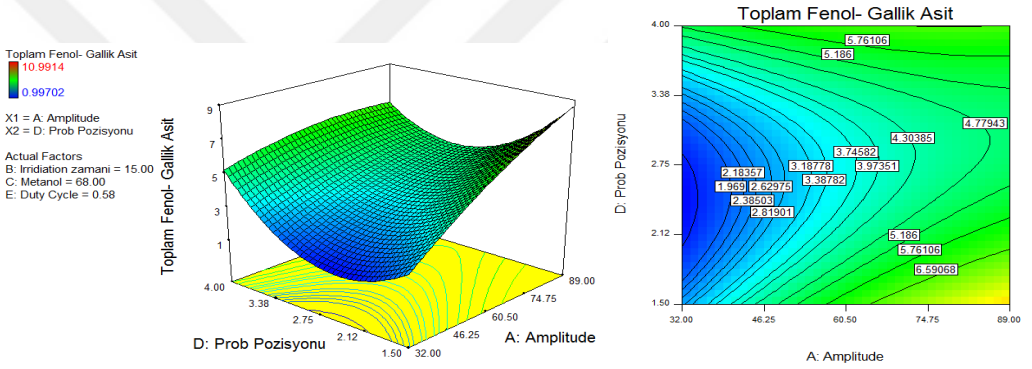
Model denkleminde genlik ve MeOH'ün önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uygulama süresi, genlik/prob pozisyonu, genlik/görev döngüsü arasındaki ilişkinin ve prob pozisyonu ve görev döngüsü'ün karesinin etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin Toplam fenol (GAE) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



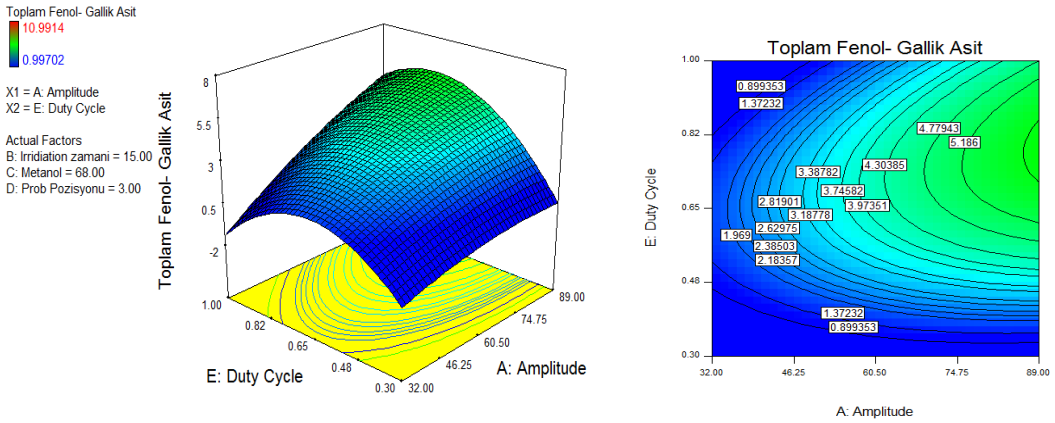
Şekil 5.32 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)=+2.94+1.33 A+0.62 B+0.89 AB-0.52 A^2-0.027 B^2



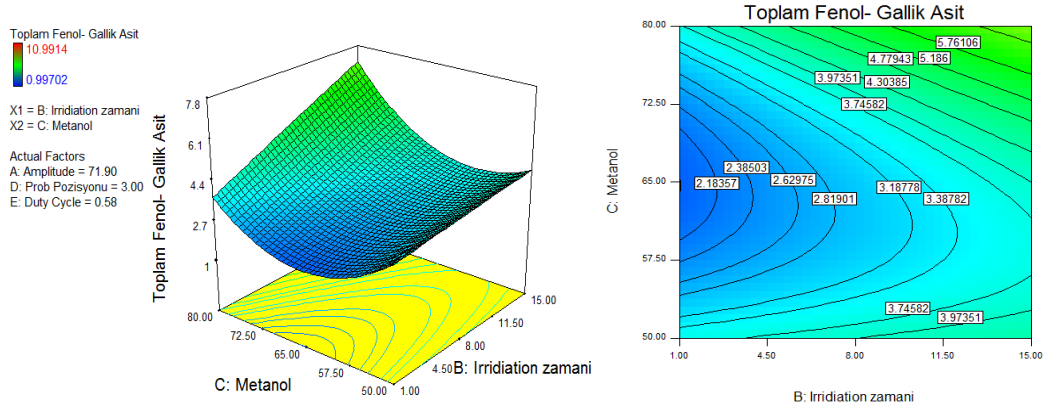
Şekil 5.33 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x) =+2.94+1.33 A +1.03C -0.54 A C -0.52A^2 +1.70C^2



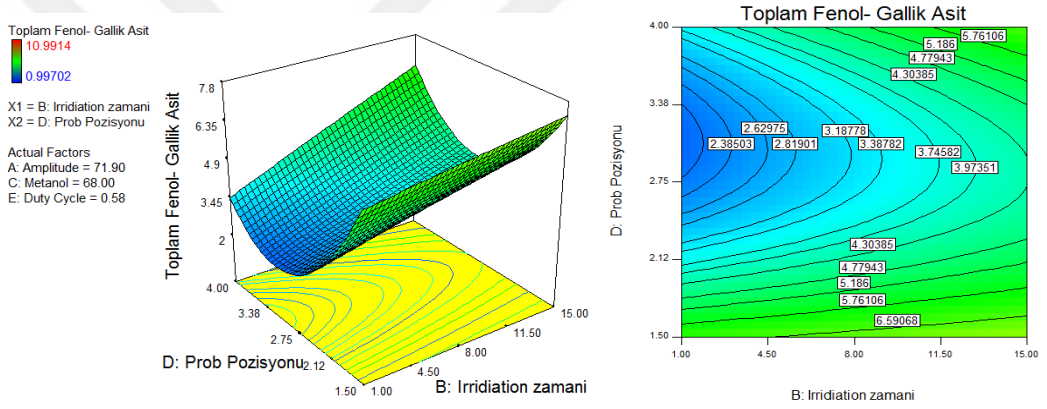
Şekil 5.34 Genlik-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ = f(x) = +2.94 +1.33A -0.16D -1.21AD -0.52A^2 +2.66D^2



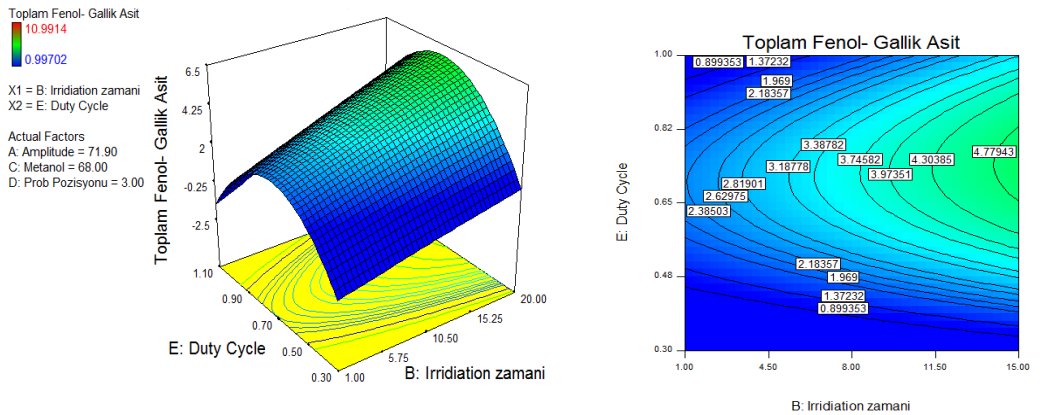
Şekil 5.35 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x) =+2.94+1.33 A +0.64 E +1.23AE -0.52A^2-2.97E^2



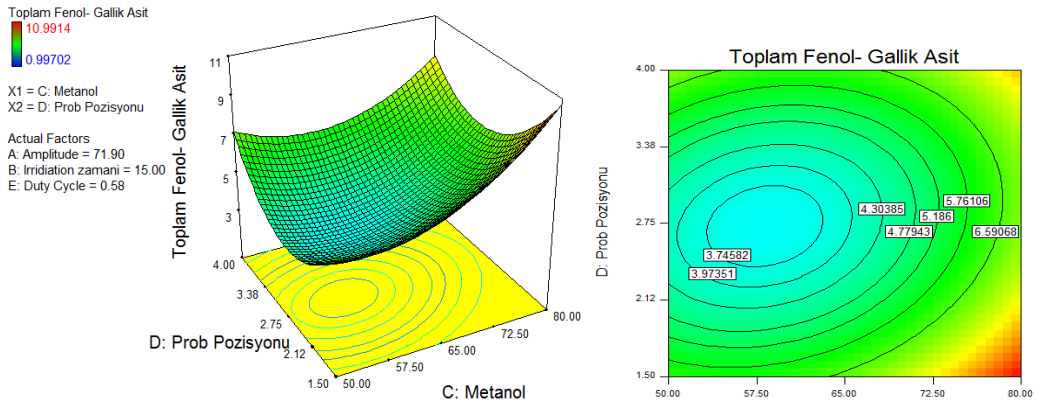
Şekil 5.36 SÖD uygulama süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x) =+2.94 +0.62B +1.03C- +0.67BC -0.027B^2+1.70 C^2



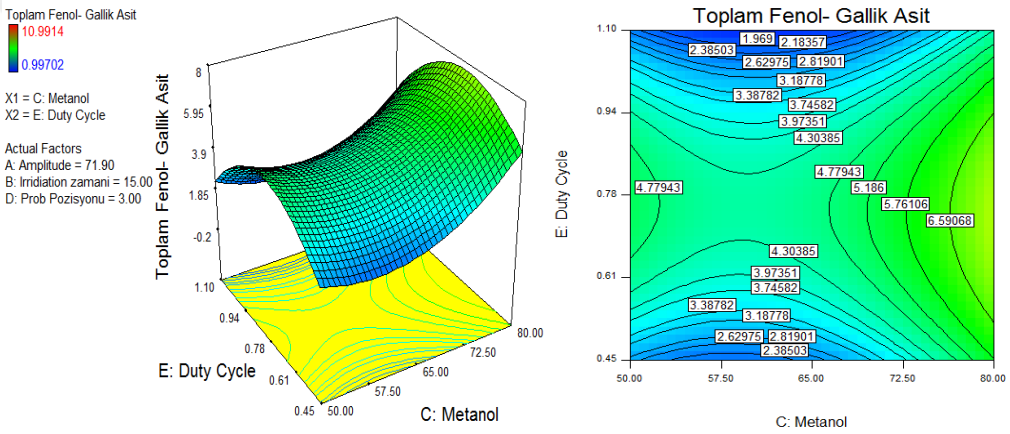
Şekil 5.37 SÖD uygulama süresi-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x) = +2.94 +0.62B -0.16 D+0.53BD -0.027B^2 +2.66D^2



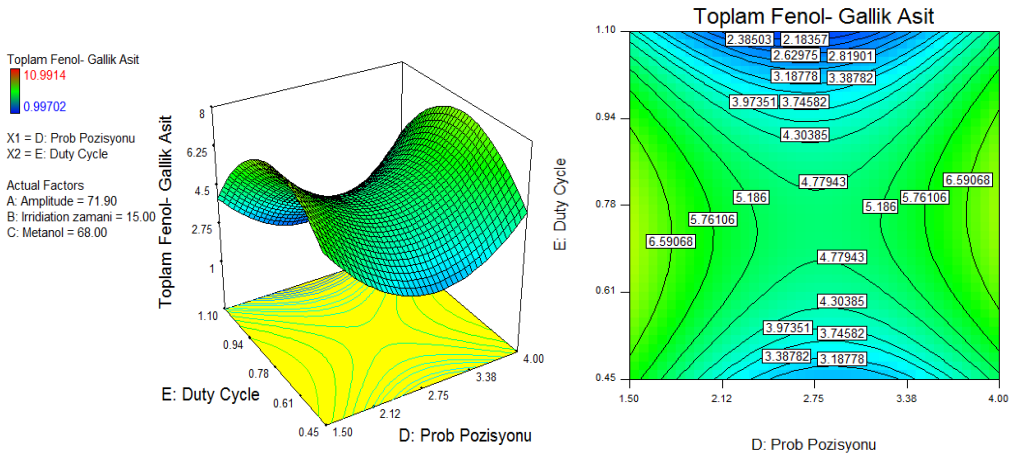
Şekil 5.38 SÖD uygulama süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)=+2.94 +0.62B +0.64E +0.40BE -0.027 B^2 -2.97 E^2



Şekil 5.39 MeOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x) =+2.94 +0.62 B +0.64 E +0.40 B E -0.027 B^2 -2.97 E^2



Şekil 5.40 MeOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= =+2.94 +0.62 B +0.64 E +0.40 BE -0.027B^2 -2.97E^2



Şekil 5.41 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +2.94 -0.16 D+0.64 E+0.50D E +2.66 D^2-2.97 E^2

Şekil 5.32’ de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-SÖD uygulama süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için p değeri (0,0421) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Genlik cevap faktörüne etki ederken SÖD uyg.süresinın anlamlı bir etkisi görülmemektedir. Şekil 5.33’ de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (genlik-MeOH) için p değeri 0,2340 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-MeOH arasınndaki yüzey profili bize bir minimum bölge oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.34’ de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik/prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AD (genlik/prob pozisyonu) için p değeri 0,0183 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Genlik/prob pozisyonu arasındaki yüzey profili bize minimum bölge olduğunu göstermektedir. Şekil 5.35’de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-görev döngüsü arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri 0,0171 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde plato görüntüsü ve maksimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.36’da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (SÖD uyg.süresi-MeOH) için p değeri 0,0849 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Şekil 5.37’ de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu) için p değeri 0,1952 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölgesinde minimum gözlenmiştir. Şekil 5.38’ de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BE (SÖD uyg.süresi-görev döngüsü) için p değeri 0,3424 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölgesinde maksimumn etki gözlenmiştir. Şekil 5.39’ da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-prob pozisyonu arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artış göstermektedir. Modelde CD (MeOH/prob pozisyonu) için p değeri 0,0932 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.40’ da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş

göstermektedir. Modelde CE (MeOH-görev döngüsü) için p değeri 0,4959 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etkisi gözlenmiştir. Şekil 5.41' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği prob pozisyonu-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış yada düşüş göstermektedir. Modelde DE (prob pozisyonu -görev döngüsü) için p değeri 0,2505 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etkisi gözlenmiştir.

5.2.1.2 Cevap Faktörü 2:Toplamfenol (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve toplam fenol (OLE) cevap faktörü için uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.12'de verilmiştir.

Çizelge 5.12 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi, df	Ortalamanın karesi	F Değeri	p-Değeri, (P) > F	
Model	36,07	20	1,80	4,20	**0,0119**	**geçerli**
A-Genlik	5,71	1	5,71	13,32	**0,0045**	
B-SÖD uyg. süresi	2,45	1	2,45	5,72	**0,0378**	
C-MeOH	4,38	1	4,38	10,21	**0,0096**	
D-Prob pozisyonu	0,065	1	0,065	0,15	0,7043	
E-Görev döngüsü	2,59	1	2,59	6,05	**0,0337**	
AB	2,57	1	2,57	5,98	**0,0345**	
AC	0,75	1	0,75	1,74	0,2161	
AD	3,35	1	3,35	7,81	**0,0190**	
AE	4,06	1	4,06	9,46	**0,0117**	
BC	1,67	1	1,67	3,90	0,0766	
BD	0,88	1	0,88	2,06	0,1816	
BE	0,70	1	0,70	1,64	0,2297	
CD	1,67	1	1,67	3,89	0,0770	
CE	0,19	1	0,19	0,45	0,5185	
DE	0,67	1	0,67	1,57	0,2383	

Çizelge 5.12 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları (devam)

A^2	0,10	1	0,10	0,24	0,6375	
B^2	1,329 10^{-3}	1	1,32910^{-3}	3,246 10^{-3}	0,9557	
C^2	0,85	1	0,85	1,98	0,1896	
D^2	3,14	1	3,14	7,31	**0,0222**	
E^2	3,07	1	3,07	7,16	**0,0233**	
Arta Kalan	4,29	10	0,43			
UyumEksikliği	2,62	5	0,52	1,58	**0,3150***	**g.değil**
Hata	1,67	5	0,33			
Düzeltilmiş top.	40,36	30				

Önemli Model Terimleri	**A, B, C, E, AB, AD, AE, D^2, E^2**
R^2: 0,8937	R^2_{Adj} : 0,6812

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8937 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile %89,37 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin toplam fenol (OLE) tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,3150 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda genlik, SÖD uyg. süresi, MeOH, prob pozisyonu ve görev döngüsü'ın toplam fenol (OLE) miktarına etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları çizelge 5.12'de verilmiştir. Tasarım kullanılarak 31 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=+1,18+0,59A+0,36B+0,44C-0,056D + 0,34E+0,40AB-0,24AC-0,52AD+0,57 AE +0,30BC+0,24BD + 0,22BE -0,32CD - 0,11CE+0,22 D E-0,19A^2 -0,023B^2 +0,69C^2 +1,22 D^2 -1,27E^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=+8,79+0,072A-0,38B-0,29C-2,91D+10,24E+2,0210^{-3}AB–5,64610^{-4}AC–0,014 AD+0,057AE+2,8410^{-3}BC+0,027BD+0,089BE–0,017CD-0,021CE+0,507DE-2,3210^{-4}A^2-4,73 10^{-4}B^2 + 3,0610^{-3}C^2+ 0,78D^2 –10,39E^2

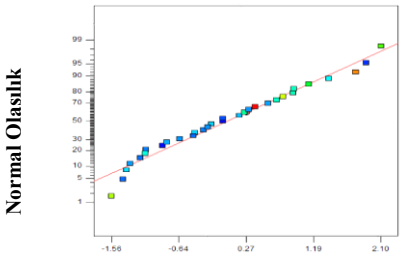
Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

Kodlanmış değerlerle;
$Y_{T.Fenol/oleuropein}$= =+1,18+0,59A+0,36 B+0,44C +0,34E+0,40AB -0,52AD+0,57AE +1,22D^2-1,27E^2

Gerçek Değerlerle;

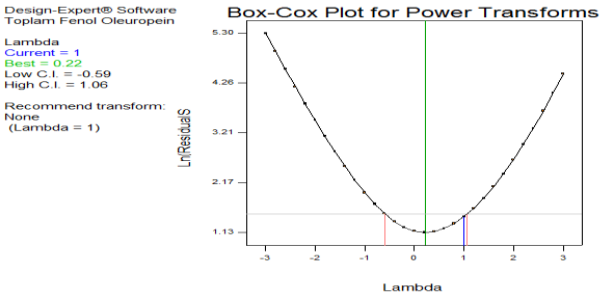
$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=+8,80+0,08 A-0,38132 B-0,297C +10,25E + 2,0210^{-3}AB - 0,015AD +0,062AE + 0,78D^2 -10,39E^2

Cevap faktörü 2 -Toplam Fenol (OLE eşd.)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.42' de verilmiştir.



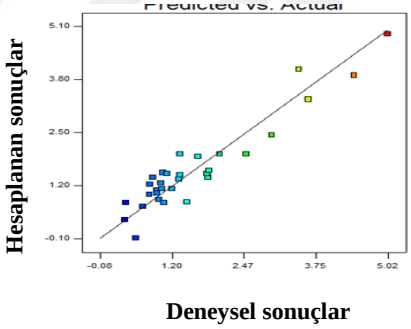
Şekil 5.42 Toplam Fenol (OLE eşd) miktarı maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği

Hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek için normal olasılık (dağılım) grafiğinden yararlanılmıştır.



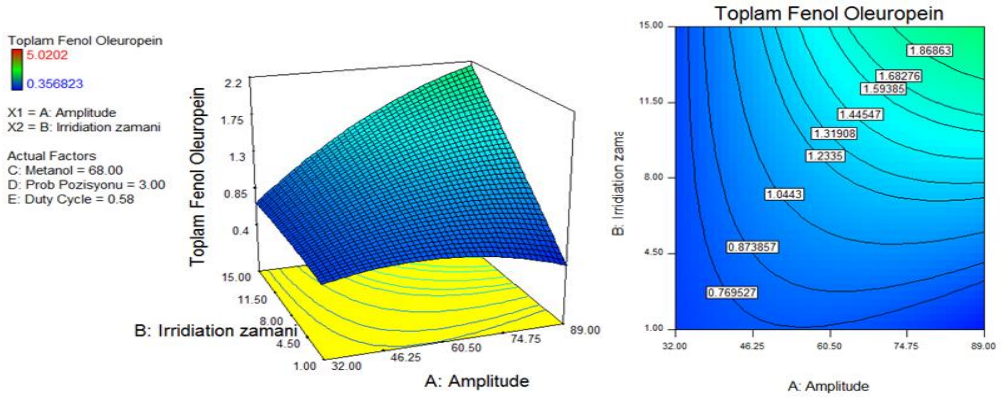
Şekil 5.43 Box-Cox grafiği

Şekil 5.43'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,23 bulunmuş ve çalışmanın cevap değeri için çalışmanın % 95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.44'de verilmiştir.

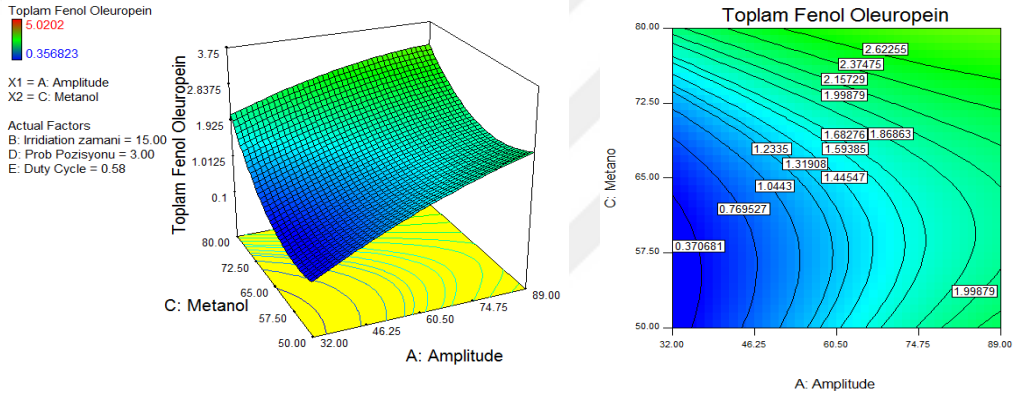


Şekil 5.44 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaş tırılması

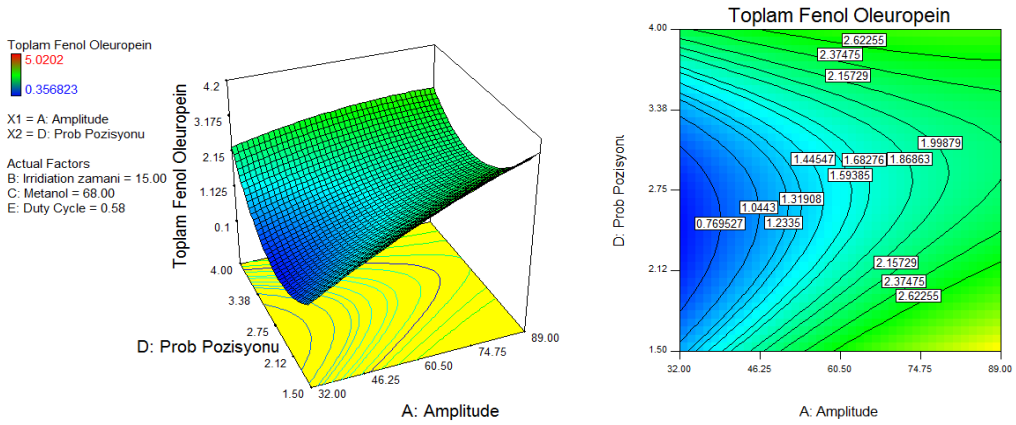
Model denkleminde genlik, SÖD uyg.süresi, MeOH ve görev döngüsü'nün önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uyg.süresi, genlik/prob pozisyonu, genlik/görev döngüsü arasındaki ilişkinin ve prob pozisyonu ve görev döngüsü'ın karesinin etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin Toplam fenol (OLE) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



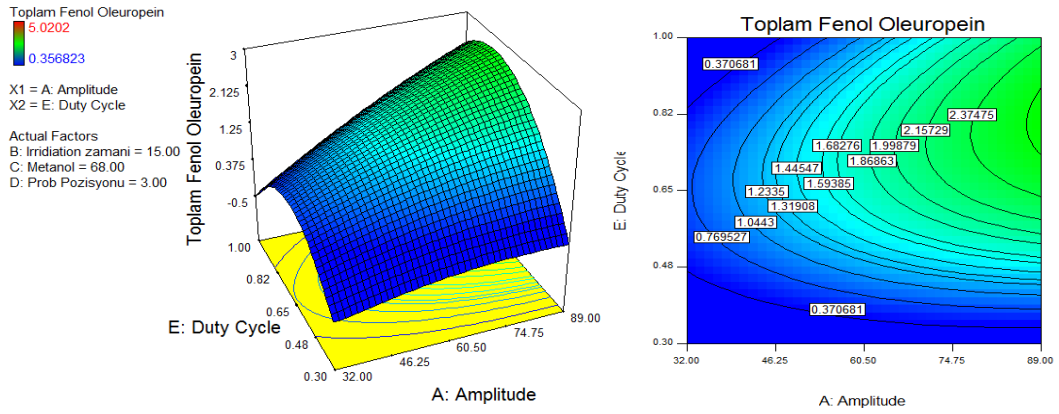
Şekil 5.45 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/oleuropein}$= +1.18+0.59 A+0.36 B+0.40AB-0.19A^2-0.023B^2



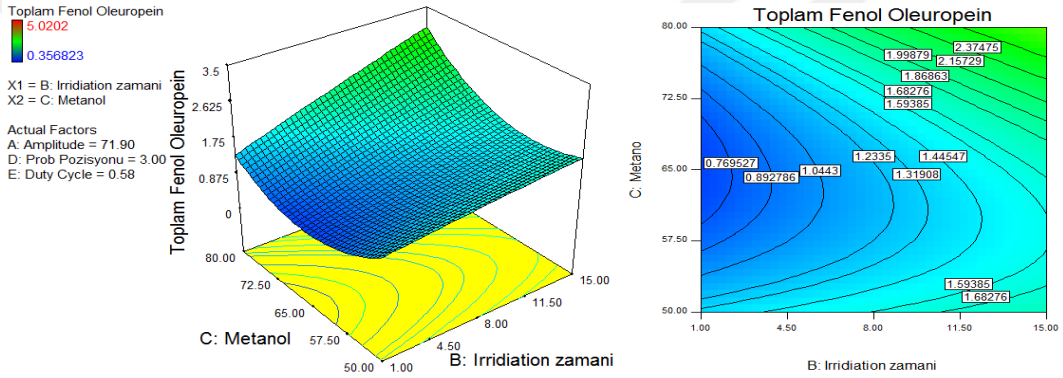
Şekil 5.46 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropeint}$ =f(x)= +1.18+0.59 A+0.44 C-0.24 A C-0.19A^2+0.69 C^2



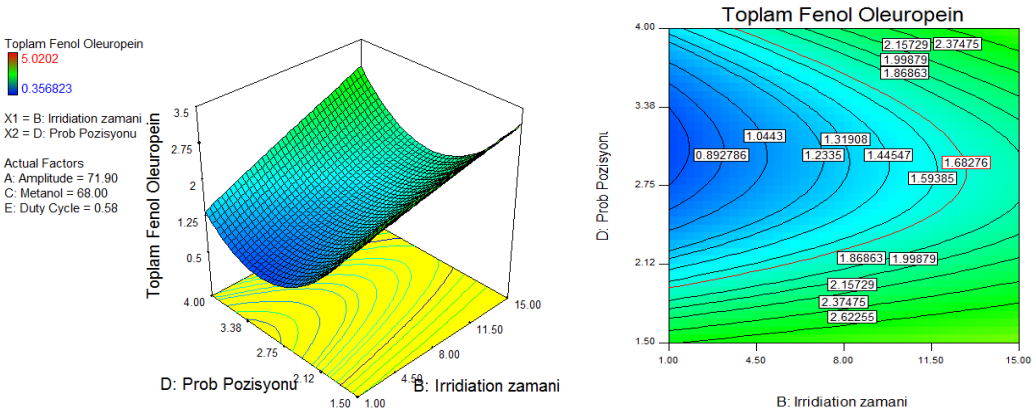
Şekil 5.47 Genlik-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x) =+1.18 + 0.59A-0.056D -0.52 AD -0.19 A^2+1.22D^2



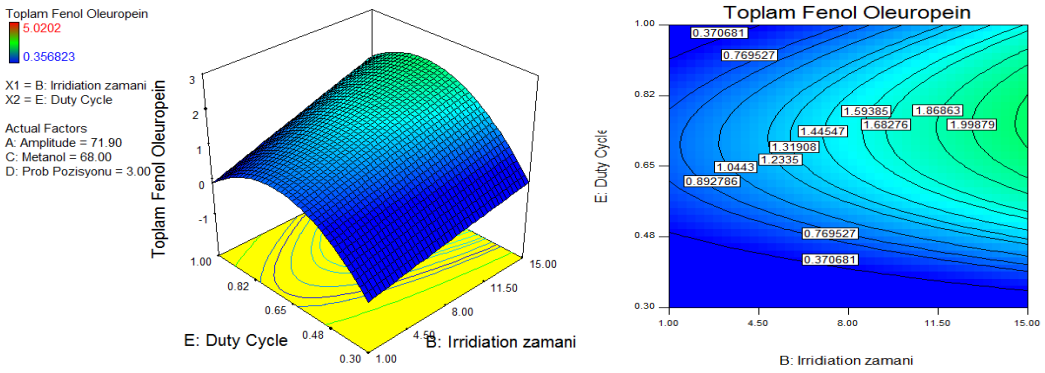
Şekil 5.48 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/oleuropein}$ =f(x)=+1.18+0.59 A +0.34E +0.57A* E -0.19A^2 -1.27E^2



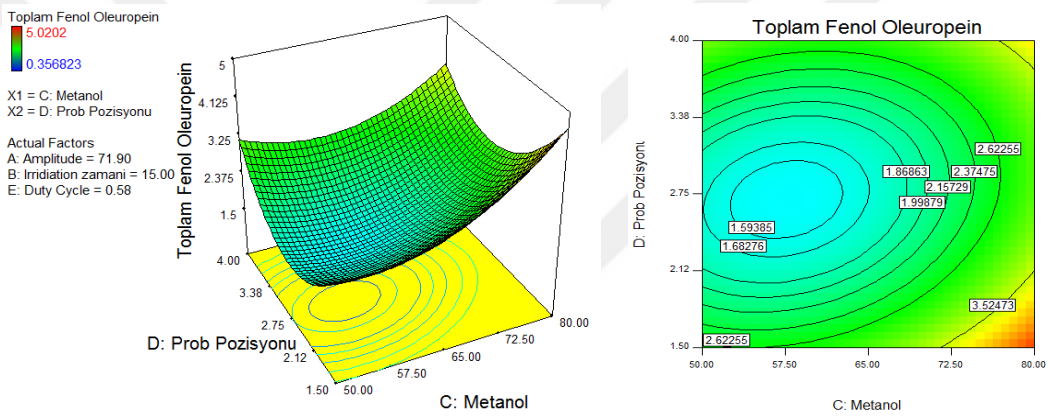
Şekil 5.49 SÖD uyg. süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerl eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/oleuropein}$ =f(x)= +1.18 +0.36 B +0.44C +0.30BC -0.023B^2 +0.69C^2



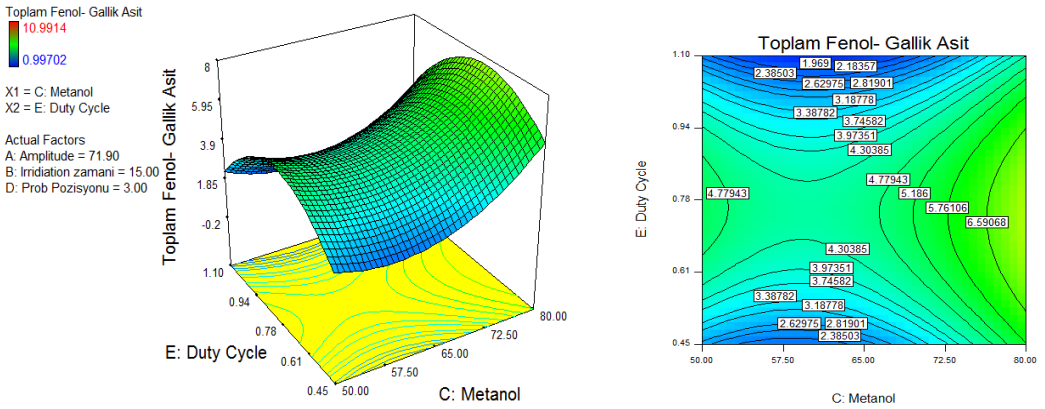
Şekil 5.50 SÖD uyg. süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +1.18+0.36B -0.056 D+0.24BD-0.023 B^2 +1.22D^2



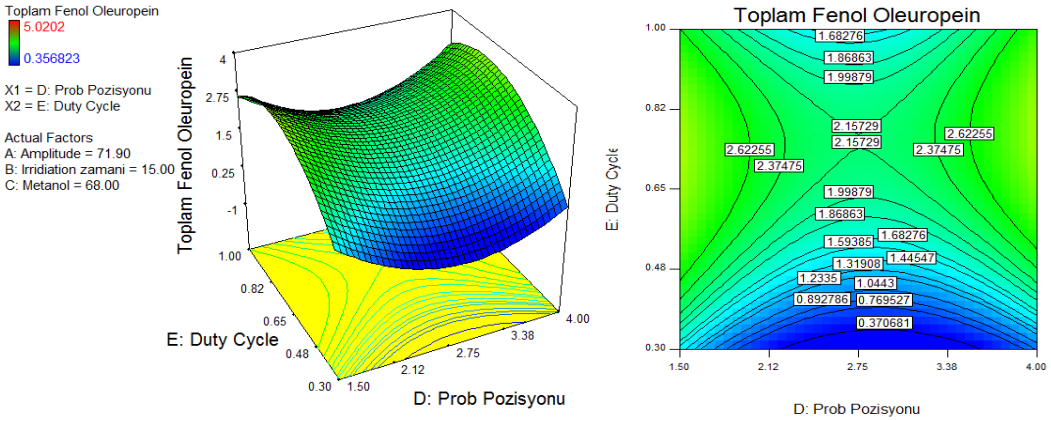
Şekil 5.51 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=f(x)= +1.18+0.36 B +0.34 E +0.22 B E -0.023 B^2 -1.27 E^2



Şekil 5.52 MeOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +1.18+0.44 C-0.056 D -0.32 CD+0.69 C^2+1.22 D^2



Şekil 5.53 MeOH- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +1.18 + 0.44 C- +0.34 E -0.11C E +0.69 C^2-1.27 E^2



Şekil 5.54 Prob pozisyonu- görev döngüsü iki faktörlü modeli için,kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)=+1.18--0.056D+0.34E+0.22DE+1.22D^2-1.27E^2

Şekil 5.45'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-SÖD uyg.süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için p değeri 0,0345 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Genlik cevap faktörüne etki ederken SÖD uyg.süresinın anlamlı bir etkisi görülmemektedir. Şekil 5.46' da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (genlik-MeOH) için p değeri 0,2161 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-MeOH arasınndaki yüzey profili bize bir minimum bölge oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.47'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AD (genlik-prob pozisyonu) için p değeri 0,0190 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Genlik-prob pozisyonu arasındaki yüzey profili bize minimum bölge olduğunu göstermektedir. Şekil 5.48'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri 0,0117 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde plato görüntüsü ve maksimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.49'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (SÖD uyg.süresi-MeOH) için p değeri 0,0766 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, minimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.50'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi- prob pozisyonu) için p değeri 0,1816

hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.51'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BE (SÖDuyg.süresi-görev döngüsü) için hesaplanan p değerinin 0,2297 olaması da bunu desteklemektedir. Yüzey profilinde, plato bölge maksimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.52'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-prob pozisyonu arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artış göstermektedir. Modelde CD (MeOH-prob pozisyonu) için p değeri 0,0770 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.53' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir. Modelde CE (MeOH-görev döngüsü) için p değeri 0,5185 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etki gözlenmiştir. Şekil 5.54' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği prob pozisyonu-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir. Modelde DE (prob pozisyonu-görev döngüsü) için p değeri 0,2383 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etki gözlenmiştir.

5.2.1.3 Cevap Faktörü 3:Oleuropein (HPLC) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve oleuropein (HPLC) cevap faktörü için sonuçlar ve uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.13'de verilmiştir.

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8816 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 88,16 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin oleuropein (HPLC) tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Çizelge 5.13 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda, oleuropein (HPLC) miktarı cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	15,00	20	0.75	3.72	0.0185	**geçerli**
A-Genlik	2,33	1	2.33	11.57	**0.0067**	
B-SÖD uyg.	1.24	1	1.24	6.14	**0.0326**	
C-MeOH	0.77	1	0.77	3.81	0.0795	
D-Prob pozisyonu	0.026	1	0.026	0.13	0.7287	
E-Görev döngüsü	1.19	1	1.19	5.92	**0.0352**	
AB	1.13	1	1.13	5.59	**0.0397**	
AC	0.55	1	0.55	2.71	0.1310	
AD	0.95	1	0.95	4.70	0.0554	
AE	1.68	1	1.68	8.32	**0.0163**	
BC	0.30	1	0.30	1.50	0.2488	
BD	0.56	1	0.56	2.76	0.1275	
BE	0.62	1	0.62	3.08	0.1098	
CD	1.16	1	1.16	5.77	**0.0372**	
CE	0.29	1	0.29	1.44	0.2578	
DE	0.43	1	0.43	2.12	0.1759	
A^2	$5.751.10^{-4}$	1	$5.751.10^{-4}$	$2.855.10^{-3}$	0.9584	
B^2	$1.425.10^{-5}$	1	$1.425.10^{-5}$	$7.074.10^{-5}$	0.9935	
C^2	0.14	1	0.14	0.71	0.4202	
D^2	1.58	1	1.58	7.86	**0.0187**	
E^2	1.29	1	1.29	6.42	**0.0297**	
Arta Kalan	2.01	10	0.20			
Uyum Eksikliği	1.62	5	0.32	4.09	0.0742	**g.değil**
Hata	0.40	5	0.079			
Düzeltilmiş top.	17.01	30				

Önemli Model Terimleri	**A, B, E, AB,AE,CD,D^2,E^2**
R^2 :0,8816	R^2_{Adj} : 0,6448

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,0742 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda genlik, SÖD uyg. süresi, MeOH, prob pozisyonu ve görev

döngüsü' nün oleuropeinin HPLC ile tayinine etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları çizelge 5.13'de verilmiştir. Tasarım kullanılarak 31 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{Oleuropein(HPLC)}$=+0,54+0,38A+0,25B+0,19C-0,035D+0,23E+0,27AB-0,21AC-0,27 A D +0,37 AE+0,13BC+0,19BD+0,21BE-0,26CD-0,13C E+0,18 DE-0,014A^2-2,345.$10^{-3}B^2$+0,28 C^2+ 0,87 D^2-0,83E^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=+2,45+0,03A–0,23B–0,07C–2,13D+7,06E+1,34.10^{-3}AB-4,82.10^{-4}AC–7,70 10^3AD+0,04AE+1,21.10^{-3}BC+0,02BD+0,08BE–0,014CD–0,025CE+0,40DE–1,75.$10^{-5}A^2$– 4,79.$10^{-5}B^2$+1,25.$10^{-3}C^2$+0,56D^2 – 6,74E^2

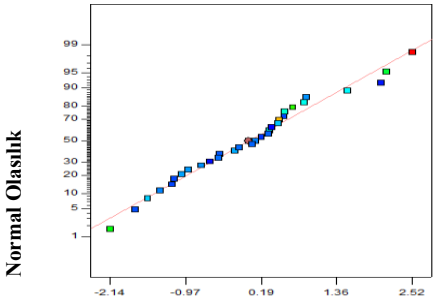
Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

Kodlanmış değerlerle;
$Y_{oleuropein(HPLC)}$=+0,54+0,38A+0,25B+0,23E+0,27 A B+0,37AE-0,26CD+0,87D^2-0,83E^2

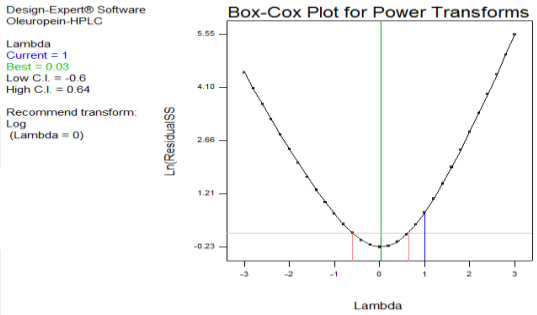
Gerçek Değerlerle;

$Y_{TOleuropein(HPLC)}$= +2,45+0,03A – 0,23B -2,13D +1,34.10^{-3}AB+ 0,04AE –0,014 CD+ 0,56 D^2- 6,74E^2

Cevap faktörü 3 Oleuropein (HPLC) miktarının maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.55'de verilmiştir.



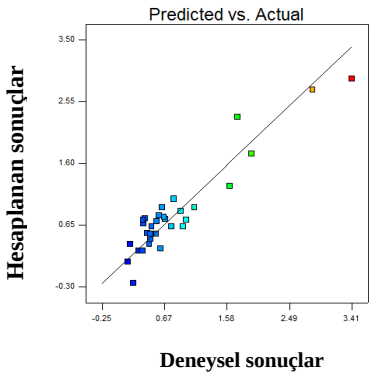
Şekil 5.55 Oleuropein (HPLC) miktarı maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 5.56 Box-Cox grafiği

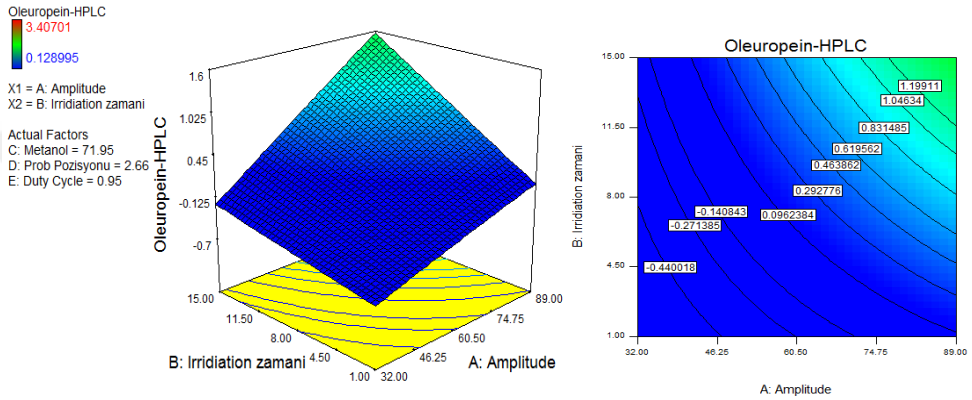
Şekil 5.56'da verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,03 bulunmuş ve çalışmanın cevap değeri için %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.57' de verilmiştir.

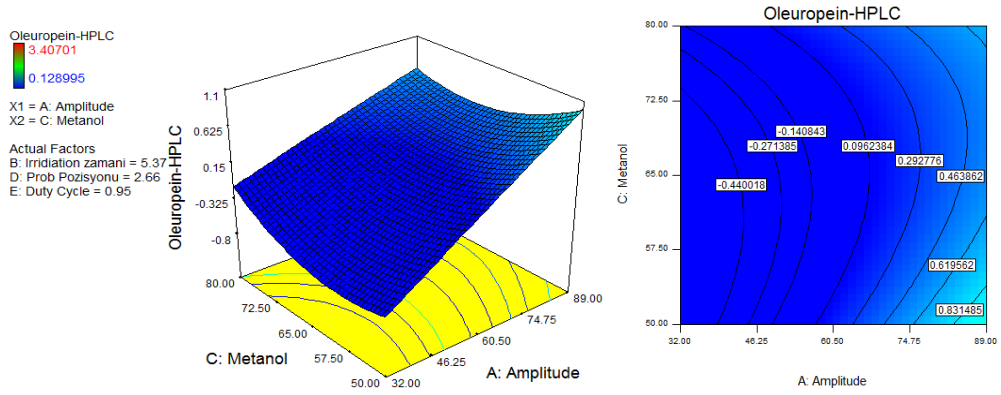


Şekil 5.57 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

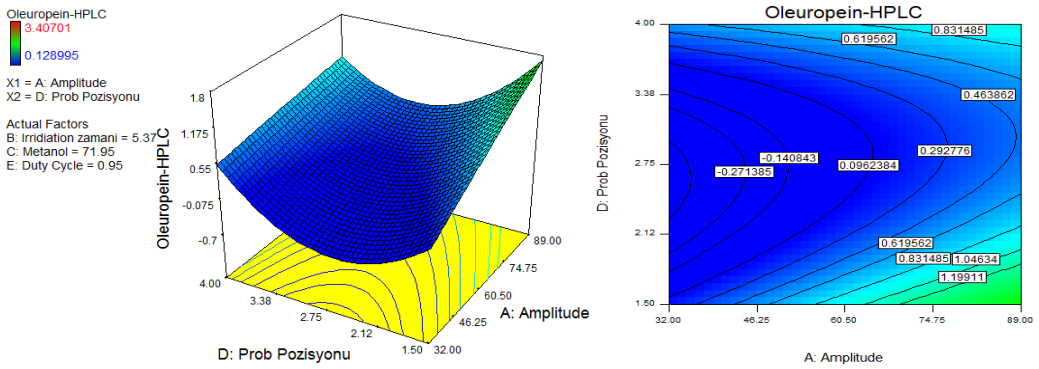
Model denkleminde genlik, SÖD uyg.süresi, ve görev döngüsü'nün önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uyg.süresi, genlik/prob pozisyonu, genlik/görev döngüsü, MeOH/ prob pozisyonu arasındaki ilişkinin ve prob pozisyonu ve görev döngüsü'nün karesel etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin oleuropein (HPLC) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



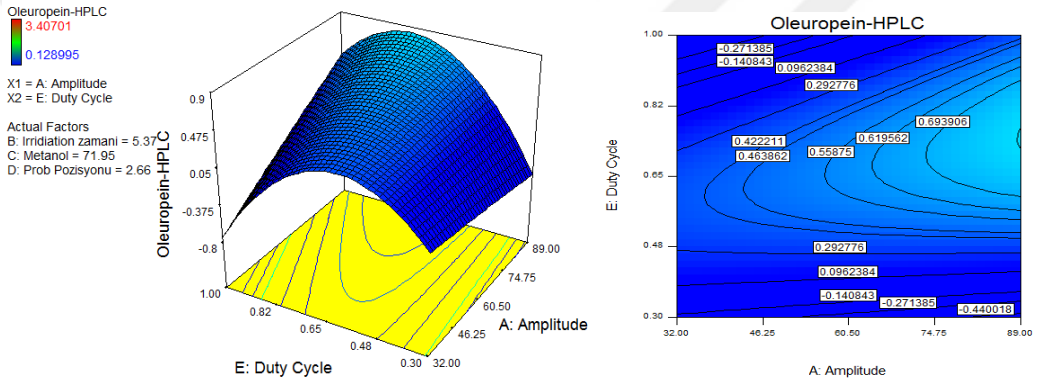
Şekil 5.58 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{oleuropein/HPLC}$= +0.54+0.38 A+0.25 B +0.27AB-0.014 A^2-2.345.10^{-3} B^2



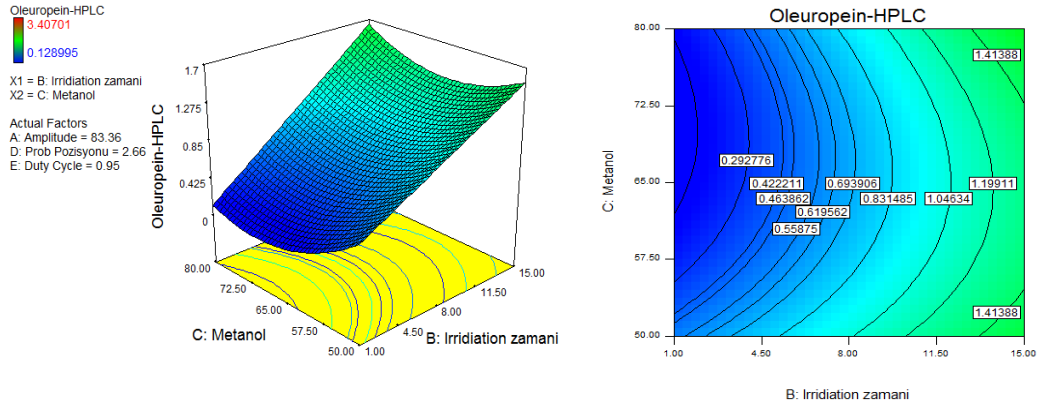
Şekil 5.59 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)= +0.54+0.38 A +0.19 C -0.21AC-0.014 A^2 +0.28C^2



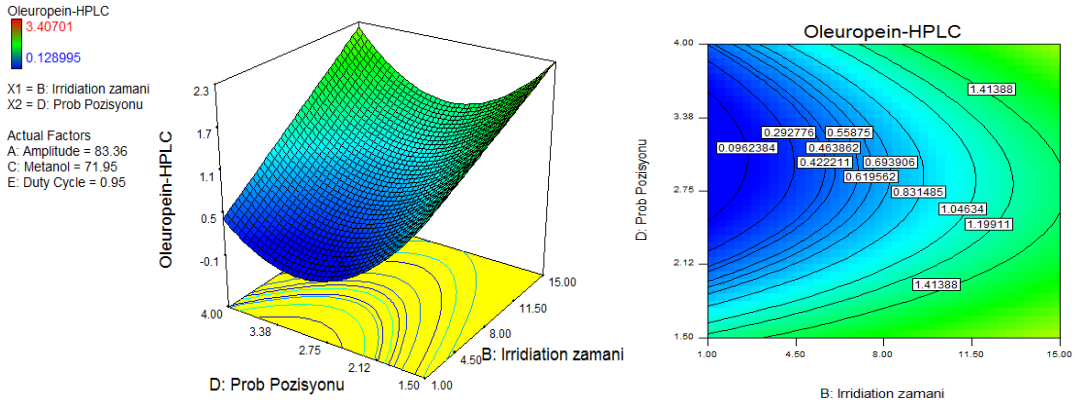
Şekil 5.60 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)= +0.54+0.38 A -0.035D-0.27AD-0.014A^2 +0.87D^2



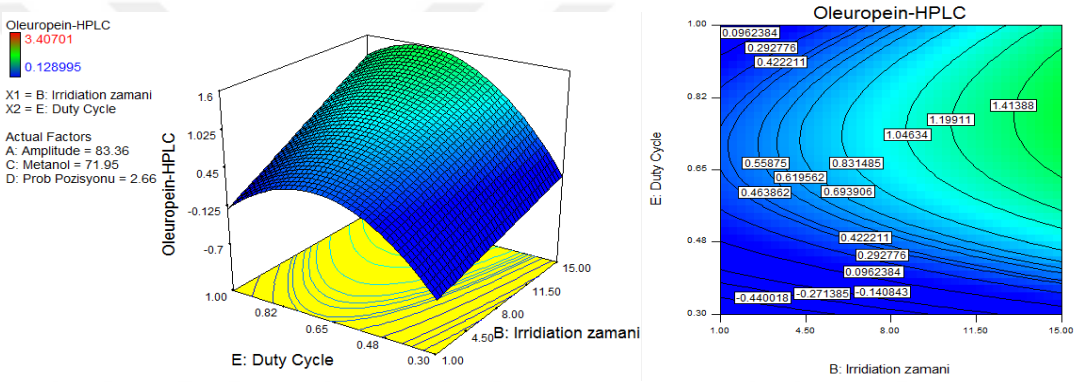
Şekil 5.61 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein/HPLC}$ =f(x)=+0.54+0.38A +0.23 E+0.37AE-0.014A^2- 0.83 E^2



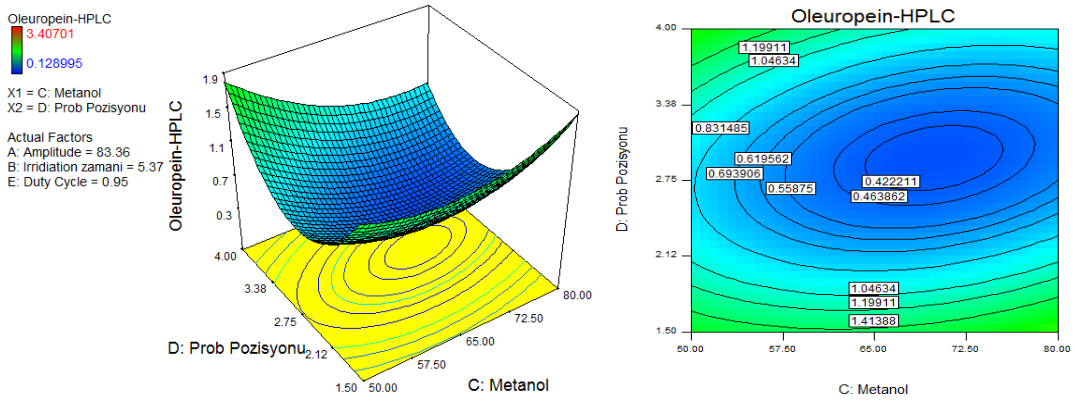
Şekil 5.62 SÖD uyg. süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)= +0.54 +0.25 B +0.19 C+0.13B C-2.345.10^{-3} B^2+0.28C^2



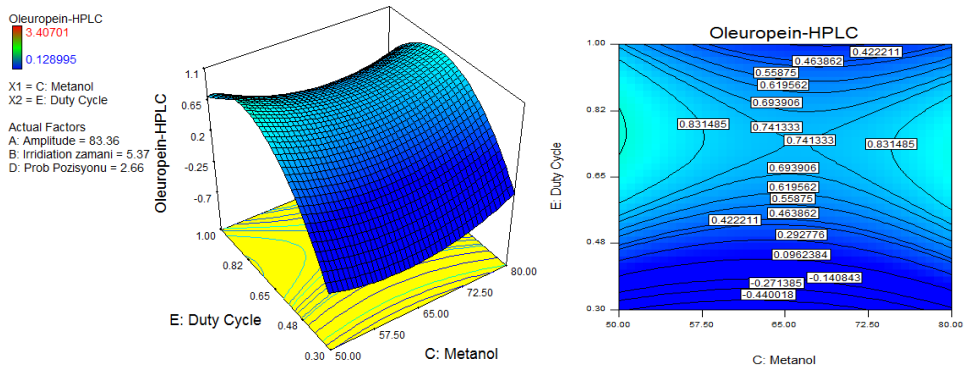
Şekil 5.63 SÖD uyg. süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)=+0.54+0.25 B -0.035D+0.19BD-2.34.10^{-3} B^2 +0.87D^2



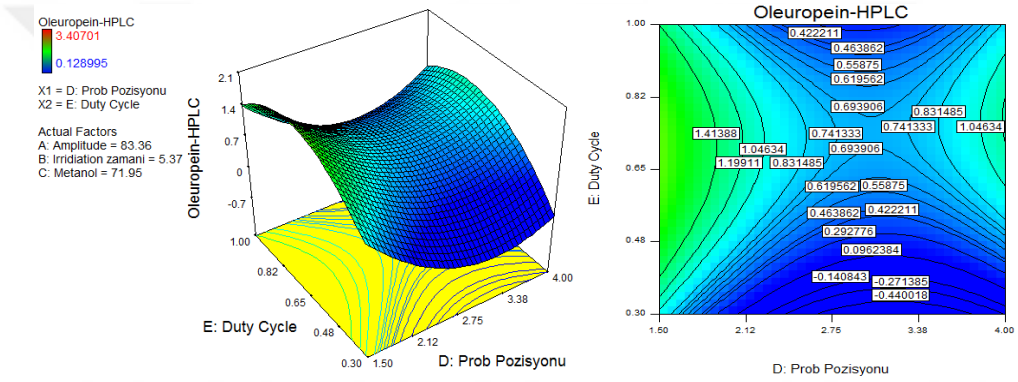
Şekil 5.64 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =$f(x)$=+0.54+0.25B+0.23E+0.21BE-2.345.$10^{-3}$$B^2$ -0.83E^2



Şekil 5.65 MeOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)= =+0.54 +0.19 C-0.035D -0.26 C D+0.28C^2+0.87D^2



Şekil 5.66 MeOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)= +0.54+0.19 C+0.23 E -0.13CE+0.28C^2+0.83 E^2



Şekil 5.67 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)=+0.54 -0.035D+0.23E+0.18DE +0.87 D^2-0.83 E^2

Şekil 5.58'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği ve aynı zamanda AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için hesaplanan p değerinin 0,0397 olması.genlik-SÖD uyg. süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Her ikisininde en yüksek olduğu noktalarda maksimum görülmektedir. Şekil 5.59' da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (genlik-MeOH) için p değeri 0,1310 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-MeOH arasınndaki yüzey profilinde minimum bölge oluştuğu görülmektedir. Şekil 5.60'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik/prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu (p değeri 0,0554) göstermektedir. Genlik/prob pozisyonu arasındaki yüzey profilinde plato bölge oluştuğu görülmektedir. Şekil 5.61' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-

görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Model denklemi ile uyumlu olup, AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri 0,0163 olarak hesaplanmıştır. Yüzey profilinde plato görüntüsü ve maksimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.62'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Model denklemi ile uyumlu olup, BC (SÖD uyg.süresi-MeOH) için p değeri 0,2488 olarak hesaplanmıştır. Yüzey profilinde, SÖD uyg.süresi anlamlı pozitif etki verirken MeOH etkisizdir ve minimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.63' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu) için p değeri 0,1275 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge, minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.64' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg. süresi-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BE (SÖD uyg.süresi- görev döngüsü) için p değeri 0,1098 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge maksimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.65' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-prob pozisyonu arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artış göstermektedir. Modelde CD (MeOH-prob pozisyonu) için p değeri 0,0372 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.66' da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir. Modelde CE (MeOH-görev döngüsü) için p değeri 0,2578 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etki gözlenmiştir. Şekil 5.67' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği prob pozisyonu-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir. Modelde DE (prob pozisyonu-görev döngüsü) için p değeri 0,1759 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etki gözlenmiştir.

5.2.1.4 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonda üç amaç fonksiyonlu optimizasyon çalışması

MeOH çözücü sistemi ile ultrasonik prob ekstraksiyonun, deneysel tasarım çalışmaları sonucu üç cevap faktörüne karşı alınan ANOVA sonuçlarında elde edilen yeterli kesinlik sonuçları çalışmanın yeterli veri ile tamamlandığını göstermektedir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranları her bir cevap fonksiyonu için (Toplam fenol-GAE; Toplam fenol-OLE; oleuropein miktarı-HPLC) sırası ile 8,648 ; 9,264 ve 8,522 dir. Bu değerler yeterli sinyale işaret etmektedir.

Kesinliğin yüksek olduğunu gösteren sonuçlar elde edildikten sonra optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Bu çalışma kapsamında; doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve kısıtlanmış optimizasyon uygulanmıştır.

Cevap yüzeyi yönteminde optimal deney noktalarının belirlenmesinde iki aşamalı bir yol izlenmiştir;

1. Bir deneye dayanarak, bir sonraki deneyde cevap yüzeyi altındaki maksimum (ya da minimum) noktaya doğru nereden hareket edileceğinin belirlenmesi,
2. Yüzeyin maksimum (ya da minimum) ya da yaklaşık maksimum (ya da minimum) sonucunu belirledikten sonra cevap yüzeyinin bu maksimum (ya da minimum) nokta civarındaki alanda denkleminin belirlenmesi.

Çalışmada kullanılan Box-Wilson'un dik yokuş yöntemi doğrusal bir regresyon model ile açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre maksimum miktarda toplam fenol (GAE ve OLE) ve oleuropein miktarının (HPLC) elde edildiği şartların optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır. Beş bağımsız değişken için pareto optimal çözüm sistemi kullanılmıştır.

Çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümü için, desirability değerlendirilmiştir. Denklem 5.2'ye göre geometrik ortalama alınarak oluşturulan toplu desirability fonksiyonunu, maksimize eden (x) değişken seviyesi kombinasyonu bulunmuştur.

Optimizasyonda desirability çalışmaları sonucu elde edilen çözüm kümesi, aşağıda verilmiştir. Optimum noktanın seçiminde her bir cevap değişkeni ile birlikte özellikle oleuropeini maksimum yapacak, bağımsız değişkenleri minimize edecek nokta seçimi önemsenmiş ve deney doğrulama sonuçları gözönüne alınarak seçim yapılmıştır.

Number	Amplitude	Irridiation zamani	Metanol	Prob Pozisyonu	Duty Cycle	Toplam Fenol- Gallik	Toplam Fenol Ol	Oleuropein-HPLC	Desirability	
1	33.14	1.62	51.32	1.61	0.68	5.98362	2.27476	1.13124	1.000	
2	89.00	15.00	50.00	1.50	0.30	7.01133	2.86631	1.44788	1.000	
3	87.86	1.62	51.32	2.86	0.97	5.91996	2.31058	1.12548	1.000	
4	60.50	1.00	80.00	1.50	1.00	9.78113	3.89019	1.90075	1.000	
5	87.86	1.62	66.32	1.61	0.33	5.98833	2.2169	1.37076	1.000	
6	35.75	1.92	64.09	3.98	0.95	4.18394	1.60138	0.74698	1.000	
7	32.00	15.00	50.00	4.00	0.30	3.25478	1.36318	0.532705	1.000	
8	32.00	15.00	80.00	4.00	1.00	10.6416	4.92707	2.46419	1.000	
9	60.50	1.00	50.00	4.00	0.30	4.51326	1.83573	0.49553	1.000	
10	89.00	15.00	80.00	1.50	1.00	21.5024	9.76928	5.40914	1.000	
11	33.14	14.38	78.68	1.61	0.33	8.34153	3.5362	1.85273	1.000	
12	33.14	1.62	78.68	2.86	0.33	4.42698	1.55701	0.644033	1.000	
13	89.00	1.00	80.00	4.00	0.65	7.46009	2.96087	1.25123	1.000	
14	33.14	8.62	51.32	3.89	0.97	5.10341	2.21337	1.31689	1.000	
15	87.86	14.38	78.68	3.89	0.33	7.31049	3.10944	1.2765	1.000	
16	60.50	15.00	65.00	2.75	0.65	7.01294	3.07168	1.58379	1.000	
17	33.14	8.62	78.68	3.89	0.33	9.01623	3.67044	1.69211	1.000	
18	62.78	14.22	51.68	1.64	0.96	5.33473	3.00271	1.73534	1.000	
19	32.00	8.00	80.00	1.50	1.00	4.72187	1.99952	0.874239	1.000	
20	87.86	14.38	51.32	3.89	0.97	15.3232	7.10087	5.18498	1.000	Selected
21	87.86	14.38	78.68	1.61	0.33	14.719	6.09964	3.17149	1.000	
22	89.00	15.00	50.00	4.00	0.30	4.81044	1.97251	1.36056	1.000	
23	89.00	15.00	80.00	4.00	1.00	17.7237	8.11491	4.62214	1.000	
24	60.50	1.00	65.00	2.75	0.65	4.77144	1.62665	0.604526	1.000	
25	60.50	1.00	50.00	1.50	0.30	6.58733	2.56242	1.08415	1.000	

Optimim koşullar; 87,85 genlik, 14,38 dk. SÖD uyg. süresi, % 51,32 MeOH, 3,89 prob pozisyonu, 0,97 görev döngüsü ve 12,78 Ç/K Oranı, 30 ºC sıcaklık olarak belirlenmiştir**.**

CYY ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için yapılan deney doğrulama sonuçlarından, Toplam fenol (GAE) (mg/g yaprak), Toplam fenol (OLE eşd.) (mg/g yaprak) ve oleuropein miktarı (mg/g yaprak) değerleri sırası ile **15,32 mg/g yaprak, 7,10 mg/g yaprak, 5,19 mg/g yaprak** ve standart sapma değerleri sırasıyla 1,52; 0,65, ve 0,45 olarak hesaplanmıştır.

5.3 MeOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Prob Ekstraksiyonunda Toplam Antioksidan Aktivite Cevap Faktörü için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması

MeOH/H_2O çözücülü, ultrasonik prob etkisi ile kurutulmuş öğütülmüş zeytin yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonuna dayalı çalışma kapsamında; deney tasarımı metodlarından sisteme etki eden değişkenlerden en önemli olanların tespiti, ürün özelliği üzerinde etkileşimlerinıin etkin olup olmadığı belirlenmiştir. Deney tasarımı metotlarından olan cevap yüzey metodu ile sistemin optimum yanıtına, yani ürün özelliğini optimuma ulaştıracak değişkenlerin değerleri tespit edilmiştir. Cevap yüzey metodu ile beş farklı değişken yardımı ile tanımlanan yüzeylerin, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin yardımı ile modellemesi yapılmıştır. Süreçlerin optimizasyonunda sistemin performansını veya ürün kalitesini belirleyen toplam antioksidan aktivite tek yanıtı ile çalışılmıştır.

Deneysel tasarımda, D-optimal tasarım çalışılmıştır. 5 faktör için, kuadretik modelde köşe faktöriyel noktaları, kenarların merkezleri, kısıtlanmış düzlemsel ağırlık merkezleri, eksenel kontrol karışım noktaları, iç noktalar, tüm ağırlık merkezleri hesaplanmış ve 31 noktalı tasarım yapılmıştır. Sıcaklık 30^oC'de sabit tutulmuş ve değişken olarak değerlendirilmemiştir. Ses ötesi dalganın çözücü/katı oranı 12,78'de sabit tutularak, çalışma, 50mL MeOH çözeltisi/3.9 g yaprak oranı kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 5.14 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı

Sıralama ve Seviyeleri		
Faktörler(Bağımsız Değişkenler)	**+1**	**-1**
A : Genlik %	89	32
B : SÖD uyg.süresi (dk)	15	1
C : MeOH %	80	50
D : Prob pozisyonu (cm)	4	1,5
E : Görev döngüsü %	1	0,3

y_1: Toplam antioksidan aktivite (% inhibisyon) bağımlı değişken olarak belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları çizelge 5.15 ‘de verilmiştir. Uygulanan F testi ile Fischer’in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.16’da verilmiştir.

Çizelge 5.15 MeOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonu tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları

Std	Run	Faktör1 A:Genlik %	Faktör2 B: SÖD uyg,süresi dk	Faktör3 C:MeOH v/v	Faktör4 D:Prob pozisyonu cm	Faktör5 E:Görev döngüsü %	Cevap 1 Antioksidan Aktivite %
1	20	32(-1)	8(0)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	87,32
2	10	89(+1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	85,88
3	8	32(-1)	15(+1)	80(+1)	4,0(+1)	1,0(+1)	83,26
4	2	89(+1)	15(+1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	87,19
5	16	60,5(0)	15(+1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	86,54
6	19	32(-1)	8(0)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	86,54
7	3	89(+1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1,0(+1)	85,75
8	25	60,5(0)	1(-1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	83,79
9	30	89(+1)	1(-1)	80(+1)	4,0(+1)	0,65(0)	86,93
10	26	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	84,13
11	11	32(-1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	87,45
12	17	32(-1)	8(0)	80(+1)	4,0(+1)	0,3(-1)	87,58
13	6	32(-1)	1(-1)	65(0)	4,0(+1)	1,0(+1)	52,42
14	18	60,5(0)	15(+1)	50(-1)	1,5(-1)	1, 0 (+1)	86,54
15	28	89(+1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1,0(+1)	86,41
16	15	89(+1)	15(+1)	80(+1)	4,0(+1)	0,3(-1)	87,45
17	24	89(+1)	15(+1)	80(+1)	4, 0 (+1)	1, 0 (+1)	87,06
18	1	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	86,67
19	7	32(-1)	15(+1)	50(-1)	4,0 (+1)	0,3(-1)	87,45
20	4	60,5(0)	1(-1)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	87,32
21	9	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	4,0(+1)	0,3(-1)	76,99
22	27	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	67,19
23	23	89(+1)	15(+1)	50(-1)	4,0(+1)	0,3(-1)	86,41
24	29	32(-1)	8(0)	80(+1)	4,0(+1)	0,3(-1)	87,71
25	22	89(+1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	87,45
26	14	32(-1)	8(0)	50(-1)	4,0(+1)	1,0(+1)	87,19
27	13	89(+1)	1(-1)	80(+1)	4,0(+1)	0,65(0)	86,8
28	12	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	76,99
29	31	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	80,13
30	21	89(+1)	15(+1)	50(-1)	4,0(+1)	1,0(+1)	83,14
31	5	89(+1)	1(-1)	65(0)	1,5(-1)	0,3(-1)	81,57

Çizelge 5.16 MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda, toplam antioksidan aktivite cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi, df	Ortalamanın karesi	F Değeri	p-Değeri (P) > F	
Model	1460,02	20	73	5,84	**0,0033**	**geçerli**
A-Genlik	270,6	1	270,6	21,65	**0,0009**	
B-Irridiation	365,5	1	365,5	29,25	**0,0003**	
C-MeOH	1,26	1	1,26	0,1	0,7577	
D-Prob pozisyonu	55,3	1	55,3	4,43	0,0617	
E-Görev döngüsü	15,5	1	15,5	1,24	0,2914	
AB	176,58	1	176,58	14,13	**0,0037**	
AC	$2,62.10^{-3}$	1	$2,62.10^{-3}$	$2,10.10^{-4}$	0,9996	
AD	14,81	1	14,81	1,19	0,3018	
AE	3,79	1	3,79	0,3	0,5941	
BC	2,31	1	2,31	0,18	0,6766	
BD	146,67	1	146,67	11,74	**0,0065**	
BE	6,46	1	6,46	0,52	0,4887	
CD	5,37	1	5,37	0,43	0,527	
CE	4,49	1	4,49	0,36	0,5624	
DE	0,33	1	0,33	0,026	0,8741	
A^2	44,16	1	44,16	3,53	0,0895	
B^2	252,26	1	252,26	20,19	**0,0012**	
C^2	208,91	1	208,91	16,72	**0,0022**	
D^2	6,75	1	6,75	0,54	0,4792	
E^2	159,43	1	159,43	12,76	**0,0051**	
Arta Kalan	124,96	10	12,5			
UyumEksikliği	55,32	5	11,06	0,79	0,5966	**g.değil**
Hata	69,64	5	13,93			
Düzeltilmiş top.	1584,99	30				

Önemli Model Terimleri	**A,B, AB, BD, B2, C2, E^2**
R^2 :0,9268	R^2_{Adj} :0,7805

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,9268 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile %92,68 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin toplam antioksidan aktivite (%) miktarı için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,966 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan tek amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda *genlik, SÖD uygulama süresi, MeOH, prob pozisyonu* ve

görev döngüsü' nün *toplam antioksidan aktivite*ye etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları çizelge 5.16'da verilmiştir. Tasarım kullanılarak 31 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak, regresyon katsayıları elde edilmiş ve yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan ikinci dereceden model denklemi, aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.AntioksidanAktivite}$=+94,77+4,04A+4,36B+0,25C-3,99D-0,89E-3,28AB-4,767.10^{-4}AC –1,43 AD + 0,51AE+0,36BC+3,88BD-0,65BE-0,73CD-0,51CE-0,20DE-3,88A^2-10,04B^2+10,87C^2-2,73D^2-9,24E^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$= +204,66+0,9248A+3,63B-6,12C +8,12D+102,20E-0,016AB-1,12.10^{-6}AC-0,04 AD+0,05AE+3,41.10^{-3}BC+0,44BD-0,27BE-0,039CD-0,075BE-0,46DE-4,78.$10^{-3}$$A^2$-0,205 B^2 + 0.048C^2-1,75D^2 -75,45E^2

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

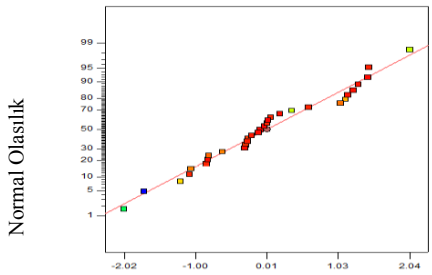
Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94,77+4,04 A+4,36B -3,28AB +3,88BD -10,04B^2+10,87C^2 -9,24E^2

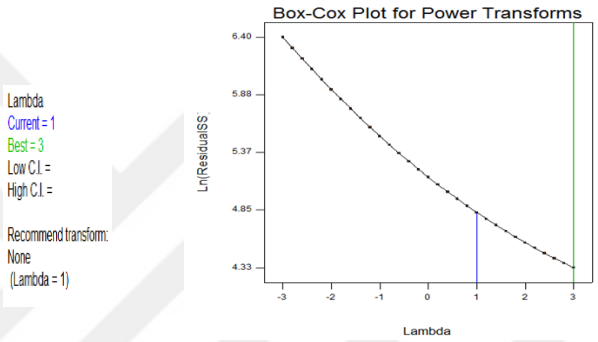
Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$= +204,66+0,92A+3,63B-0,016AB +0,44BD -0,205B^2 +0,048C^2-75,45 E^2

Cevap faktörü Toplam Antioksidan Aktivite'nin maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.68' de verilmiştir.



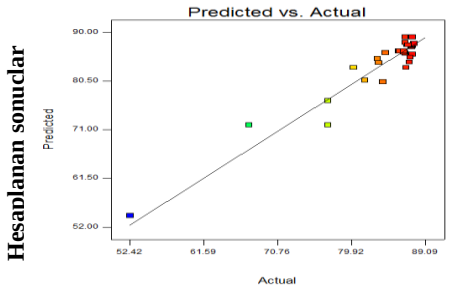
Şekil 5.68 Toplam Antioksidan Aktivite maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 5.69 Box-Cox grafiği

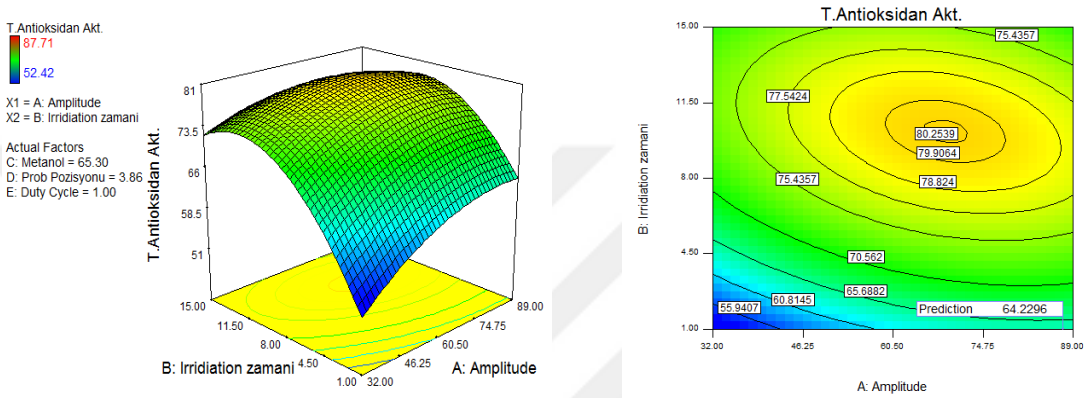
Şekil 5.69'da verilen Box-Cox grafiğinde, elde edilen verilere göre λ=3,00 bulunmuş ve cevap değeri için çalışmanın % 95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.70'de verilmiştir.

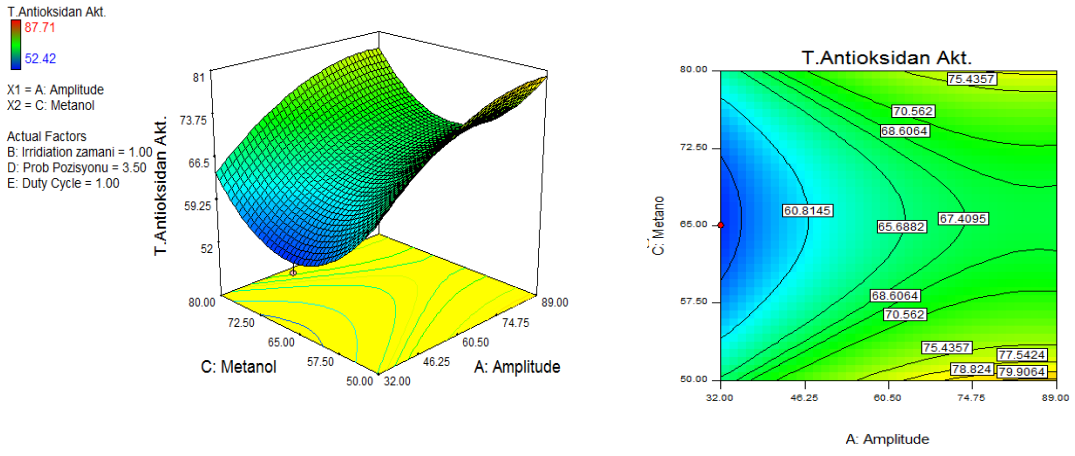


Şekil 5.70 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

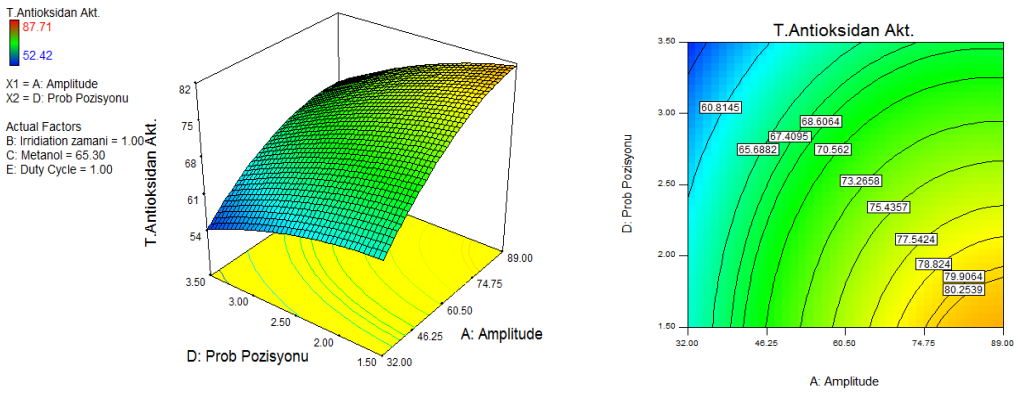
Model denkleminde, genlik ve SÖD uyg.süresinin önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uyg.süresi, SÖD uyg.süresi/prob pozisyonu arasındaki ilişkinin ve SÖD uyg.süresi, MeOH ve görev döngüsü'ın karesinin etkileşiminin de önemli olduğu gözlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin Toplam antioksidan aktivite üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile aşağıda gösterilmiştir.



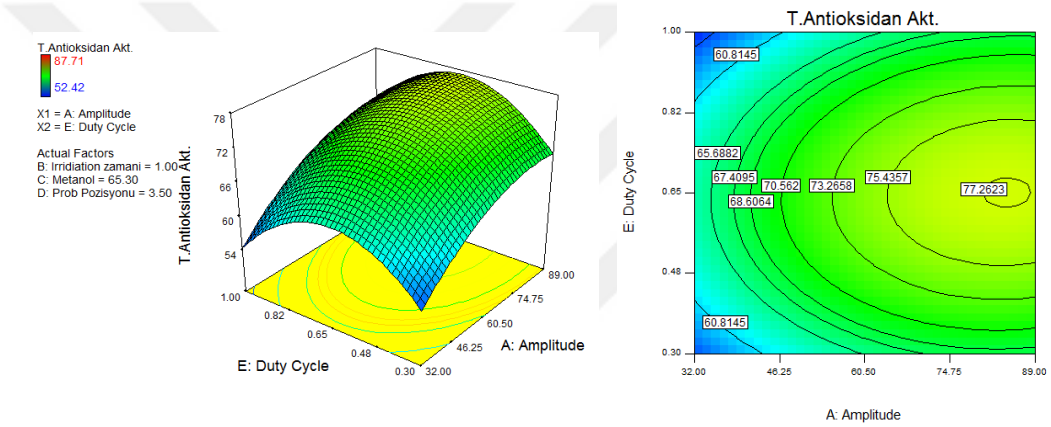
Şekil 5.71 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77+4.04 A+4.36 B -3.28AB -3.88A^2-10.04 B^2



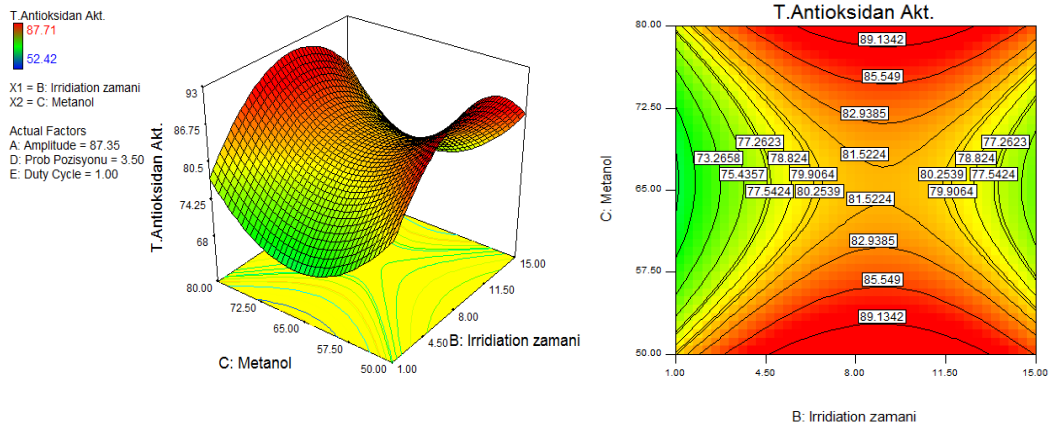
Şekil 5.72 Genlik-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.AntioksidanAktivite}$ = +94.77 +4.04 A+ 0.25C-4.767.10^{-4}AC- -3.88A^2 +10.87C^2



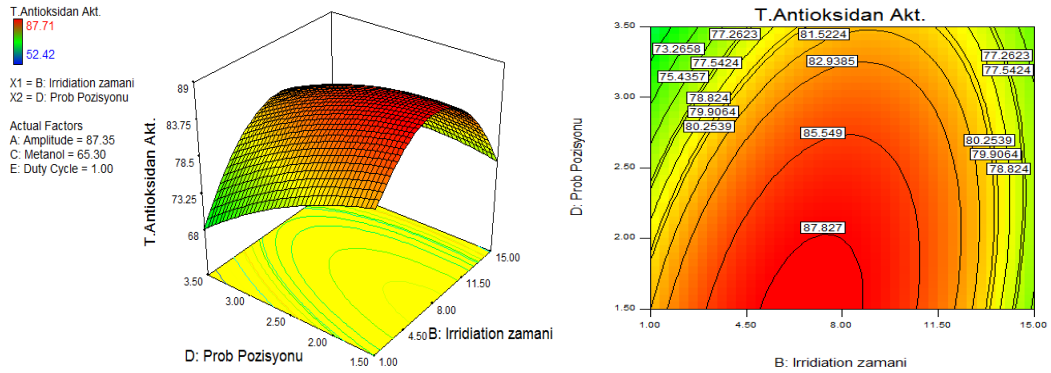
Şekil 5.73 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77+4.04A -3.99D-1.43AD-3.88A^2 -2.73D^2-9.24 E^2



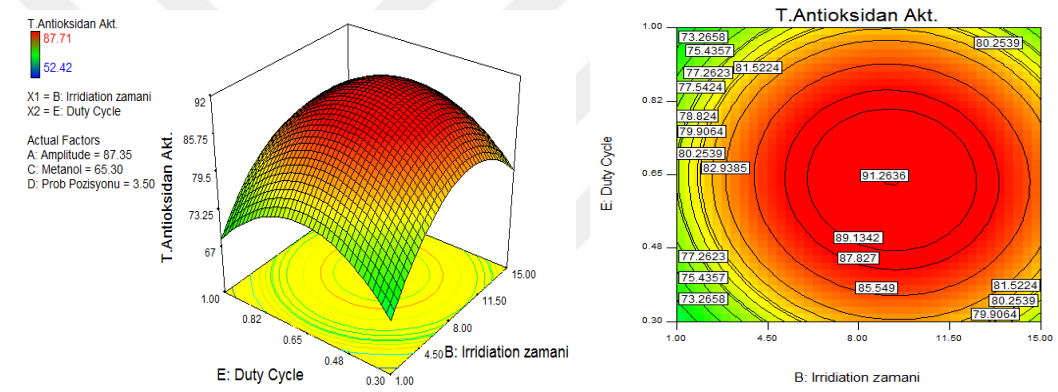
Şekil 5.74 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77+4.04A-0.89E +0.51AE -3.88A^2 -9.24E^2



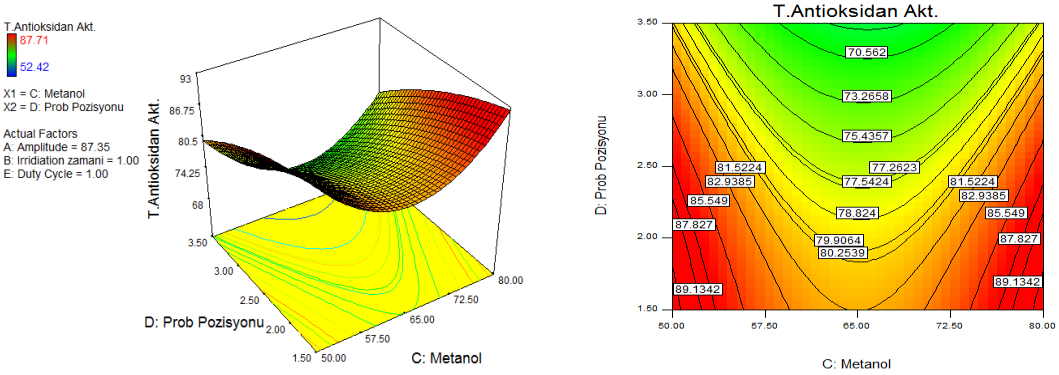
Şekil 5.75 SÖD uyg. süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi,$Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77 +4.36 B+0.25C +0.36BC -10.04B^2+10.87C^2



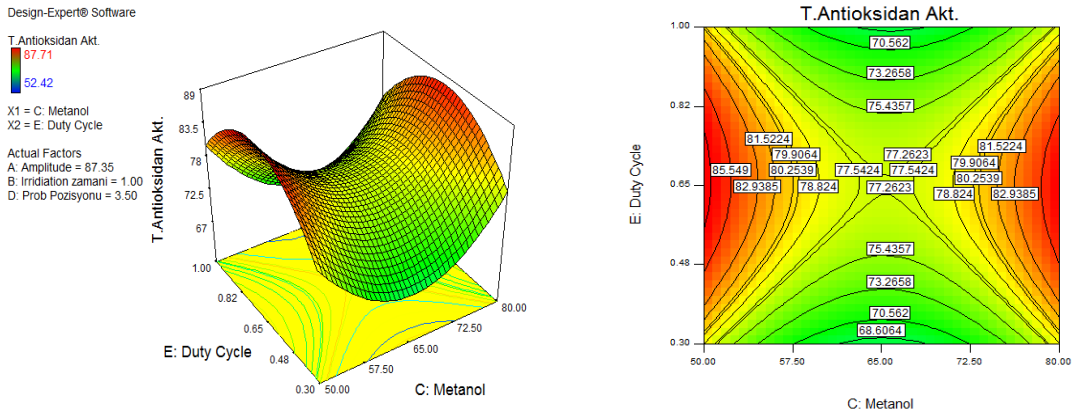
Şekil 5.76 SÖD uyg. süresi-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için,kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77 +4.36 B -3.99D +3.88BD -10.04B^2 -2.73D^2



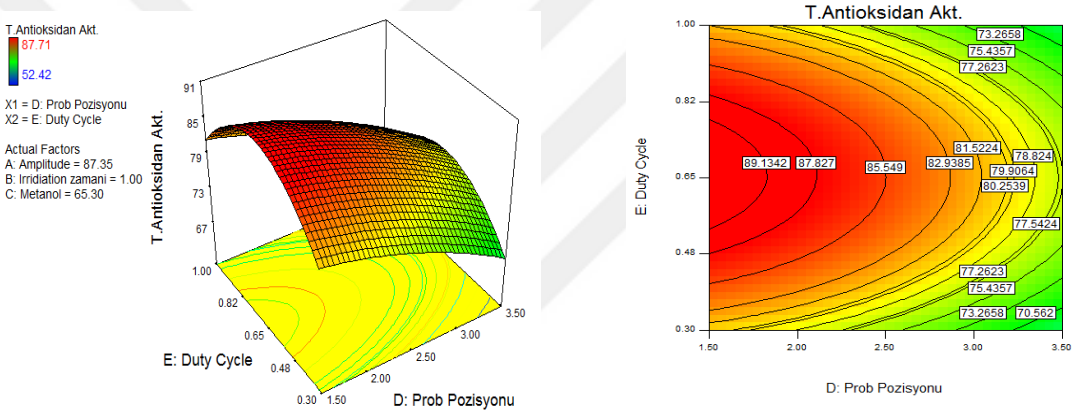
Şekil 5.77 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu ve kontür yüzey grafiği, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77 +4.36B-0.89E-0.65BE -10.04B^2-9.24E^2



Şekil 5.78 MeOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77 +0.25C-3.99D -0.73 C D +10.87C^2-2.73 D^2



Şekil 5.79 MeOH- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77 +0.25 C -0.89 E -0.51CE +10.87C^2 -9.24E^2



Şekil 5.80 Prob pozisyonu- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+94.77 -3.99D-0.89E -0.20DE -2.73D^2-9.24E^2

Şekil 5.71'de verilen izohips ve üç boyutlu yüzey grafiği, genlik-SÖD uyg.süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için p değeri 0,0037 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde maksimum bir bölge olduğu görülmektedir. Şekil 5.72'de verilen izohips ve üç boyutlu yüzey grafiği, genlik-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (genlik-MeOH) için p değeri 0,9996 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-MeOH arasınndaki yüzey profili bize bir eyer noktası oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.73'de verilen izohips ve üç boyutlu yüzey grafiği, genlik-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (genlik-prob pozisyonu) için p değeri 0,3018 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-prob

pozisyonu arasındaki yüzey profili bize cevap değişkeni üzerinde genliğin etkili, prob pozisyonunun etkisiz olduğunu göstermektedir. Şekil 5.74'de verilen izohips ve üç boyutlu yüzey grafiği, genlik-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri 0,5941 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde plato görüntüsü ve maksimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.75'de verilen izohips ve üç boyutlu yüzey grafiği, SÖD uyg.süresi-MeOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (SÖD uyg.süresi-MeOH) için p değeri 0,6766 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etki görülmektedir. Şekil 76'da verilen izohips ve üç boyutlu yüzey grafiği, SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi- prob pozisyonu) için p değeri 0,0065 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, plato bölge maksimum etki gözlenmiştir. Şekil 5.77'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BE (SÖD uyg.süresi-görev döngüsü) için p değeri 0,4887 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, maksimum etki gözlenmiştir. Şekil 5.78'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği MeOH-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde CD (MeOH- prob pozisyonu) için p değeri 0,527 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etkisi gözlenmiştir. Şekil 5.79'da verilen MeOH-görev döngüsü etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir. Modelde CE (MeOH-görev döngüsü) için p değeri 0,5624 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etki gözlenmiştir. Şekil 5.80'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği prob pozisyonu-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde DE (prob pozisyonu -görev döngüsü) için p değeri 0,8741 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge maksimum etki gözlenmiştir.

MeOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile ekstraksiyonun, deneysel tasarım çalışmaları sonucu tek cevap faktörüne karşı alınan, ANOVA sonuçlarında elde edilen yeterli kesinlik sonuçları, çalışmanın yeterli veri ile tamamlandığını göstermektedir. Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal/gürültü oranını göstermekte olup, bu

çalışmada bulunan sinyal/gürültü oranı 12,566' dır. Bu değer yeterli kesinliğe işaret etmiştir. Optimizasyon çalışmaları kapsamında; doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve kısıtlanmış optimizasyon uygulanarak çalışılmıştır.

Cevap yüzeyi yönteminde optimal deney noktalarının belirlenmesinde iki aşamalı bir yol izlenmiştir;

1. Bir deneye dayanarak, bir sonraki deneyde cevap yüzeyi altındaki maksimum (ya da minimum) noktaya doğru nereden hareket edileceğinin belirlenmesi,
2. Yüzeyin maksimum (ya da minimum) ya da yaklaşık maksimum (ya da minimum) sonucunu belirledikten sonra cevap yüzeyinin bu maksimum (ya da minimum) nokta civarındaki alanda denkleminin belirlenmesi.

Çalışmada kullanılan Box-Wilson'un dik yokuş yöntemi doğrusal bir regresyon modelle açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmış ve maksimum miktarda Toplam Antioksidan Aktivite elde edildiği şartlarda optimizasyon yapılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır. Beş bağımsız değişken için pareto optimal çözüm sistemi kullanılmıştır.

Tek yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümü için, desirability değerlendirilmiştir. Denklem 5.2'ye göre geometrik ortalama alınarak oluşturulan toplu desirability fonksiyonunu, maksimize eden (x) değişken seviyesi kombinasyonu bulunmuştur.

Optimizasyonda desirability çalışmaları sonucu, elde edilen çözüm kümesi aşağıda verilmiştir. Bağımlı cevap değişkenini maksimize edecek, bağımsız değişkenleri minimize edecek nokta, optimizasyon için seçilmiştir.

Solutions

Number	Amplitude	Irridiation zamani	Metanol	Prob Pozisyonu	Duty Cycle	T.Antioksidan Akt.	Desirability	
1	57.57	5.95	56.96	3.73	0.33	82.5293	1.000	
2	57.66	2.36	53.52	3.92	0.87	78.3871	1.000	
3	46.68	1.36	72.14	1.50	0.41	80.213	1.000	
4	85.45	2.99	65.97	3.65	0.55	81.2458	1.000	
5	32.48	6.13	68.35	3.17	0.58	83.2321	1.000	
6	44.73	1.73	51.44	3.83	0.45	76.5561	1.000	
7	61.63	7.18	74.63	3.69	0.92	87.0525	1.000	
8	85.11	14.79	73.41	1.83	0.31	83.5934	1.000	
9	45.15	5.91	63.84	2.64	0.84	85.9387	1.000	Selected

Optimim koşullar; %46,15 genlik, 5,91 dk. SÖD uyg. süresi, % 63,84 MeOH, 2,54 prob pozisyonu, 0,84 görev döngüsü ve 12,78 Ç/K Oranı, 30°C sıcaklık olarak belirlenmiştir**.**

Deney doğrulama (experimental verification) cevap yüzey yöntemi ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için yapılan üç tekrarlı deney doğrulama sonuçlarından, Toplam Antioksidan Aktivite değeri **% 85,939** ve standart sapma değeri **0,034** olarak bulunmuştur.

5.4 EtOH/H_2O Çözücü Ekstraksiyonu için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması

EtOH/H_2O çözücü karışımı ile kurutulmuş öğütülmüş zeytin yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonuna dayalı çalışma kapsamında; deney tasarımı metodları içinde sisteme etki eden değişkenlerden en önemli olanları tespit edilmiş ve ürün özellikleri üzerinde etkileşimlerinin etkin olup olmadığı belirlenmiştir. Cevap yüzey metodu ile dört farklı değişken yardımı ile tanımlanan yüzeylerin, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin yardımıyla modellemesi yapılmıştır. Süreçlerin optimizasyonunda sistemin performansını veya ürün kalitesini belirleyen üç yanıtla eş zamanlı çalışılmıştır. Cevaplar maksimum seviyede tutulurken, sisteme kabul edilebilir değerler ve hedef değerler girilmiştir. Cevap yüzeyi metodundan, deneysel bir çalışmada sonuç üzerinde etkin olan çok sayıda faktörle oluşan bir tasarımda, istenen özellikleri sağlayan bölgeyi ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmek için yararlanılmıştır.

Deneysel tasarımda, merkezi kompozit tasarım (Box Wilson tasarımı) çalışılmıştır. (2^4+yıldız tasarımı) 4 faktör için, döndürülebilir ve ortogonal tasarım yapılmıştır. Eksenel mesafe 2,00'dir.

Çizelge 5.17 Üç bağımlı değişken için dört faktörlü CCD tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı

Sıralama ve Seviyeleri					
Faktörler(Bağımsız Değişkenler)	**+2 (+α)**	**+1**	**0**	**-1**	**-2 (-α)**
A: EtOH (v/v)	85	65	45	25	5
B : Sıcaklık (C^o)	75	60	45	30	15
C : Süre (dk)	100	75	50	25	0
D: Çözücü/Katı Oranı (mL/g)	42,50	30	17,5	5	0,5

EtOH'lü ekstraktlarda; HPLC ile oleuropein miktar tayini ve spektroskopik olarak Folin–Ciocalteu yöntemi ile GAE ve OLE eşdeğeri olarak toplam fenol tayini yapılmıştır. Optimum koşulları belirlenmiş ekstraktlarda ise toplam antioksidan miktarı % inhibisyon olarak DPPH yöntemi ile tayin edilmiştir.

Bağımlı değişken olarak;

y_1 : Toplam Fenol miktarı (GAE) mg/g yaprak

y_2 : Toplam Fenol miktarı (OLE eşd) mg/g yaprak

y_3 : Oleuropein miktarı (HPLC) mg/g yaprak

belirlenmiştir.

Deney tasarımında, bağımsız değişkenlerin bir fonksiyonu olarak yanıtı tanımlayan ikinci dereceden model geliştirilmiştir. İkinci dereceden kurulan modelin hataları, sabit varyansla normal dağılmış olup birbirinden bağımsızdır. Optimizasyon çalışmasında sistemi karakterize eden tüm yanıtlar birlikte ele alınmış, çok yanıtlı optimizasyon, çok amaçlı pareto bölgeler yardımı ile çözülmüştür. Deney Sayısı; $2k+2^k+6 = 2*4 + 2^4+6$ eşitliğinden 30 olarak hesaplanmıştır (k: bağımsız değişken sayısı).

Her bir cevap faktörü için tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. Oluşturulan bu modelin deneysel verileri ne kadar karşıladığı ise yine varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle herbir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri % 95 güven seviyesinde Fischer (F testi) uygulanarak verilmiştir. İstatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelden çıkarılmıştır. Bir model sistemin gerçek cevaba uygun olup olmadığına ve uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun % 95 güven seviyesinde önemli olması koşulu ile karar verilmiştir. Uyum eksikliği için F testinin önemli olduğu durumda, verilere uygun olması için daha karmaşık bir modele ihtiyaç duyulmuş ve model değiştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları çizelge 5.18'de verilmiştir.

Çizelge 5.18 EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonu için kodlanmış ve gerçek değerlerle deneysel tasarım noktaları ve sonuçları

Std	Run	Blok	Faktör1 A:EtOH %v/v	Faktör2 B:Sıcaklık °C	Faktör3 C:Süre dakika	Faktör4 D:Ç/K oranı	Cevap 1 T. Fenol GAE	Cevap 2 T. Fenol OLE eşd	Cevap 3 Oleuropein HPLC
1	17	{1}	25,0(-1)	30,0(-1)	25,0(-1)	5,00(-1)	8,41	4,53	4,78
2	15	{1}	65,0(+1)	30,0(-1)	25,0(-1)	5,00(-1)	10,12	5,38	5,68
3	12	{1}	25,0(-1)	60,0(+1)	25,0(-1)	5,00(-1)	8,03	4,36	4,88
4	6	{1}	65,0(+1)	60,0(+1)	25,0(-1)	5,0(-1)	14,37	6,12	6,60
5	18	{1}	25,0(-1)	30,0(-1)	75,0(+1)	5,0(-1)	9,125	4,15	4,81
6	26	{1}	65,0(+1)	30,0(-1)	75,0(+1)	5,0(-1)	11,82	5,99	4,43
7	28	{1}	25,0(-1)	60,0(+1)	75,0(+1)	5,0(-1)	8,06	3,05	2,97
8	30	{1}	65,0(+1)	60,0(+1)	75,0(+1)	5,0(-1)	16,03	7,81	7,45
9	8	{1}	25,0(-1)	30,0(-1)	25,0(-1)	30,0(+1)	15,43	7,65	7,47
10	29	{1}	65,0(+1)	30,0(-1)	25,0(-1)	30,0(+1)	19,05	9,24	9,61
11	14	{1}	25,0(-1)	60,0(+1)	25,0(-1)	30,0(+1)	17,38	8,55	8,54
12	16	{1}	65,0(+1)	60,0(+1)	25,0(-1)	30,0(+1)	19,89	9,57	9,41
13	7	{1}	25,0(-1)	30,0(-1)	75,0(+1)	30,0(+1)	16,64	8,06	8,83
14	3	{1}	65,0(+1)	30,0(-1)	75,0(+1)	30,0(+1)	25,87	18,79	18,32
15	23	{1}	25,0(-1)	60,0(+1)	75,0(+1)	30,0(+1)	21,02	13,23	12,87
16	19	{1}	65,0(+1)	60,0(+1)	75,0(+1)	30,0(+1)	29,74	20,54	20,09

Çizelge 5.18 EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonu için kodlanmış ve gerçek değerlerle deneysel tasarım noktaları ve sonuçları (devam)

17	20	{1}	5,0(-2)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	7,94	2,69	2,34
18	1	{1}	85,0(+2)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	14,30	6,77	6,34
19	11	{1}	45,0(0)	15,0(-2)	50,0(0)	17,50(0)	17,36	8,96	8,30
20	9	{1}	45,0(0)	75,0(+2)	50,0(0)	17,50(0)	13,95	6,28	5,87
21	21	{1}	45,0(0)	45,0(0)	0,00(-2)	17,50(0)	1,96	0,19	0,99
22	22	{1}	45,0(0)	45,0(0)	100(+2)	17,50(0)	16,04	8,62	7,29
23	2	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	5,0(-1)	12,68	5,51	4,94
24	27	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	42,5(+2)	23,48	12,46	11,36
25	5	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	13,14	6,425	5,90
26	24	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	14,53	6,05	4,99
27	4	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	14,32	5,62	4,96
28	13	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	13,76	5,19	5,25
29	10	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	13,54	6,82	6,30
30	25	{1}	45,0(0)	45,0(0)	50,0(0)	17,50(0)	13,20	5,92	5,66

İkinci dereceden model:

y= $f(x) = \beta o + \sum_{i=1}^{4} \beta ixi + \sum_{i,j=1}^{4} \beta jixixj + \sum_{i=1}^{4} \beta ii$ x_i^2 +r_i şeklinde tanımlanmıştır.

Burada;

β_o : Regresyon eşitliğinin sabit terimi
β_i : Doğrusal terimlerin katsayıları
β_{ij} : Etkileşim terimlerinin katsayıları
β_{ii} : Quadratik terimlerinin katsayıları, olarak tanımlanmıştır.

5.4.1 Cevap Faktörü 1: Toplam Fenol miktarı (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Bulunan regresyon katsayılarının önemini bulmak için faktörlerin (değişkenlerin) orta noktalarında yapılan bir dizi paralel deneyden yararlanılmış ve F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanarak her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.19'da verilmiştir.

Çizelge 5.19 EtOH/H_2O ekstraksiyonu Toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri, (P) > F**	
Model	827,49	14	59,11	7,60	**< 0,0002**	**geçerli**
A-EtOH	128,16	1	128,16	16,47	**0,0010**	
B-Sıcaklık	5,31	1	5,31	0,68	0,4217	
C-Süre	120,59	1	120,59	15,50	**0,0013**	
D-Ç/K Oranı	354,25	1	354,25	45,53	**<0,0001**	
AB	4,29	1	4,29	0,55	0,4693	
AC	13,03	1	13,03	1,67	0,2152	
AD	1,82	1	1,82	0,23	0,6359	
BC	1,39	1	1,39	0,18	0,6782	
BD	1,00	1	1,00	0,13	0,7250	
CD	18,88	1	18,88	2,43	0,1402	
A^2	2,48	1	2,48	0,32	0,5811	
B^2	19,50	1	19,50	2,51	0,1342	
C^2	19,12	1	19,12	2,46	0,1378	
D^2	21,87	1	21,87	2,81	0,1144	
Arta Kalan	96,70	15	7,78			
Uyum Eksikliği	55,06	10	8,51	1,21	**0,6548**	**g.değil**
Hata	41,64	5	0,33			
Düzeltilmiş top.	944,19	29				

Önemli Model Terimleri		**A, C, D**	
R^2	:0,876	R^2_{Adj}	:0,7610

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,876 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile %87,6 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç, elde edilen model denklemin toplam fenol (GAE) miktarı için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,6548 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; EtOH/H_2O ekstraksiyonunda EtOH oranı, sıcaklık, süre, çözücü/katı oranının toplam fenol miktarına (GAE) etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Tasarım kullanılarak 30 tekrar gerçekleştirilmiş ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmış ve elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=13,98 + 2,31A + 0,47B + 2,24C + 4,35D + 0,52AB + 0,90AC + 0,34AD + 0,30BC + 0,25BD+1,09CD-0,30A^2 + 0,84B^2 -0,83C^2 + 1,16D^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$= + 16,266 – 8,953A - 0,44B + 0,044C – 0,206D + 1,73.10^{-3} AB +1,805.10^{-3} AC + 1,73.10^{-3}AD + 7,86.10^{-4} BC + 1,33.10^{-3} BD + 3,47.10^{-3} CD –7,43.10^{-4} A^2 +3,71.$10^{-3}$$B^2$-1.32 10^{-3} C^2+7,39.10^{-3} D^2

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

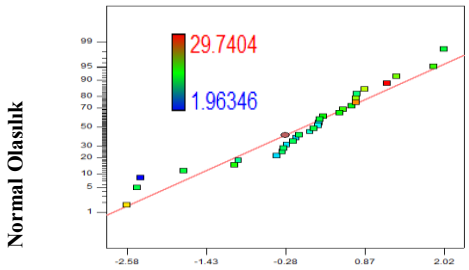
Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$= +13,98 + 2,31A + 2,24C + 4,35D

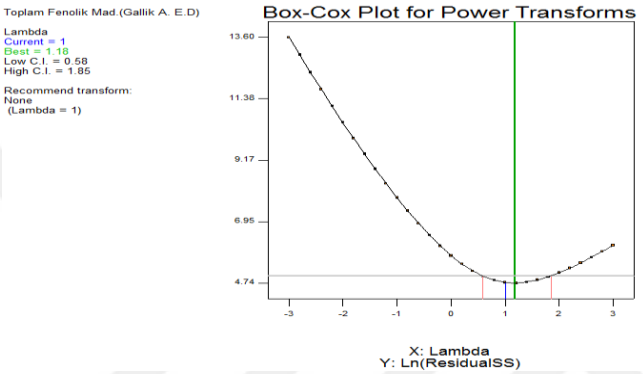
Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$= + 16,256 – 8,953 A - 0,206 D

Cevap faktörü 1 Toplam Fenol (GAE)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.81'de verilmiştir. Normal olasılık (dağılım) grafiği; hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğunu tespit etmek amacı ile çizilmiştir.

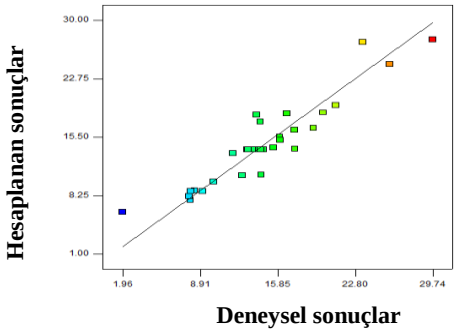


Şekil 5.81 Toplam Fenol (GAE) miktarı maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği



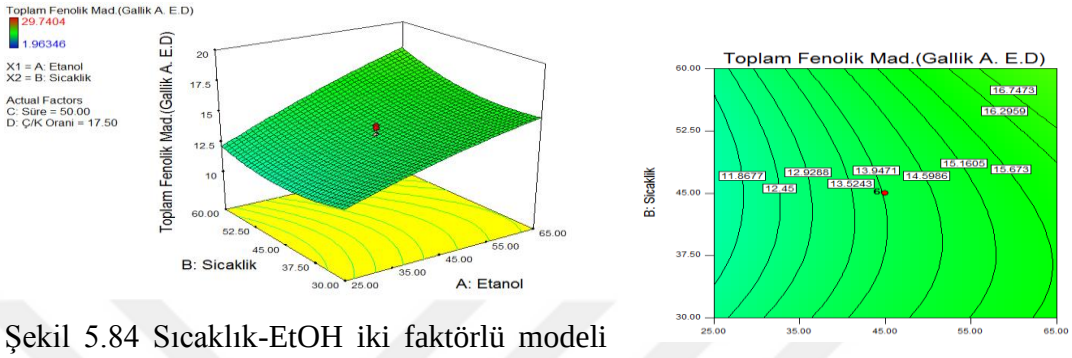
Şekil 5.82 Box-Cox grafiği

Şekil 5.82'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=1,18 bulunmuş ve çalışmanın cevap değeri için çalışmanın %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğuve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.83'de verilmiştir.

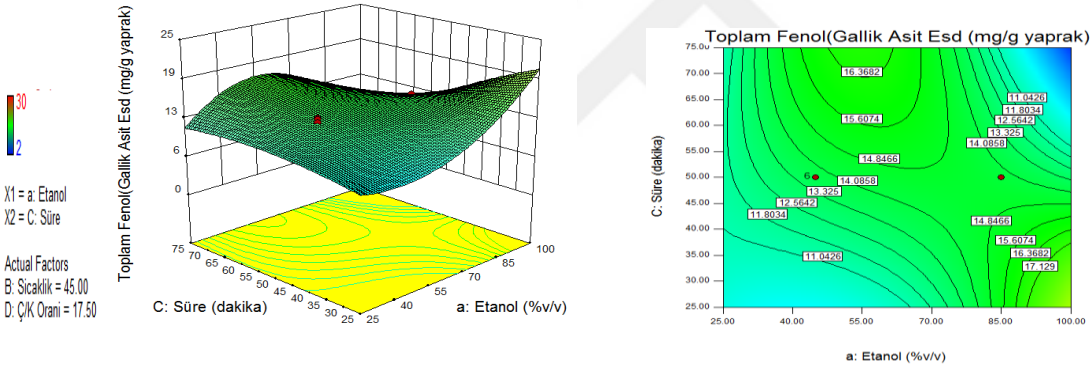


Şekil 5.83 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

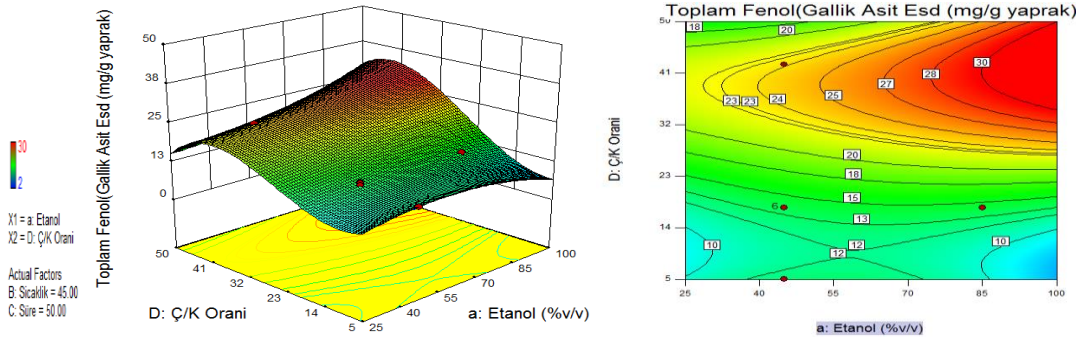
Parametrelerin etkileşimi ve sonuç üzerindeki etkisi üç boyutlu yüzey grafikleri ve izohips eğrileri ile ortaya konulmuştur. Model denkleminde EtOH oranı, süre ve çözücü/katı oranının en önemli parametreler olduğu, belirlenmiştir. Diğer parametreler merkezde sabit tutulduğunda, iki faktöre ait seviyelerin Toplam fenol (GAE) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



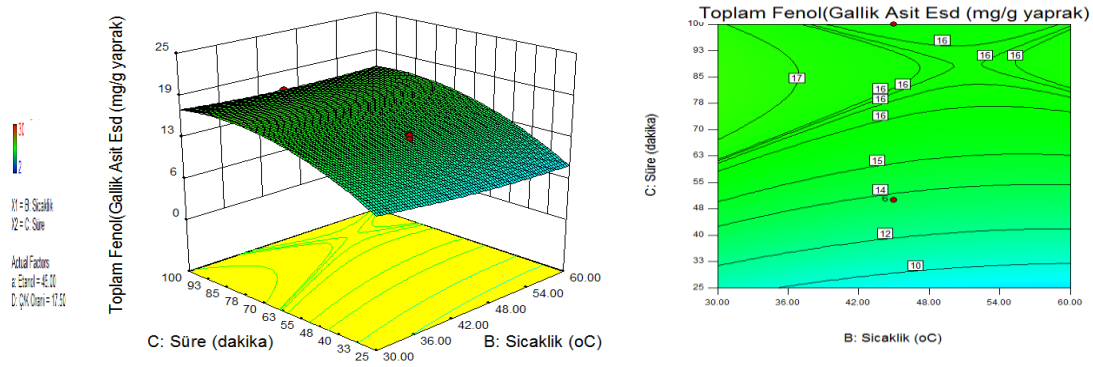
Şekil 5.84 Sıcaklık-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=+13,98+2.31A+0.47B +0.52AB -0.30A^2+0.84B^2



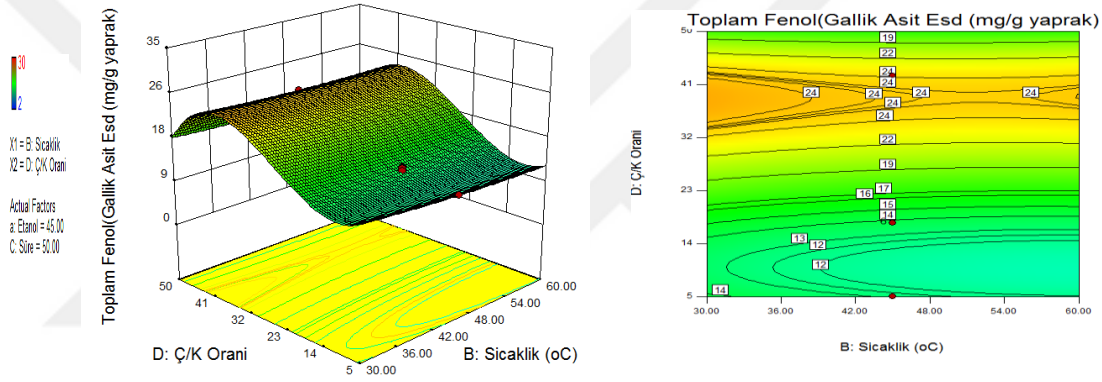
Şekil 5.85 EtOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=+13,98+2.31A+2.24C +0.90AC -0.30A^2 -0.83C^2



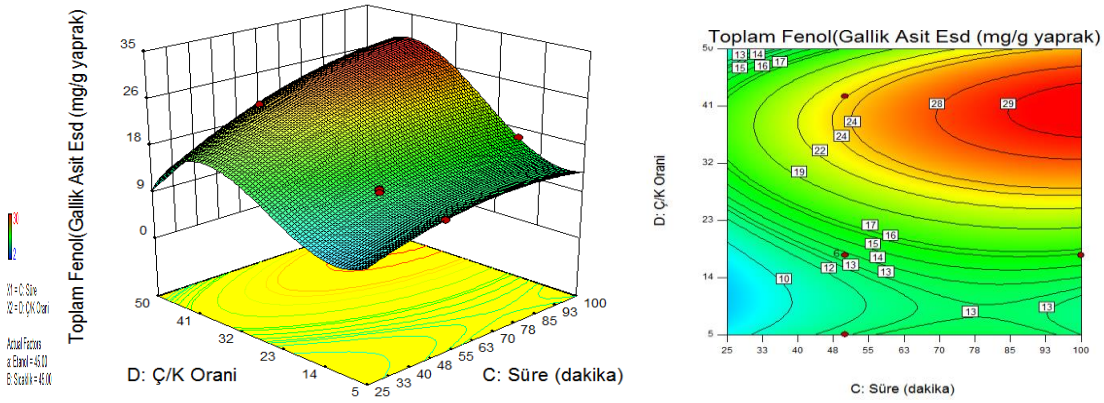
Şekil 5.86 EtOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$= +13,98+2.31A +4.35D+ 0.34AD -0.30A^2 +1.16D^2



Şekil 5.87 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=+13,98 +0.47B+2.24C +0.30BC+0.84B^2-0.83C^2



Şekil 5.88 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$ = +13,98+0.47B +4.35D+0.25BD +0.84B^2+1.16D^2



Şekil 5.89 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=+13,98 +2.24 C +4.35D +1.09CD -0.83C^2+1.16D^2

Şekil 5.84'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-sıcaklık arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AB (EtOH-sıcaklık) için p değeri 0,4693 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. EtOH cevap faktörüne artan oranlarda etki ederken, sıcaklık etkisi görülmemektedir. Şekil 5.85'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (EtOH-süre) için p değeri 0,2152 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. EtOH-süre arasındaki yüzey profili bize eyer noktası bölgesi oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.86'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (EtOH-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,6359 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. EtOH-çözücü/katı oranı arasındaki yüzey profili bize bir plato bölgesi ve maksimum nokta olduğunu göstermiştir. Şekil 5.87' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (sıcaklık-süre) için p değeri 0,6782 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde her iki parametreninde etki etmediği, düşük bir maksimizasyon etki olduğu gözlenmiştir. Şekil 5.88'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (sıcaklık- çözücü/katı oranı) için p değeri 0,7250 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, sıcaklık parametresi etki etrmezken, çözücü/katı oranı cevap faktörüne pozitif etki etmektedir ve plato görüntüsü söz konusudur. Şekil 5.89'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği süre-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde CD (süre-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,1402 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, süre parametresi etkisizken, çözücü/katı oranı cevap faktörüne pozitif etki etmiştir. Profil plato görünümündedir.

5.4.2 Cevap Faktörü 2:Toplam fenol miktarı (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve toplam fenol (OLE eşd) cevap faktörü için sonuçlar ve bulunan regresyon katsayılarının önemini bulmak için faktörlerin (değişkenlerin) orta noktalarında yapılan bir dizi paralel deneyden yararlanılmış ve uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.20'de verilmiştir.

Çizelge 5.20 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda Toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	453,50	14	32,39	6,96	**<0,0003**	**geçerli**
A-EtOH	60,30	1	60,30	12,95	**0,0026**	
B-Sıcaklık	0,69	1	0,69	0,15	0,7053	
C-Süre	77,40	1	77,40	16,62	**0,0010**	
D-Ç/K Oranı	157,30	1	157,30	33,79	**<0,0001**	
AB	$1,846.10^{-3}$	1	$1,846\ 10^{-3}$	$3,96610^{-3}$	0,9844	
AC	23,54	1	23,54	5,06	**0,0400**	
AD	8,18	1	8,18	1,76	0,2047	
BC	2,12	1	2,12	0,45	0,5105	
BD	2,92	1	2,92	5,57	0,4407	
CD	38,96	1	38,96	74,33	**0,0112**	
A^2	$7,489.10^{-3}$	1	$7,489.10^{-3}$	4,65	0,9685	
B^2	15,29	1	15,29	7,51	**0,0901**	
C^2	0,12	1	0,12	7,30	0,8771	
D^2	15,01	1	15,01	94,48	0,0927	
Arta Kalan	69,84	15	4,66			
UyumEksikliği	59,18	10	6,82	20,56	0,1119	**geçerli değil**
Hata	11,66	5	0,33			
Düzeltilmiş top	523,33	29				

Önemli Model Terimleri	**A, C, D, AC, CD, B^2**
R^2 : 0,867	R^2_{Adj}: :0,742

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,867 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 86,7 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin toplam fenol (OLE,mg/g) miktarı için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,1119 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunda EtOH oranı, sıcaklık, süre, çözücü/katı oranının, toplam fenol miktarına (OLE eşd.) etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Tasarım kullanılarak 30 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmış, elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuş ve denklem aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$= 6,16 + 1,59A + 0,17B + 1,80C + 2,90D - 0,011AB + 1,21AC+ 0,72AD + 0,36BC + 0,43BD + 1,56CD + 0,016A^2+ 0,74B^2 – 0,064C^2 + 0,96 D^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$= 18,789–0,094A–0,371B–0,158C–0,464D-3,581 10^{-5} AB +2,426.10^{-3}AC+ 2,86.10^{-3} AD+ 9,69.10^{-4}BC + 2,28 10^{-3}BD+4,99.10^{-3} CD + 4,09.$10^{-5}A^2$+ 3,288.$10^{-3}B^2$ -1,03.10^{-3} C^2+ 6,13.10^{-3} D^2

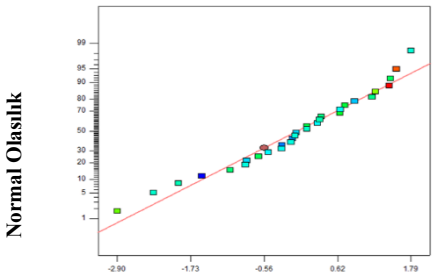
Bu durumda model denklemi, en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model:

Kodlanmış değerlerle;
$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$= 6,16+ 1,59A +1,80C + 2,90D + 1,21AC + 1,56CD + 0,74B^2

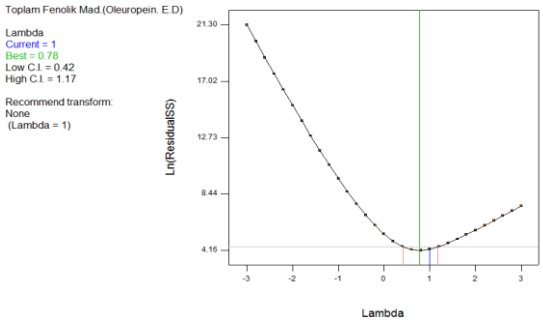
Gerçek değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$= 18,789 – 0,094A – 0,16C – 0,46D + 2,43 10^{-3}AC + 4,99 10^{-3} CD + 3,288.10^{-3} B^2

Cevap faktörü 2 Toplam Fenol (OLE)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.90' da verilmiştir.



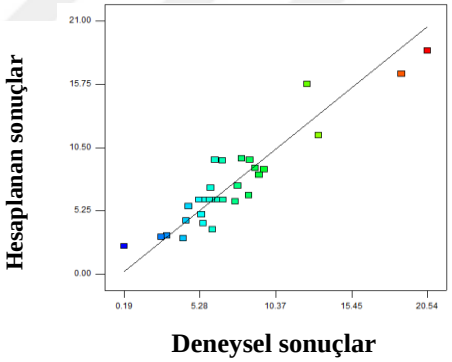
Şekil 5.90 Toplam Fenol (OLE) miktarı maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 5.91 Box-Cox grafiği

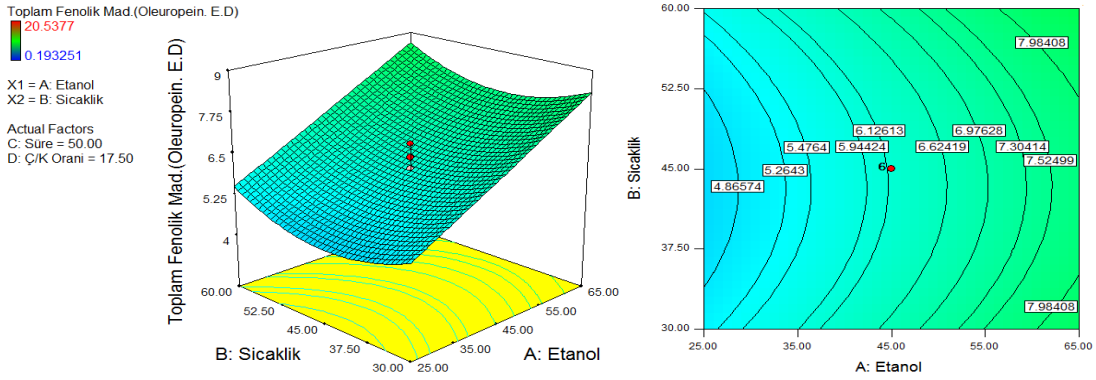
Şekil 5.91'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln'i ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş elde edilen verilere göre λ=0,89 bulunmuş ve cevap değeri için çalışmanın % 95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.92'de verilmiştir.

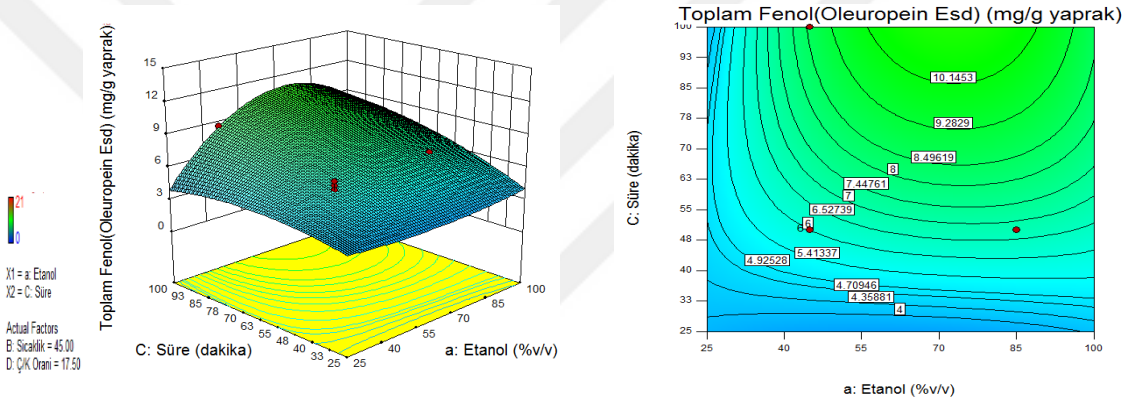


Şekil 5.92 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

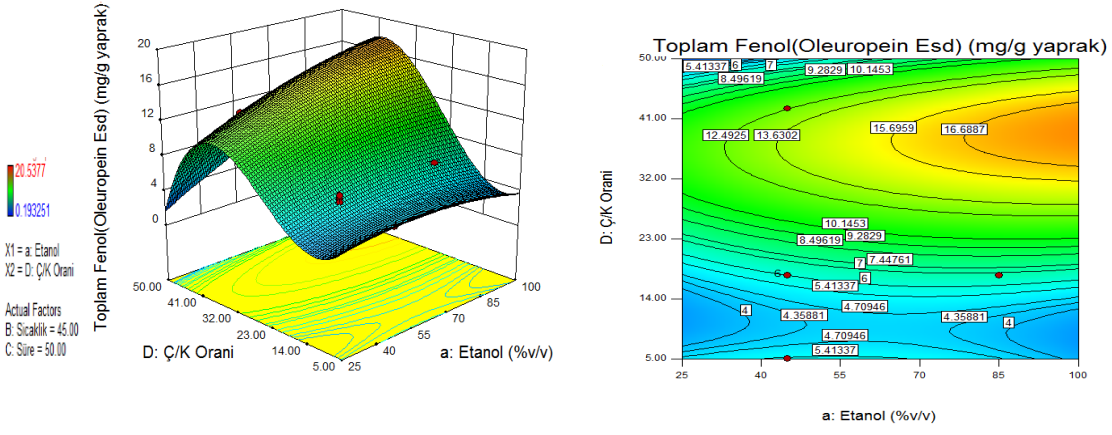
Model denkleminde EtOH oranı, süre ve çözücü/katı oranının önemli parametreler olduğu, EtOH-süre, süre-çözücü/katı oranı arasındaki ilişkinin ve sıcaklığın karesinin etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Diğer parametreler merkezde sabit tutulduğunda, iki faktör e ait seviyelerin toplam fenol (OLE) miktarı üzerine olan etkisi üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrileri ile gösterilmiştir.



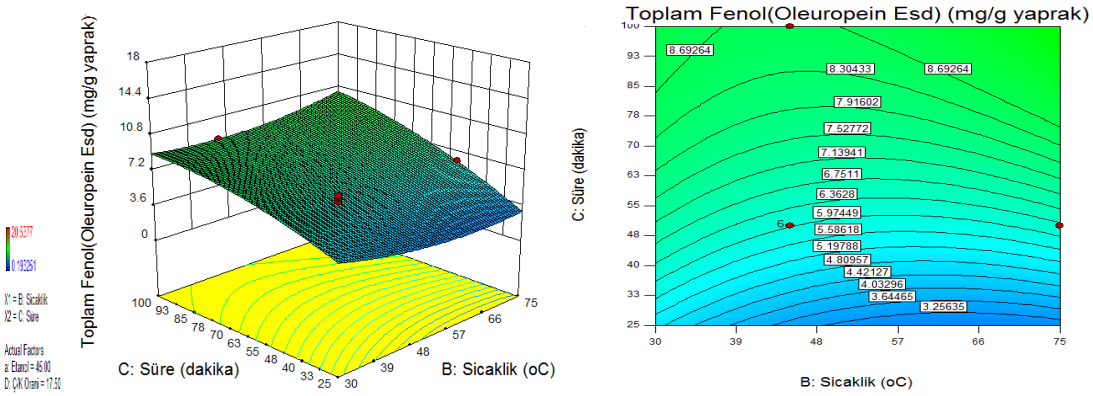
Şekil 5.93 EtOH, sıcaklık iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= + 6.16+ 1.59A+0.17 B -0,011AB +0.016A^2+0.74B^2



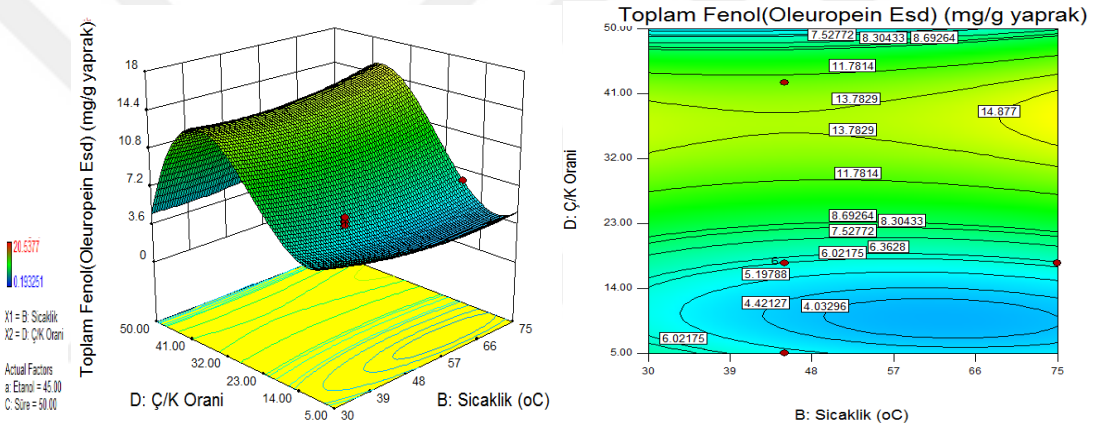
Şekil 5.94 EtOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=f(x)=+6.16+1.59A+1.80 C+1,21AC +0.016A^2 -0.064C^2



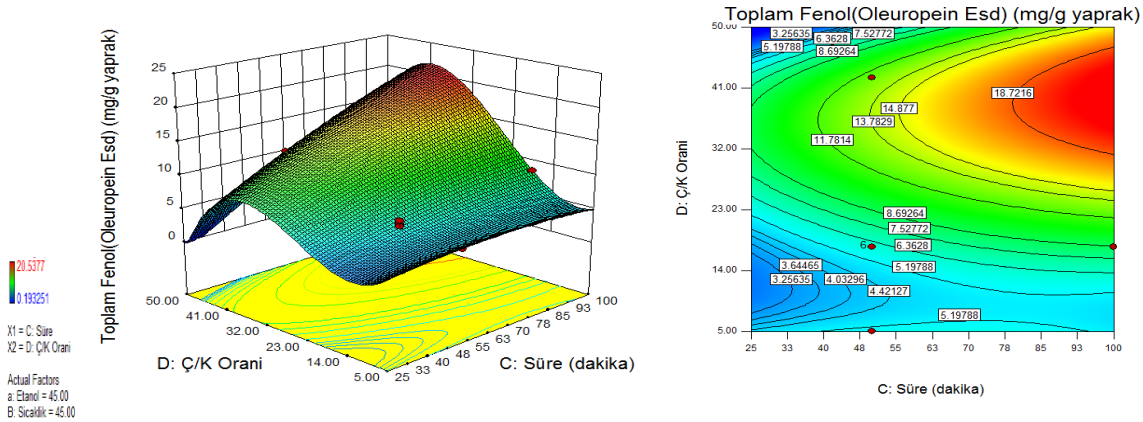
Şekil 5.95 EtOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)=+ 6.16+ 1.59A +2.90D + 0.72AD +0.016A^2 +0.96 D^2



Şekil 5.96 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= + 6.16 +0.17B+1.80 C +0.36BC +0.74B^2-0.064C^2



Şekil 5.97 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=f(x)=+ 6.16 +0.17* B +2.90* D +0.43*B*D+0.74*B^2 +0.96 * D^2



Şekil 5.98 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)=+ 6.16 +1.80C+2.90D +1.56CD -0.064C^2 +0.96D^2

Şekil 5.93'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-sıcaklık arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AB (EtOH-sıcaklık) için p değeri 0,9844 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. EtOH yüzey profilinde cevap faktörüne pozitif etki ederken, sıcaklığın etkisi anlamsızdır. Şekil 5.94'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AC (EtOH-süre) için p değeri 0,0400 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profili bir plato görüntüsündedir ve EtOH ve süre cevap faktörüne pozitif etki etmektedir. Şekil 5.95'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (EtOH-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,2047 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır.Yüzey profilinde çözücü katı oranının daha fazla etkin olduğu görülmektedir. Şekil 5.96'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (sıcaklık-süre) için p değeri 0.5105 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde sıcaklık ve süre parametresi cevap faktörüne anlamlı etki vermemektedir. Şekil 5.97'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (sıcaklık-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,4407 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde sıcaklık parametresi cevap faktörüne etki etmezken, çözücü/katı oranı pozitif etki etmektedir. Şekil 5.98' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği süre-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı oduğunu göstermektedir. Modelde CD (süre-çözücü/katı oranı) için p değeri 0,0112 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde süre ve çözücü/katı oranı cevap faktörüne pozitif etki etmiştir.

5.4.3 Cevap Faktörü 3: Oleuropein miktarı (HPLC) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve oleuropein (HPLC) cevap faktörü için bulunan regresyon katsayılarının önemini belirlemek için faktörlerin (değişkenlerin) orta noktalarında yapılan bir dizi paralel deneyden yararlanılmış ve uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.21'de verilmiştir.

Çizelge 5.21 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda oleuropein (HPLC) cevap faktörü iç tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi,df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	406,62	14	29,04	5,27	**0,0014**	**geçerli**
A-EtOH	49,45	1	49,45	8,97	**0,0090**	
B-Sıcaklık	0,67	1	0,67	0,12	0,7322	
C-Süre	52,21	1	52,21	9,48	**0,0077**	
D-Ç/K Oranı	146,54	1	146,54	26,60	**0,0001**	
AB	0,29	1	0,29	0,053	0,8217	
AC	14,39	1	14,39	2,61	0,1269	
AD	10,56	1	10,56	1,92	0,1865	
BC	1,62	1	1,62	0,29	0,5951	
BD	1,25	1	1,25	0,23	0,6410	
CD	46,84	1	46,84	8,50	**0,0106**	
A^2	0,42	1	0,42	0,076	0,7864	
B^2	18,27	1	18,27	3,32	0,0886	
C^2	0,15	1	0,15	0,027	0,8722	
D^2	16,27	1	16,27	2,95	0,1063	
Arta Kalan	82,64	15	5,51			
Uyum Eksikliği	81,21	10	8,12	28,25	**0,0660**	**g. değil**
Hata	1,44	5	0,29			
Düzeltilmiş top	489,26	29				

Önemli Model Terimleri	**A, C, D ,CD**
R^2 : 0,8311	R^2_{Adj}: 0,6734

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8311 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 83,11 açıklanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, uyum eksikliği için F testi değeri 0,0660 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu sonuç elde edilen model denklemin oleuropein (HPLC) miktarı (mg/g yaprak) için EtOH ile ekstraksiyonda incelenen bağımsız değişkenlerin (EtOH oranı, sıcaklık, süre, çözücü/katı oranı) ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Tasarım kullanılarak 30 deneysel çalışma ile elde edilen deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmış ve bulunan regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle;

$Y_{Oleuropein}$= 5,65+ 1,44A + 0,17B + 1,47C + 2,79D + 0,13AB + 0,95AC + 0,81AD + 0,32BC + 0,28BD + 1,71CD + 0,12A^2 + 0,81B^2 + 0,073C^2 + 1,00D^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{Oleuropein}$= 20,809-0,127A –0,401B - 0,172C – 0,487D + 4,485.10^{-4}AB + 1,896.10^{-3} AC + 3,250 10^{-3}AD + 8,498.10^{-4}BC + 1,489.10^{-3}BD + 5,475.10^{-3}CD + 3,064.10^{-3} A^2 + 3,595.10^{-3} B^2 + 1,163.$10^{-3}$$C^2$ + 6,381.$10^{-3}$$D^2$

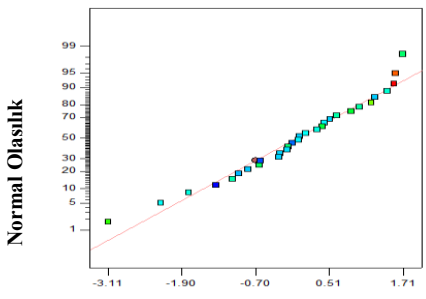
Bu durumda model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model:

Kodlanmış değerlerle;
$Y_{Oleuropein}$= 5,65 + 1,44A + 1,47C + 2,79D + 1,71CD

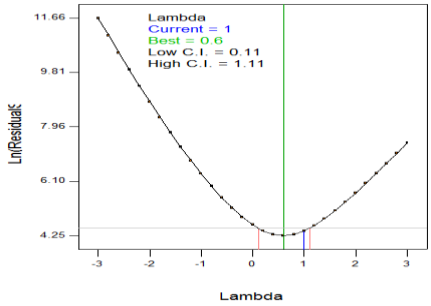
Gerçek değerlerle;

$Y_{Oleuropein}$=20,809 - 0,127 A – 0,172C – 0,487 D + 5,475.10^{-3}CD

Cevap faktörü 3, Oleuropein (HPLC)'nin maksimizasyonu için hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek amacı ile çizilen artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.99'da verilmiştir.

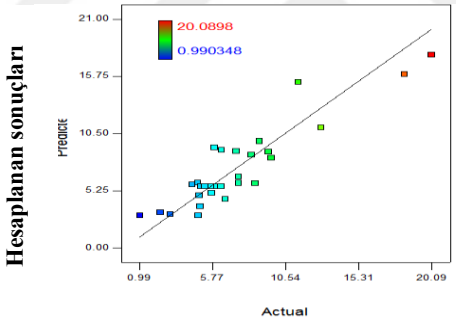


Şekil 5.99 Oleuropein (HPLC) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği



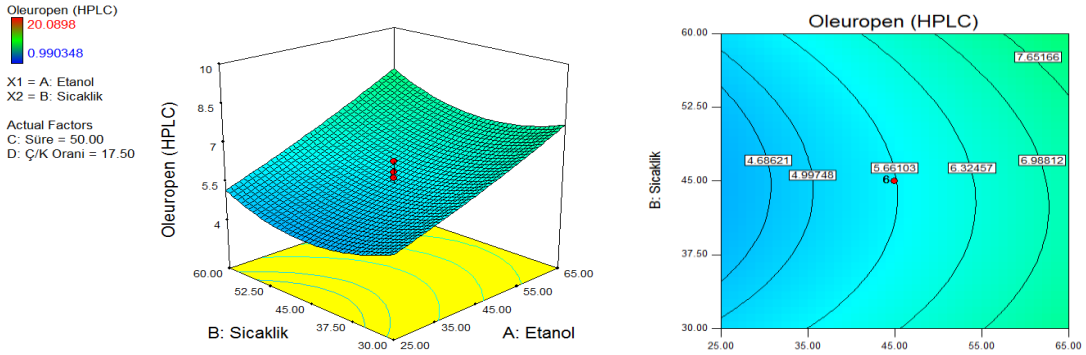
Şekil 5.100 Box-Cox grafiği

Şekil 5.100'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln'i ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş elde edilen verilere göre λ=0,60 bulunmuş ve cevap değeri için çalışmanın %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların, kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.101'de verilmiştir.

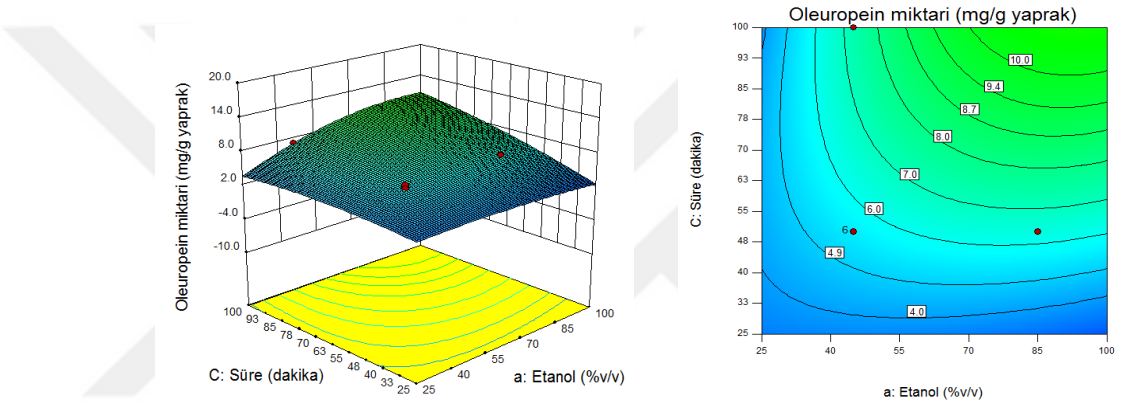


Şekil 5.101 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

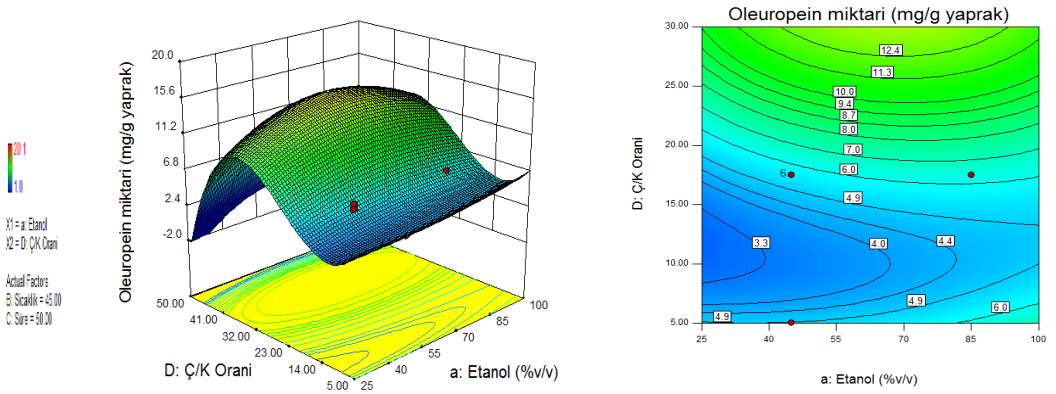
Model denkleminde EtOH oranı, süre, çözücü/katı oranı ve süre-çözücü/katı oranı etkileşiminin önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Diğer parametreler merkezde sabit tutulduğunda, iki faktöre ait seviyelerin Oleuropein (HPLC) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile aşağıda gösterilmiştir.



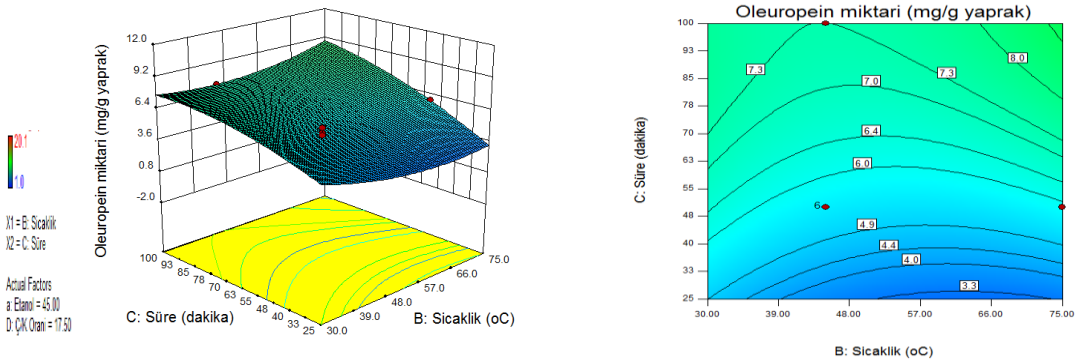
Şekil 5.102 EtOH, sıcaklık iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= + 5,65+ 1.44A+0.17B +0.13AB +0.12A^2+0.81B^2



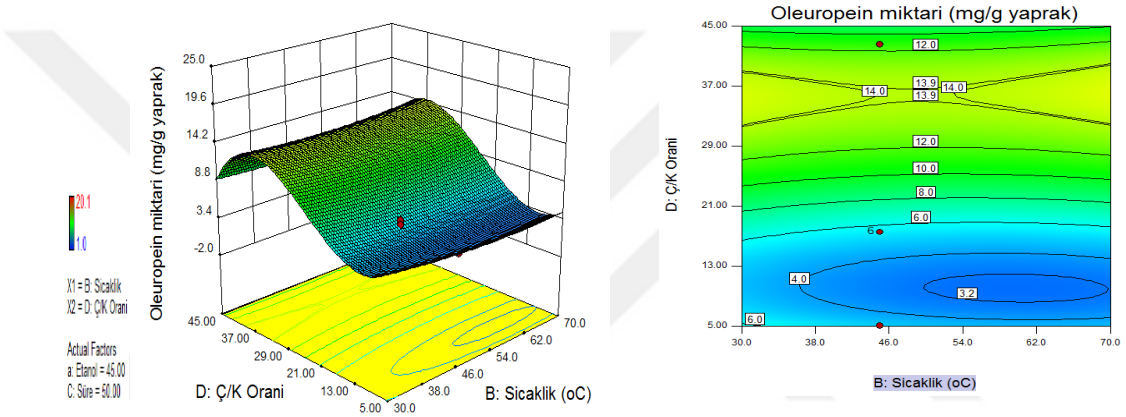
Şekil 5.103 EtOH-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= + 5,65+ 1.44A +1,47C +0.95AC +0.12A^2 +0.073C^2



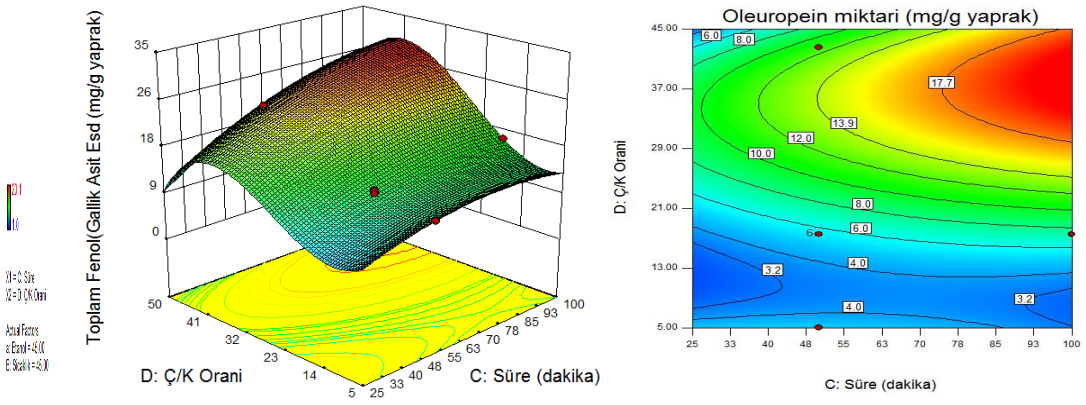
Şekil 5.104 EtOH-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= + 5,65+ 1.44A +2.79D + 0.81AD +0.12A^2 +1.00D^2



Şekil 5.105 Sıcaklık-süre iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= + 5,65 +0.17B+1,47C +0.32BC+ +0.81B^2+0.073C^2



Şekil 5.106 Sıcaklık-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein}$ =f(x)= + 5,65 +0.17B +2.79D + 0.28BD +0.81B^2 +1.00D^2



Şekil 5.107 Süre-çözücü/katı oranı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= + 5,65 +1,47C +2.79 D +1.71CD +0.073C^2+1.00D^2

Şekil 5.102'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-sıcaklık arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir.AB (EtOH-sıcaklık) için p değeri (0,8217) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde EtOH cevap faktörüne anlamlı bir pozitif etki verirken, sıcaklığın bir etkisi gözlenmemiştir. Şekil 5.103'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (EtOH-süre) için pdeğeri (0,1269) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde EtOH ve süre parametresi cevap faktörüne pozitif etki etmektedir. Kontür yüzey grafiğinden süre parametresinin çalışma koşullarının uygun olmadığı, daha uzun ekstraksiyon süresine ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir. Şekil 5.104'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (EtOH-çözücü/katı oranı) için p değeri (0,1865) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde çözücü/katı oranının EtOH'e göre daha anlamlı pozitif etki verdiği görülmektedir. Yüzey profili bir plato bölgesi oluşturmuştur. Şekil 5.105'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-süre arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (sıcaklık-süre) için p değeri (0,5951) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde süre parametresi cevap faktörüne pozitif etki etmektedir. Şekil 5.106'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (sıcaklık-çözücü/katı oranı) için p değeri (0,6410) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde sıcaklık parametresi cevap faktörüne etki etmezken, çözücü/katı oranı pozitif etki etmektedir. Şekil 5.107'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği sıcaklık-çözücü/katı oranı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Model denklemi ile uyumludur. Modelde CD (süre-çözücü/katı oranı) için p değeri (0,0106) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde süre parametresi ve çözücü/katı oranı cevap faktörüne pozitif etki etmiştir. Yüzey profili bir maksimum plato bölgesini işaret etmektedir.

5.4.4 EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonu için optimizasyon çalışması

EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonun, deneysel tasarım çalışmaları sonucu üç cevap faktörüne karşı alınan ANOVA sonuçlarında elde edilen kesinlik sonuçları çalışmanın yeterli veri ile tamamalandığını göstermiştir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranları her bir cevap fonksiyonu için (toplam fenol-GAE; toplam fenol-OLE; oleuropein-HPLC) sırası ile 10,858;10,626 ve 8,887 dir. Bu değerler yeterli sinyale işaret etmektedir. Araştırmanın bu aşamasında, optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Optimizasyon kapsamında; doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve kısıtlanmış optimizasyon uygulanarak çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan Box-Wilson'un dik yokuş yöntemi, doğrusal bir regresyon model ile açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, bağımsız değişkenleri minimize eden, maksimum miktarda toplam fenol (GAE ve OLE eşd.) ve oleuropeinin (HPLC) elde edildiği şartlar gözönüne alınarak optimizasyon yapılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır. Dört bağımsız değişken için, Pareto optimal sistemi kullanılmıştır. Çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümü için desirability değerlendirilmiştir. Optimizasyonda desirability çalışmaları sonucu, elde edilen çözüm kümesi aşağıda verilmiştir.

Number	Etanol	Sicaklik	Süre	Ç/K Orani	Toplam Feno	Toplam Feno	Oleuropein m	Desirability	
1	25.000	30.000	75.000	5.000	9.124	3.848	4.494	1.000	
2	25.000	30.000	75.000	30.000	16.639	8.365	9.147	1.000	
3	45.000	45.000	50.000	17.500	13.748	6.003	5.510	1.000	
4	65.000	30.000	75.000	5.000	11.825	6.298	4.742	1.000	
5	25.000	30.000	25.000	30.000	15.432	7.345	7.157	1.000	
6	45.000	45.000	50.000	42.500	23.481	12.465	11.359	1.000	
7	65.000	60.000	75.000	5.000	16.028	7.508	7.133	1.000	
8	65.000	30.000	25.000	5.000	10.102	5.071	5.366	1.000	
9	25.000	60.000	25.000	5.000	8.033	4.055	4.563	1.000	
10	25.000	60.000	75.000	30.000	21.021	12.924	12.553	1.000	
11	65.000	30.000	75.000	30.000	25.867	18.489	18.008	1.000	
12	25.000	30.000	25.000	5.000	8.410	4.822	5.097	1.000	
13	65.000	30.000	25.000	30.000	19.050	9.549	9.924	1.000	
14	65.000	60.000	25.000	5.000	14.375	6.423	6.919	1.000	
15	45.000	45.000	100.000	17.500	16.039	8.620	7.292	1.000	
16	25.000	60.000	75.000	5.000	8.077	3.356	3.284	1.000	
17	25.000	60.000	25.000	30.000	17.383	8.852	8.851	1.000	
18	65.000	60.000	25.000	30.000	19.893	9.268	9.095	1.000	
19	62.500	58.500	71.250	28.000	26.851	17.847	17.528	1.000	Selected
20	45.000	45.000	50.000	5.000	12.684	5.507	4.940	1.000	

Optimim koşullar; 62,50 (v/v) EtOH, 58,50 ºC Sıcaklık, 71,250 dk Süre, 28 Ç/K oranı olarak belirlenmiştir.

Deney doğrulama (experimental verification) cevap yüzey yöntemi ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için yapılan üç tekrarlı deney doğrulama sonuçlarından, Toplam Fenol (GAE), Toplam Fenol (OLE eşd.) ve Oleuropein miktarı sırası ile **26,85 mg/g yaprak, 17,85 mg/g yaprak, 17,53 mg/g yaprak** ve standart sapma değerleri sırasıyla **1,01; 0,72 ve 0,71** olarak bulunmuştur.

5.4.5 EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi

Ses ötesi dalganın (ultrasonik dalga) EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonuna olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla; EtOH/H_2O çözücülü ekstrakların optimal bölgede ve zorlanmış bölgede yapılan çalışmaları; aynı zamanda Everest Cleanex 911 model ultrasonik banyo (220V,50 Hz) ile ses ötesi dalga etkisi verilerek incelenmiştir. Ses ötesi dalga etkisi ile yapılan çalışmalara ait koşullar ve karşılaştırmalar çizelge 5.22'de verilmiştir.

Çizelge 5.22 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ses ötesi dalga (ultrasonik banyo) uygulaması nın cevap değişkenleri üzerine etkisi

Koşullar	T.Fenol (GAE.)	T. Fenol (GAE) Ses Ötesi Dalga Uygulanmış	T.Fenol (OLE)	T. Fenol (OLE.) Ses Ötesi Dalga Uygulanmış	Oleuropein (HPLC)	Oleuropein(HPLC) Ses Ötesi Dalga Uygulanmış	T.Fenol (GAE) Fark,%	Toplam Fenol (OLE) Fark %	Oleuropein (HPLC) Fark, %
76,0 v/v EtOH / 59,5 °C / 79,3 dk. / 3,9 Ç-K oranı	7,40	7,71	3,62	3,77	2,37	2,53	4,11	4,21	6,8
62,1 EtOH / 71,7 °C / 87,1 dk. / 5,3 Ç-K oranı	10,60	11,86	5,17	5,79	3,40	4,36	11,87	12,18	28
69,5 EtOH / 74,8 °C / 65,6 dk. / 3,1 Ç-K oranı	5,96	6,18	2,91	3,02	1,12	2,30	3,74	3,82	104,7
59,8 EtOH / 74,8 °C / 93,96dk. / 5,2Ç-K oranı	9,77	10,14	4,75	4,94	3,26	3,58	3,83	3,93	9,9
30,3 EtOH / 20,2°C / 84,4 dk. / 15,2 Ç-K ranı	15,8	22,59	7,42	10,83	2,18	5,56	43,36	46,05	155,6
75,2 EtOH / 36,4 °C / 83,7 dk. / 8,6 Ç-K oranı	12,0	17,74	5,76	8,63	3,73	5,09	47,69	49,71	36,6

Çizelge 5.22 EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ses ötesi dalga (ultrasonik banyo) uygulaması nın cevap değişkenleri üzerine etkisi (devam)

65 EtOH / 60 °C / 75 dk. /5Ç-K oranı	8,05	9,98	3,90	4,86	2,83	3,72	23,97	24,74	31,5
65 EtOH / 60 °C / 25 dk. /5Ç-K oranı	8,20	9,64	3,97	4,69	2,58	3,23	17,58	18,14	25
65 EtOH / 30 °C / 75 dk. /5Ç-K oranı	7,49	8,88	3,62	4,27	2,45	2,99	18,43	17,99	22,6
62,5 EtOH / 58,5 °C /71,25 dk. / 28 Ç-K	26,85	22,26	17,6	15,60	17,5	15,3	-21,26	-11,36	-12,8
25 EtOH / 30 °C / 75 dk. /5 Ç-K oranı	6,18	9,45	2,96	4,60	1,48	2,59	52,88	55,13	74,3

Ses ötesi dalgaya maruz kalan bitkisel dokularda fiziksel değişimler meydana gelmiş ve ultrasonik dalga etkisiyle hücre duvarları hasar görerek doku içindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin ortaya çıkması kolaylaşmıştır. Çalışma sonuçları da bu anlamda zeytin yaprağından EtOH/H_2O çözücüsü ile polifenolik maddelerin ekstraksiyonunda, toplam fenol miktarı (GAE ve OLE) açısından anlamlı bir fark olmadığını, oleuropein miktarı açısından anlamlı bir fark olduğunu işaret etmektedir (veri çifti t testi, EK2a-c). Toplam fenol (GAE) miktarında %52,9 toplam fenol (OLE) miktarında %55,1 oleuropein (HPLC) miktarında % 155,6 oranlarında artış sözkonsudur. Bu durumun özellikle düşük EtOH ve yüksek çözücü/katı oranında olması dikkat çekicidir. EtOH oranı biraz düşürülüp, çözücü/katı oranı belirgin bir şekilde azaltıldığında (25EtOH /5 Ç-K oranı), toplam fenol (GAE) %52,88, toplam fenol (OLE) %55,13 oranlarında kalırken, oleuropein (HPLC) ise %74,3 oranına gerilemiştir. Bir başka dikkat çekici durum ise yüksek EtOH, düşük çözücü/katı oranında (69,5EtOH/3,1Ç-K oranı), toplam fenol (GAE) miktarında %3,74 toplam fenol (OLE) miktarında %3,82 gibi düşük bir pozitif değişim gözlenirken, oleuropein (HPLC) miktarında %104,7 gibi dikkat çekici bir pozitif iyileşmenin olmasıdır. Bu sonuç, zeytin yaprağından oleuropeinin ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga ekstraksiyonu için, düşük çözücü/katı oranı çalışma koşulu içermesi açısından, avantajlı ve önemlidir. EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunun optimum koşullarında ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi cevap değişkenlerini negatif etkilemiştir.

EtOH/H_2O çözücü sisteminde ses ötesi dalga ile toplam fenol ve oleuropein (HPLC) miktarı üzerinde, bazı koşullar dışında pozitif etki etmesi nedeniyle, optimum nokta çevresi ve zorlanmış koşullarda toplam antioksidan aktivitenin etkilenip etkilenmeyeceği ve antioksidan aktivitenin hangi oranda değişeceği belirlenmiştir. Bu amaçla aynı koşullarda ses ötesi dalga uygulanmış EtOH-H_2O çözücülü ekstraktlarda toplam antioksidan aktivitesi tayin edilmiş ve alınan sonuçlar çizelge 5.23'de verilmiştir.

Çizelge 5.23 Ses ötesi dalga uygulanmış ve uygulanmamış EtOH/H_2O çözücülü ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite değişimi

Koşullar	Ses ötesi dalga uygulanmamış		Ses ötesi dalga uygulanmış	
	Abs.	%İnhibisyon	Abs.	%İnhibisyon
76,0 EtOH / 59,5 °C /79,3 dk./ 3,9 Ç-K	0,117	93,02	0,125	92,54
62,5 EtOH / 58,5 °C /71,25 dk. / 28 Ç-K	0,105	93,74	0,139	91,71
69,5 EtOH / 74,8 °C /65,6 dk./ 3,1 Ç-K	0,154	90,81	0,183	89,08
59,8 EtOH / 74,8 °C /93,9 dk./ 5,2 Ç-K	0,115	93,14	0,107	93,62
30,3 EtOH / 20,2 °C /84,4 dk. / 15,2 Ç-K	0,058	96,54	0,057	96,60
75,2 EtOH / 36,4 °C /83,7 dk./ 8,6 Ç-K	0,072	95,70	0,088	94,75
65 EtOH / 60 °C / 75 dk./ 5 Ç-K	0,093	94,45	0,099	94,09
65 EtOH / 60 °C / 25 dk./ 5 Ç-K	0,117	93,02	0,117	93,02
65 EtOH / 30 °C / 75 dk./ 5 Ç-K	0,126	92,48	0,14	91,65
65 EtOH / 60 °C / 75 dk./ 15 Ç-K	0,093	94,45	0,075	95,53
25 EtOH / 30 °C /75 dk./ 5 Ç-K	0,085	94,93	0,11	93,44
25 EtOH / 60 °C /75 dk./ 5 Ç-K	0,087	94,81	0,13	92,24
Kontrol (EtOH)	1,676			
Oleuropein		55,8		

Elde edilen sonuçlar; ses ötesi dalga etkisi verilmesinin EtOH/H_2O çözücülü ekstraktlarda antioksidan aktivitesinde değişime neden olup, bu değişimin % inhibisyonu azaltan yönde, negatif etkili olduğunu göstermiştir (veri çifti t testi, EK2d).

Bu çalışmalar ışığında; sabit frekans ve güçte bile ses ötesi dalganın etkili olması, değiştirilebilir frekans ve güçte ses ötesi dalga uygulamasının, ekstraksiyonu geliştirecek yönde bir durum yaratacağı görüşünü doğurmuştur. Bu amaçla, zeytin yaprağından polifenollerin ekstraksiyonu için yeni bir yöntem geliştirilmesi ve optimum koşullarının belirlenmesi için ultrasonik prob uygulamasına geçilmiştir. Ultrasonik prob için yapılan

deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmaları kapsamında, toplam fenol (GAE ve OLE) ve oleuropein miktarı çoklu amaç fonksiyonu ile bir arada değerlendirilirken, toplam antioksidan aktivitenin farklı bir amaç fonksiyonu kapsamında değerlendirilerek tek cevap faktörlü optimizasyon yapılmasına karar verilmiştir.

5.5 EtOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Prob Ekstraksiyonunda Üç Amaçlı Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması

EtOH-H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob etkisi ile kurutulmuş öğütülmüş zeytin yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonuna dayalı çalışma kapsamında; deney tasarımında sisteme etki eden değişkenlerden en önemli olanların tespiti, ürün özellikleri üzerinde etkileşimlerinin etkin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Deney tasarım metotlarından biri olan cevap yüzey metodu ile sistemin optimum yanıtı, yani ürün özelliklerini optimuma ulaştıracak değişkenlerin değerleri tespit edilmiştir. Cevap yüzey metodu ile beş farklı değişken yardımı ile tanımlanan yüzeylerin, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin yardımı ile modellemesi yapılmıştır. Süreçlerin optimizasyonunda sistemin performansını veya ürün kalitesini belirleyen üç yanıtla eş zamanlı çalışılmıştır..

Zeytin yaprağından EtOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ile polifenollerin ekstraksiyonu için, beş bağımsız değişkenin çalışma aralıkları belirlenirken, EtOH-H_2O çözücü optimizasyonuna ait optimum koşullardan yararlanılmıştır. EtOH-H_2O çözücü sistemine ait optimum koşullar; bölüm 5.4.4'de **62,50 (v/v) EtOH, 58,50 ^oC Sıcaklık, 71,250 dk Süre, 28 Ç/K Oranı** olarak verilmiştir. Ultrasonik banyo etkisinin sonuçları dikkate alındığında, sıcaklık ve çözücü/katı oranının yüksek değerlerde olmasının, ultrasonik probla ses ötesi dalga uygulaması ile negatif etkisi olacağı göz önüne alınmıştır. Probun düşük sıcaklıklarda da etkin olması nedeni ile sıcaklık 30 ^oC'da sabit tutularak, değişken olarak değerlendirilmemiştir. Prob uygulamalarında en önemli etkenin enerji yoğunluğu olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kontrol edilmesi gereken temel parametreler süre ve güç olarak karşımıza çıkmaktadır. Ses ötesi dalganın çözücü/katı oranı 28 (**50 mL EtOH/H_2O çözücü karışımı /1,785 g yaprak)**'de sabit tutularak, çalışma probun etki ucunun girebileceği açıklıkta boşluk bulunan ağzı kapalı cam beherler içinde yapılmıştır. Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi, ultrasonik probun dalga yayan yüzeyinin yakınlarında

maksimum ultrasonik güç oluşmaktadır. Proba olan uzaklık arttıkça ultrasonik yoğunluk (etki) azalmaktadır. Bu nedenle prob pozisyonu bir diğer değişken olarak seçilmiştir. EtOH'ün çalışma aralığı belirlenirken, bir önceki optimizasyon çalışmasının verisi orta nokta olacak şekilde alınmış, maksimizasyonu en iyi olan aralık seçilmiştir. En temel kısıtlar ise ultrasonik prob cihazından kaynaklanmıştır.

Deneysel tasarımda, D-optimal tasarım çalışıldığından tasarım, belirtilen model katsayılarının tahminiyle ilgili varyansı en aza indirecek şekilde dizayn noktaları seçmek için geliştirilmiştir. Bir D-optimal tasarım, $(X'X)^{-1}$ matrisinin determinantını en aza indirir. Bu durum katsayılar için güven elipsoidinin hacmini en aza indirecektir.

Beş faktör için, kuadretik modelde köşe faktöriyel noktaları, kenarların merkezleri, kısıtlanmış düzlemsel ağırlık merkezleri, eksenel kontrol karışım noktaları, iç noktalar, tüm ağırlık merkezleri hesaplanmış ve 31 noktalı tasarım yapılmıştır.

Çizelge 5.24 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı

Sıralama ve Seviyeleri		
Faktörler (Bağımsız Değişkenler)	**+1**	**-1**
A: Genlik (amplitude)	89	32
B : SÖD uyg.süresi (dk) (irridation time)	15	1
C : EtOH %	80	50
D :Prob pozisyonu (cm)	4	1,5
E : Görev döngüsü (duty cycle)	1	0,3

EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob uygulanmış ekstraktlarda, ilk optimizasyon çalışmasında bağımlı değişken olarak;

y_1 : Toplam Fenol miktarı (GAE) mg/g yaprak,

y_2 : Toplam Fenol miktarı (OLE eşd.) mg/g yaprak,

y_3 : Oleuropein miktarı (HPLC) mg/g yaprak

belirlenmiştir.

5.5.1 EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonunda üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım

Çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları çizelge 5.25'de verilmiştir.

Çizelge 5.25 EtOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonunda üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları

Std	Run	Faktör1 A:Genlik %	Faktör2 B: SÖD uyg.süre dk	Faktör3 C:EtOH %	Faktör4 D:Prob pozisyonu cm	Faktör5 E:Görev döngüsü %	Cevap 1 T. Fenol (GAE) mg/g yaprak	Cevap 2 T. Fenol (OLE eşd). mg/g yaprak	Cevap 3 Oleuropein HPLC mg/g yaprak
1	18	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	5,81	1,95	0,58
2	4	89(+1)	15(+1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	5,32	2,05	0,66
3	7	89(+1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1,0(+1)	5,05	1,91	0,61
4	20	60,5(0)	1(-1)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	5,71	1,91	0,55
5	31	89(+1)	1(-1)	65(0)	1,5(-1)	0,3(-1)	3,71	1,24	0,58
6	13	32(-1)	1(-1)	65(0)	3,5(+1)	1,0(+1)	1,85	0,64	0,20
7	19	32(-1)	15(+1)	50(-1)	3,5(+1)	0,3(-1)	2,21	0,82	0,27
8	3	32(-1)	15(+1)	80(+1)	3,5(+1)	1,0(+1)	6,32	2,55	0,90
9	21	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	3,5(+1)	0,3(-1)	3,36	1,06	0,31
10	2	89(+1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	17,39	7,74	3,16
11	11	32(-1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	4,49	1,63	0,57
12	28	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	1,70	0,57	0,16
13	27	89(+1)	1(-1)	80(+1)	3,5(+1)	0,65(0)	5,88	1,99	0,60
14	26	32(-1)	8(0)	50(-1)	3,5(+1)	1,0(+1)	2,95	1,19	0,43
15	16	89(+1)	15(+1)	80(+1)	3,5(+1)	0,3(-1)	4,29	1,53	0,46
16	5	60,5(0)	15(+1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	3,29	1,36	0,54
17	12	32(-1)	8(0)	80(+1)	3,5(+1)	0,3(-1)	4,08	1,43	0,43
18	14	60,5(0)	15(+1)	50(-1)	1,5(-1)	1,0(+1)	5,09	2,26	0,99
19	6	32(-1)	8(0)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	1,98	0,71	0,23
20	1	32(-1)	8(0)	80(+1)	1,5(-1)	1,0(+1)	2,6	1,02	0,34
21	30	89(+1)	15(+1)	50(-1)	3,5(+1)	1,0(+1)	9,03	3,90	2,63
22	25	89(+1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	8,66	3,05	0,92
23	23	89(+1)	15(+1)	50(-1)	3,5(+1)	0,3(-1)	2,04	0,73	0,22
24	17	89(+1)	15(+1)	80(+1)	3,5(+1)	1,0(+1)	10,39	4,58	1,76
25	8	60,5(0)	1(-1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	6,09	2,09	0,79
26	10	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	3,77	1,27	0,38
27	22	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	5,43	1,77	0,51
28	15	89(+1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1,0(+1)	4,33	1,55	0,54
29	24	32(-1)	8(0)	80(+1)	3,5(+1)	0,3(-1)	6,11	2,10	0,62
30	9	89(+1)	1(-1)	80(+1)	3,5(+1)	0,65(0)	3,75	1,26	0,38
31	29	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	3,66	1,21	0,34

5.5.1.1 Cevap Faktörü 1:Toplam Fenol miktarı (GAE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi , Toplam fenol (GAE) cevap faktörü sonuçları ve uygulanan F testi ile regresyon modelin geçerliliğinin sınandığı Fischer'in F tablo değerlerinin ANOVA istatistiği, çizelge 5.26'da verilmiştir.

Çizelge 5.26 EtOH/H_2O çözücüsünde ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda Toplam fenol (GAE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi, df	Ortalamanın karesi	F Değeri	p-Değeri (P) > F	
Model	262,65	20	13,13	4,94	**0,0064**	**geçerli**
A-Genlik	29,69	1	29,69	11,18	**0,0074**	
B-SÖD uyg. süresi	7,2	1	7,2	2,71	0,1306	
C-EtOH	13,22	1	13,22	4,98	**0,0497**	
D-Prob pozisyonu	0,63	1	0,63	0,24	0,6362	
E-Görev döngüsü	24,35	1	24,35	9,17	**0,0127**	
AB	20,51	1	20,51	7,72	**0,0195**	
AC	0,57	1	0,57	0,21	0,6537	
AD	32,59	1	32,59	12,27	**0,0057**	
AE	38,61	1	38,61	14,53	**0,0034**	
BC	14,66	1	14,66	5,52	**0,0407**	
BD	$1,899.10^{-3}$	1	$1,899.10^{-3}$	$0,7149.10^{-4}$	0,9792	
BE	8,2	1	8,2	3,09	0,1094	
CD	4,59	1	4,59	1,73	0,2181	
CE	0,57	1	0,57	0,21	0,6541	
DE	0,021	1	0,021	$7,943.10^{-3}$	0,9307	
A^2	0,4	1	0,4	0,15	0,7065	
B^2	0,089	1	0,089	0,033	0,8585	
C^2	2,69	1	2,69	1,01	0,3381	
D^2	6,6	1	6,6	2,49	0,146	
E^2	15,89	1	15,89	5,98	**0,0345**	
Arta Kalan	*26,57*	*10*	*2,66*			
Uyum Eksikliği	*12,71*	*5*	*2,54*	*0,92*	*0,5366*	**g. değil**
Hata	*13,86*	*5*	*2,77*			
Düzeltilmiş top.	289,21	30				

Önemli Model Terimleri	**A,C,E,AB, AD, AE, BC, E^2**
R^2: 0.9081	R^2_{Adj} : 0.7244

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,9081 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 90,81 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin Toplam fenol (GAE) miktarı için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,5366 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda genlik, SÖD uyg. süresi, MeOH, prob pozisyonu ve görev döngüsü'ın toplam fenol miktarına (GAE) etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Tasarım kullanılarak 31 deneysel nokta çalışılarak deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanmış ve elde edilen regresyon katsayıları kullanılarak, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.Fenol/GallikAsit}$=4,21+1,32A+0,62B+0,79C+ 0,44D + 1,08E + 1,14AB - 0,21AC -2,02AD +1,76AE + 0,89BC - 0,014BD + 0,75BE -0,67CD + 0,19CE + 0,050DE + 0,37A^2 + 0,18B^2 + 1,23C^2 + 2,95D^2-2,88E^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$=23,296+0,018A–1,063B – 0,621C – 4,347D + 17,881E + 5,708.10^{-3}AB – 4,924.10^{-4}AC - 0,057AD + 0,176AE +8,490.10^{-3}BC - 1,565.10^{-3} BD + 0,307BE -0,036CD + 0,035CE + 0,113DE + 4,597.$10^{-3}$$A^2$ + 3,755.$10^{-3}$$B^2$ +5,462.$10^{-3}$$C^2$+ 1,887$D^2$-23,508$E^2$

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

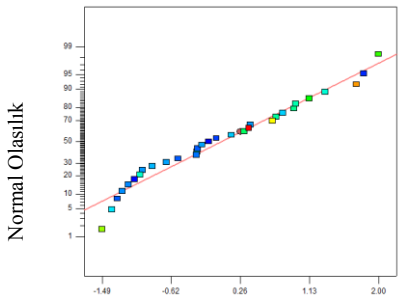
Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$=4,21+1,32A+0,79C +1,08E+1,14AB-2,02AD+1,76AE+0,89BC -2,88 E^2

Gerçek Değerlerle;

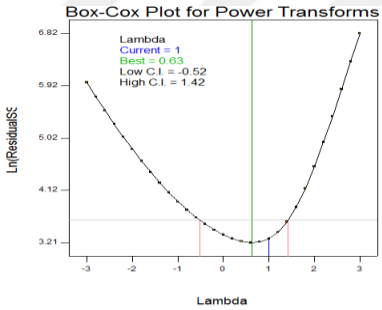
$Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$=23,296+0,018A -0,621C +17,881E+5,708.10-3AB -0,057AD+ 0,176AE + 8,490.10^{-3}BC -23,508E^2

Cevap faktörü 1 Toplam Fenol (GAE)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.108'de verilmiştir.



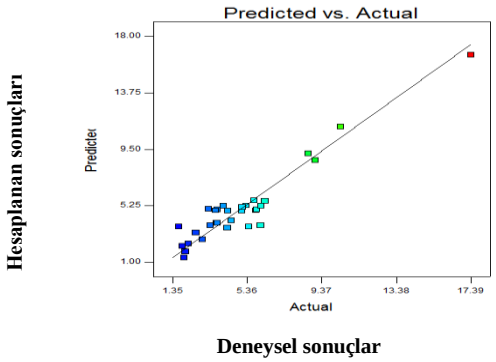
Şekil 5.108 Toplam Fenol miktarı (GAE) maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği

Normal olasılık (dağılım) grafiğinden; hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek amacı ile yararlanılmıştır.



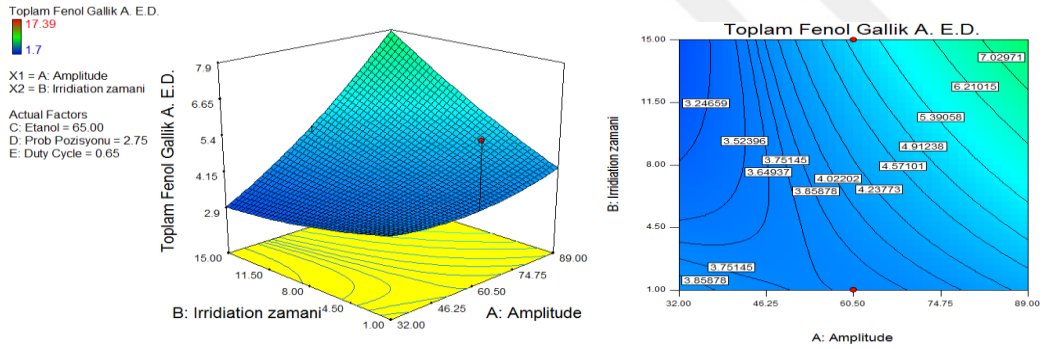
Şekil 5.109 Box-Cox grafiği

Şekil 5.109'da verilen Box-Cox grafiğinde artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,63 bulunmuş ve çalışmanın cevap değeri için çalışmanın %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.110'da verilmiştir.

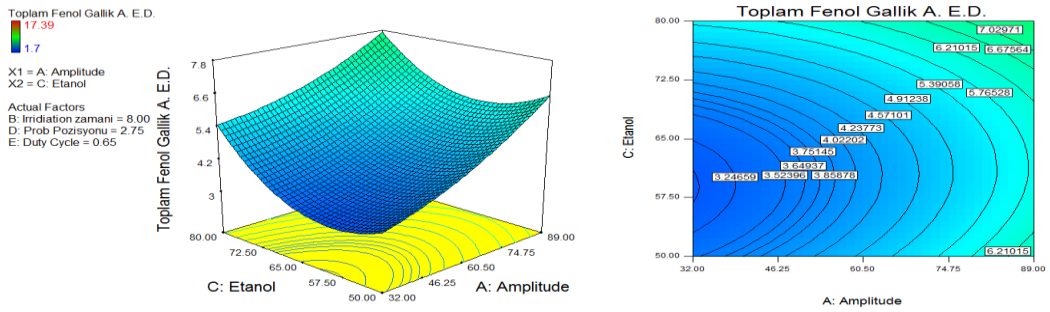


Şekil 5.110 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

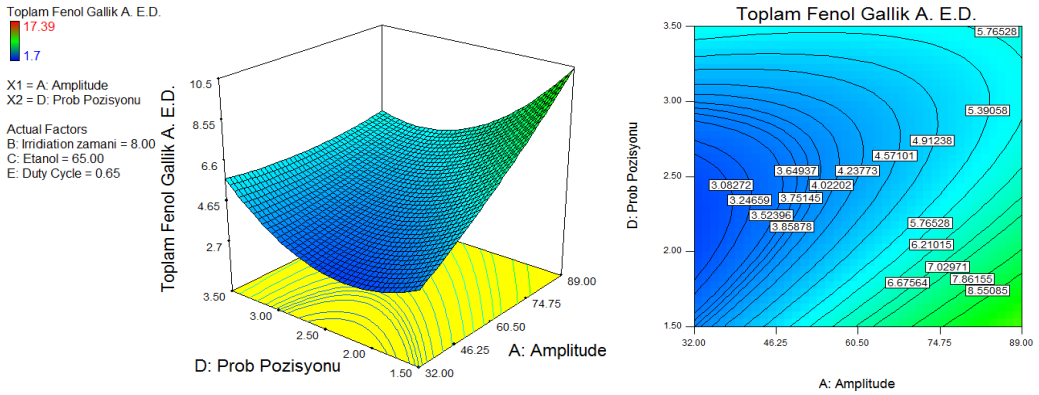
Model denkleminde genlik, EtOH ve görev döngüsü'nün önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uyg.süresi, genlik/prob pozisyonu, genlik/görev döngüsü, SÖD uyg.süresi /EtOH arasındaki ilişkinin ve görev döngüsü'nün karesel etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyesinin Toplam fenol (GAE) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



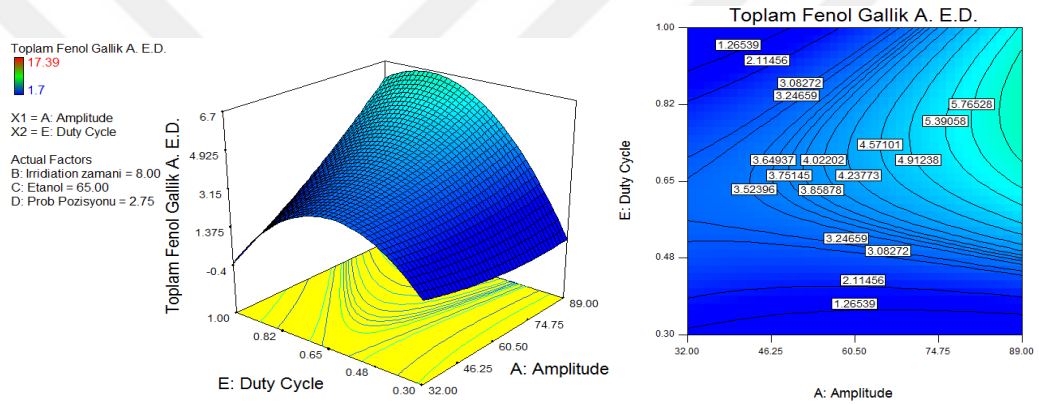
Şekil 5.111 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +4.21+1.32 A+0.62 B +1.14 A B- +0.37 A^2+0.18 B^2



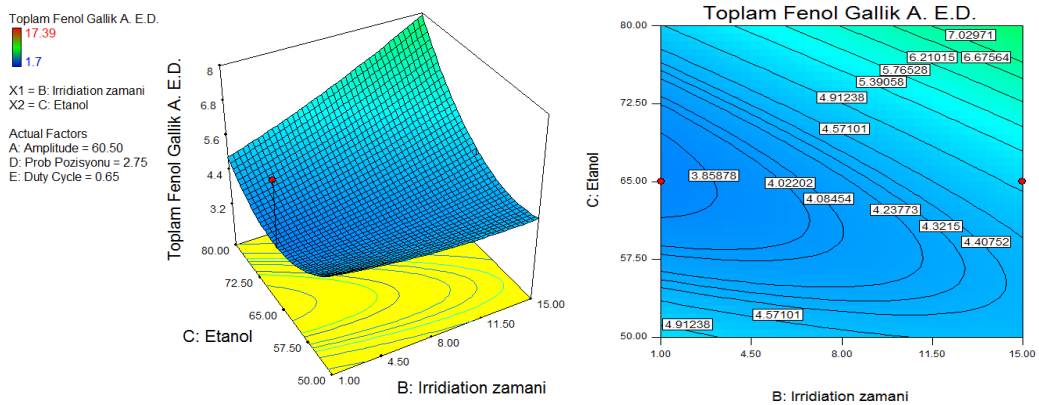
Şekil 5.112 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)=+4.21+1.32 A +0.79 C -0.21 AC +0.37 A^2 +1.23C^2



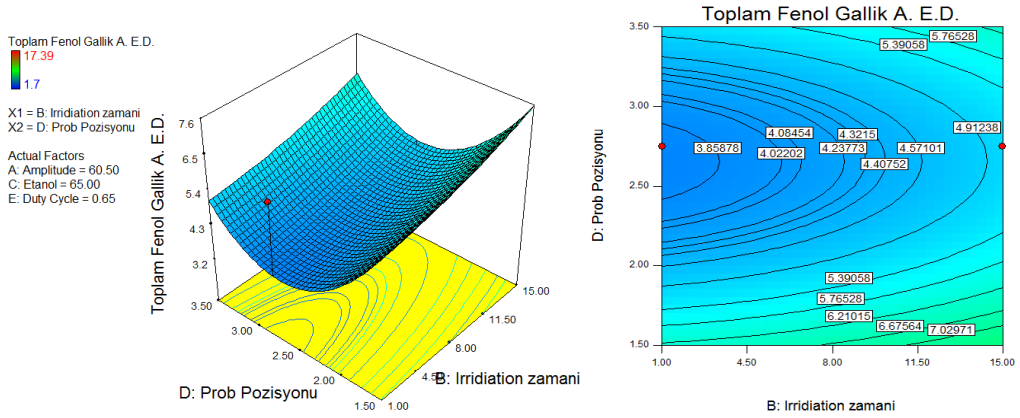
Şekil 5.113 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)=+4.21+1.32 A +0.44D -2.02 AD+0.37A^2 +2.95D^2



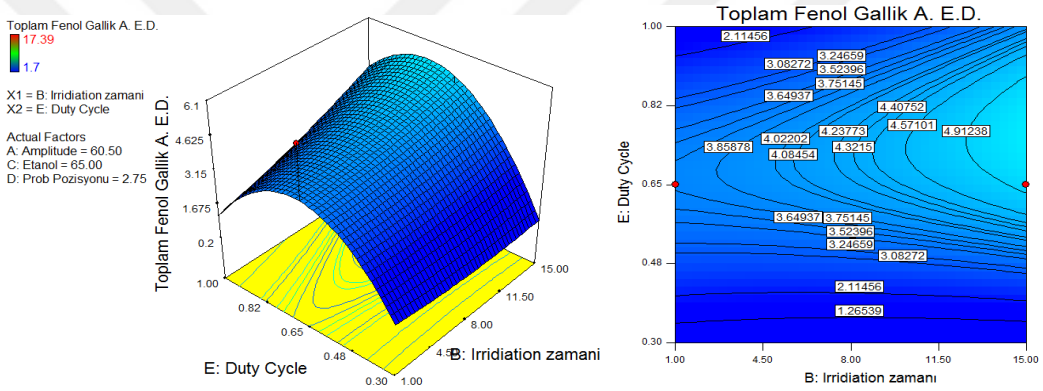
Şekil 5.114 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$=f(x) =+4.21+ 1.32 A +1.08 E +1.76AE+0.37 A^2 -2.88 E^2



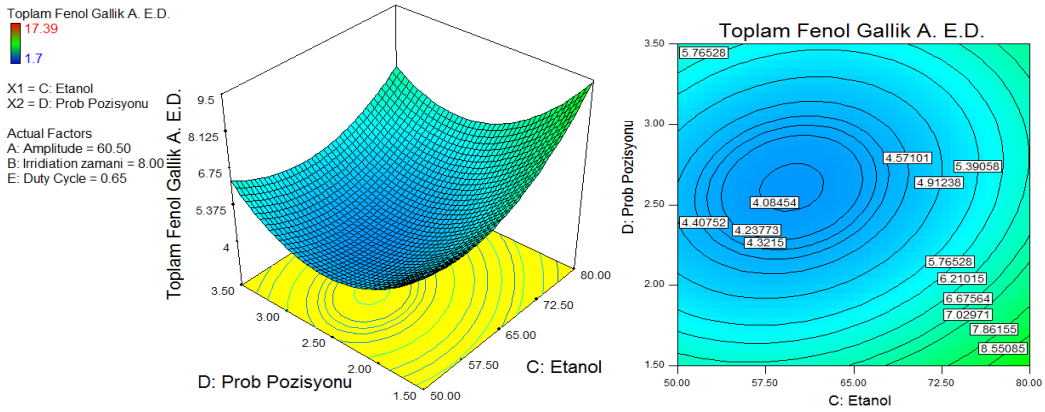
Şekil 5.115 SÖD uyg.süresi-MeOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)=+4.21 +0.62B+0.79 C +0.89B C +0.18 B^2+1.23C^2



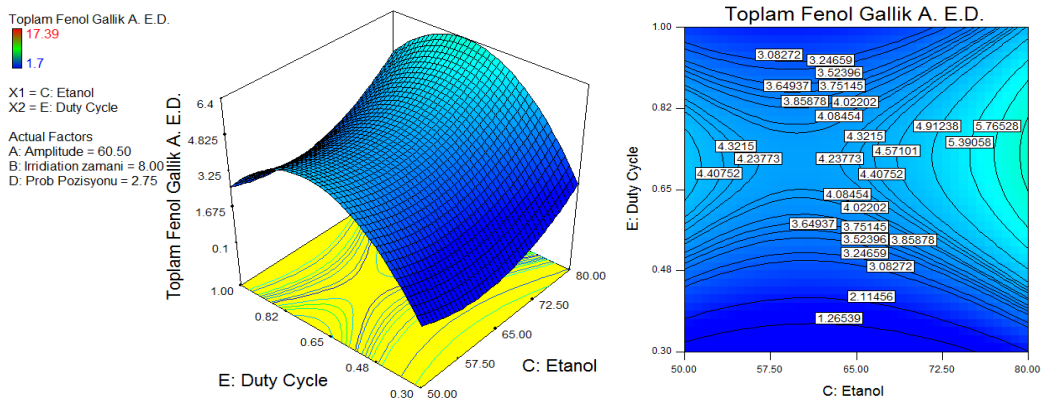
Şekil 5.116 SÖD uyg.süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +4.21 +0.62 B +0.44 DC-0.014B D +0.18 B^2 +2.95 D^2



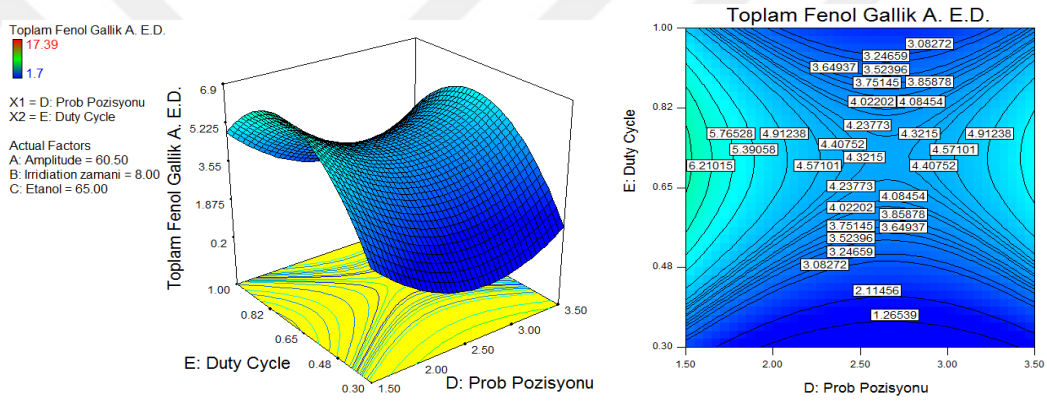
Şekil 5.117 SÖD uyg.süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x=+4.21 +0.62 B +1.08 E +0.75 B E +0.18B^2 -2.88E^2



Şekil 5.118 EtOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)=+4.21 +0.79 C+0.44 D -0.67C D +1.23C^2+2.95D^2



Şekil 5.119 EtOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)=+4.21 +0.79 C +1.08 E +0.19C E+ +1.23C^2-2.88 E^2



Şekil 5.120 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Gallik\ Asit}$ =f(x)= +2.94 -0.16 D+0.64E+0.50D E +2.66 D^2-2.97 E^2

Şekil 5.111'de genlik-SÖD uyg.süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir. Modelde AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için p değeri (0,0195) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Genlik ve SÖD uyg.süresinın cevap faktörüne minimum etkisi görülmektedir. Şekil 5.112'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (genlik-EtOH) için p değeri (0,6537) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Şekil 5.113'de genlik/prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir. Modelde AD (genlik/prob pozisyonu) için p değeri (0,0057) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Şekil 5.114'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri (0,0034) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey

profilinde plato görüntüsü ve maksimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.115'de SÖD uyg.süresi-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir. Modelde BC (SÖD uyg.süresi-EtOH) için p değeri (0,0407) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, minimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.116'da SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığı görülmektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu) için p değeri (0,9792) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.117'de SÖD uyg.süresi-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığı görülmektedir. Modelde BE (SÖD uyg.süresi-görev döngüsü) için p değeri (0,1094) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge maksimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.118'de, EtOH-prob pozisyonu etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artış göstermektedir. Modelde CD (EtOH-prob pozis yonu) için p değeri (0,2181) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.119'da, EtOH-görev döngüsü arasındaki etkileşimde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir. Modelde CE (EtOH-görev döngüsü) için p değeri (0,6541) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Şekil 5.120'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği prob pozisyonu-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış yada düşüş göstermektedir. Modelde DE (prob pozisyonu-görev döngüsü) için p değeri (0,9307) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır.

5.5.1.2 Cevap Faktörü 2:Toplam Fenol miktarı (OLE) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve toplam fenol (OLE) cevap faktörü için sonuçlar ile birlikte ve uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden, regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.27'de verilmiştir.

Çizelge 5.27 EtOH/H_2O çözücüsünde ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda toplam fenol (OLE) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi, df	Ortalamanın karesi	F Değeri	p-Değeri (P) > F	
Model	55,36	20	2,77	7,37	**0,0013**	**geçerli**
A-Genlik	5,42	1	5,42	14,43	**0,0035**	
B-SÖD uyg.süresi	2,91	1	2,91	7,74	**0,0194**	
C-EtOH	1,55	1	1,55	4,12	0,0699	
D-Prob pozisyonu	0,069	1	0,069	0,18	0,6767	
E-Görev döngüsü	6,47	1	6,47	17,24	**0,0020**	
AB	3,75	1	3,75	9,98	**0,0102**	
AC	0,032	1	0,032	0,086	0,7755	
AD	5,01	1	5,01	13,35	**0,0044**	
AE	7,79	1	7,79	20,75	**0,0010**	
BC	2,5	1	2,5	6,65	**0,0275**	
BD	0,051	1	0,051	0,13	0,7210	
BE	2,55	1	2,55	6,79	**0,0262**	
CD	0,7	1	0,7	1,87	0,2019	
CE	0,32	1	0,32	0,86	0,3744	
DE	0,018	1	0,018	0,047	0,8333	
A^2	0,3	1	0,3	0,79	0,3950	
B^2	0,014	1	0,014	0,037	0,8522	
C^2	0,15	1	0,15	0,39	0,5450	
D^2	0,99	1	0,99	2,63	0,1359	
E^2	1,98	1	1,98	5,28	**0,0444**	
Arta Kalan	3,75	10	0,38			
UyumEksikliği	2,2	5	0,44	1,42	0,3544	**g. değil**
Hata	1,55	5	0,31			
Düzeltilmiş top.	59,12	30				

Önemli Model Terimleri	**A, B, E, AB, AD, AE, BC, BE, E^2**
R^2 :0.9365	R^2_{Adj} :0.8095

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,9365 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 93,65 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin toplam fenol (OLE) tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini göstermektedir.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,3544 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu durum; EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda genlik, SÖD uyg. süresi, EtOH, prob pozisyonu ve görev

döngüsü'nün toplam fenol (OLE eşd) miktarına etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Tasarımde 31 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak elde edilen regresyon katsayıları kullanılmış ve yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=1,54+0,56A+0,40B+0,27C+0,14D+0,55E+0,49AB-0,050AC-0,79AD+0,79AE + 0,37BC-0,071BD+0,42BE-0,26CD+0,4CE-0,045DE+0,32A^2+0,072B^2+0,29C^2+1,14D^2-1,02E^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=+7,461-0,030A-0,431B-0,148C-1,517D+4,752E+2,44.10^{-3}AB-1,173.10^{-4}AC-0,022AD+0,079AE+3,503.10^{-3}BC-8,084.10^{-3}BD+0,171BE-0,0139CD+0,027CE-0,103DE +3,964.$10^{-4}$$A^2$+1,475.$10^{-3}$$B^2$+1,279.$10^{-}$ C^2+0,729D^2-8,304E^2

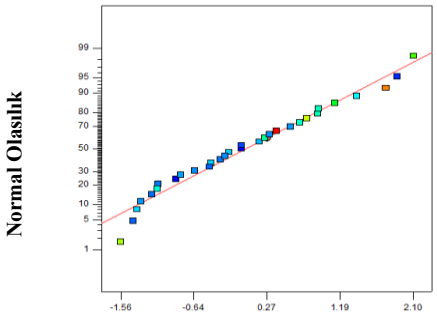
Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

Kodlanmış değerlerle;
$Y_{T.Fenol/oleuropein}$= +1,54+0,56A+0,40B +0,55 E+0,49AB-0,79A D+0,79AE+0,37BC +0,42BE - 1,02E^2

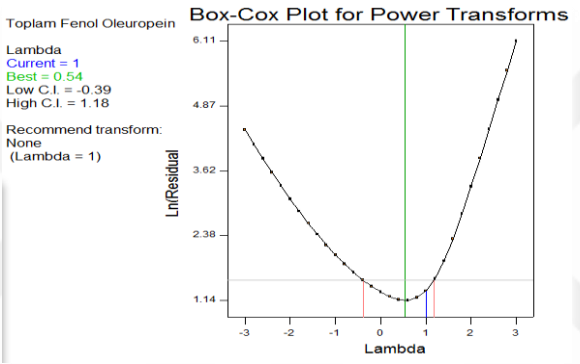
Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=7,462-0,030A -0,43124B +4,752E +2,44.10^{-3}AB -0,022AD +0,079AE + 3,503 .10^{-3}BC +0,171BE -8,304E^2

Cevap faktörü 2 Toplam Fenol (OLE)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek amacı çizilmiş olup, bununla ilgili grafik şekil 5.5.14'de verilmiştir.



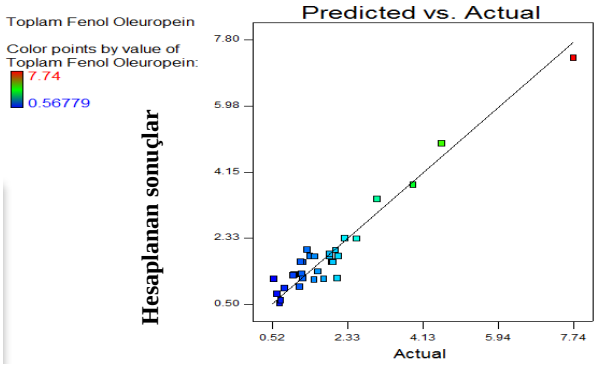
Şekil 5.121 Toplam Fenol (OLE eşd) miktarı maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 5.122 Box-Cox grafiği

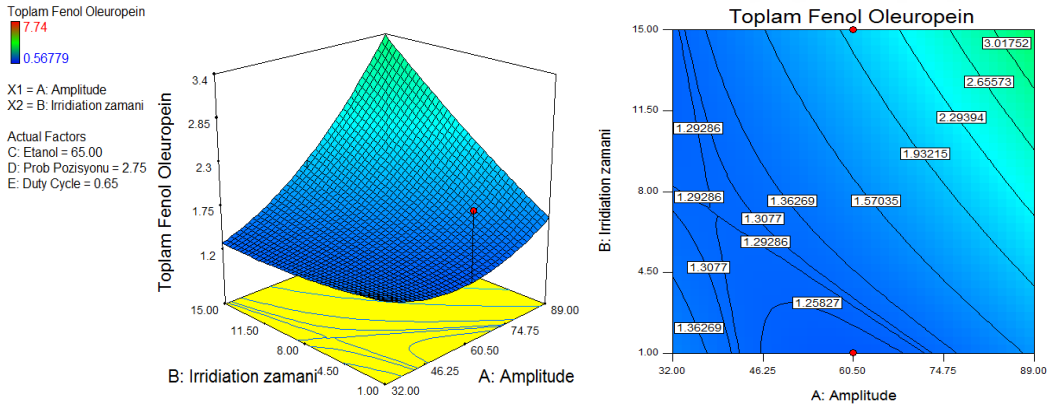
Şekil 5.122 verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,54 bulunmuş ve çalışmanın cevap değeri için çalışmanın %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğuve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.123'de verilmiştir.

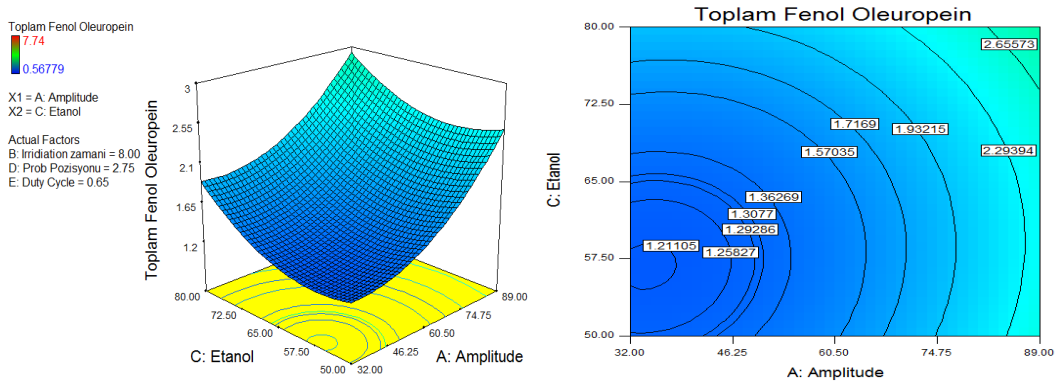


Şekil 5.123 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

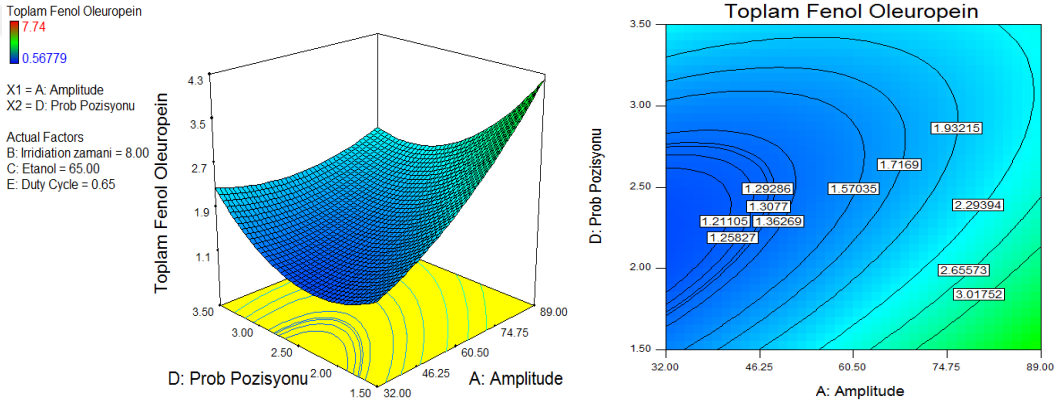
Model denkleminde genlik, SÖD uyg.süresi, ve görev döngüsü'nün önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uyg.süresi, genlik/prob pozisyonu, genlik/görev döngüsü, SÖD uyg.süresi/EtOH, SÖD uyg.süresi/görevdöngüsü arasındaki ilişkinin ve görev döngüsü'ın karesinin etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin Toplam fenol (OLE) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



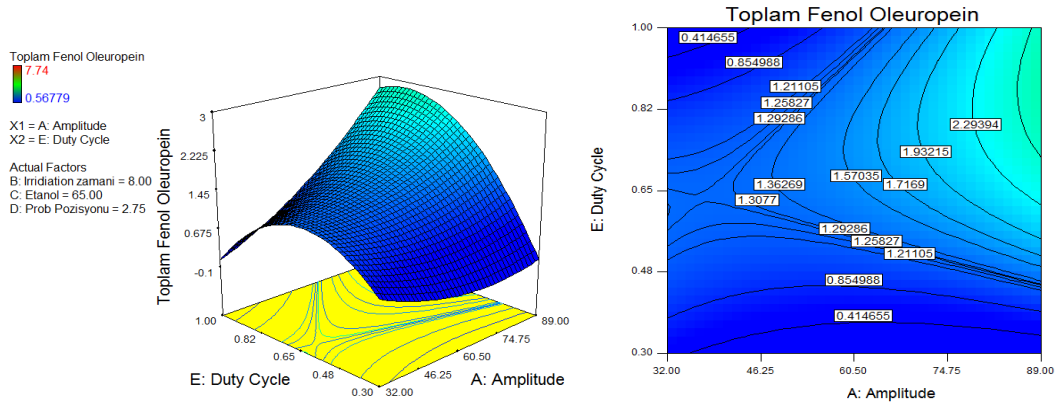
Şekil 5.124 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/oleuropein}$= +1.54+0.56 A+0.40B +0.49AB+0.32A^2+0.072 B^2



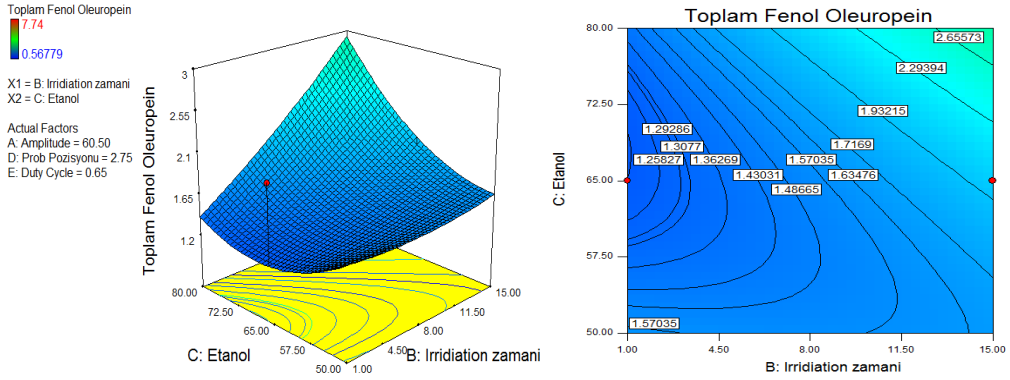
Şekil 5.125 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropeint}$=f(x)=+1.54+0.56 A +0.27C-0.050 A C +0.32 A^2+0.29 C^2



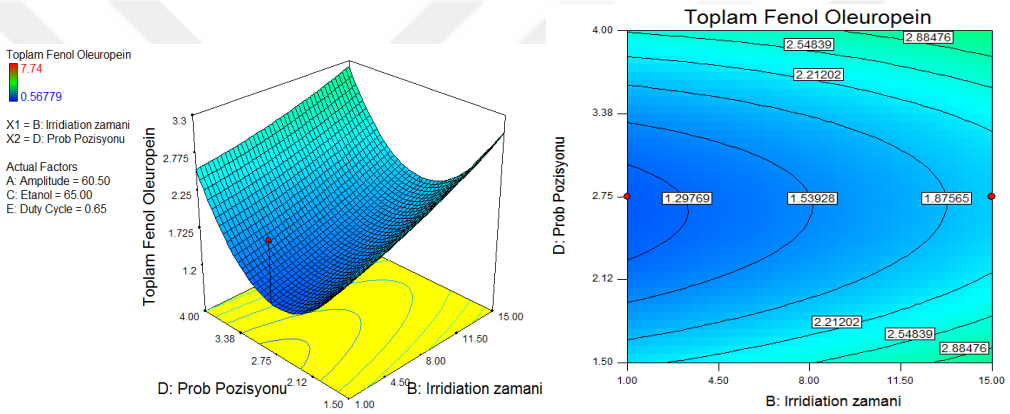
Şekil 5.126 Genlik-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +1.54+0.56 A +0.14D -0.79AD +0.32 A^2+1.14D^2



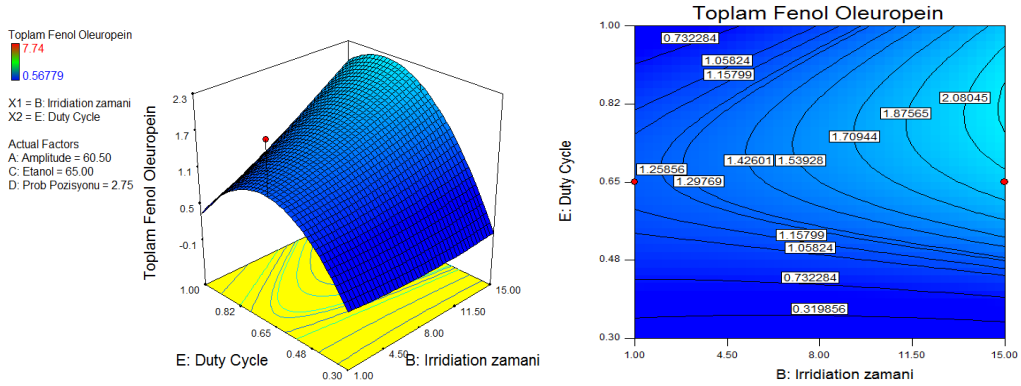
Şekil 5.127 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/oleuropein}$=f(x)=+1.54+0.56 A +0.55E+0.79AE +0.32 A^2-1.02E^2



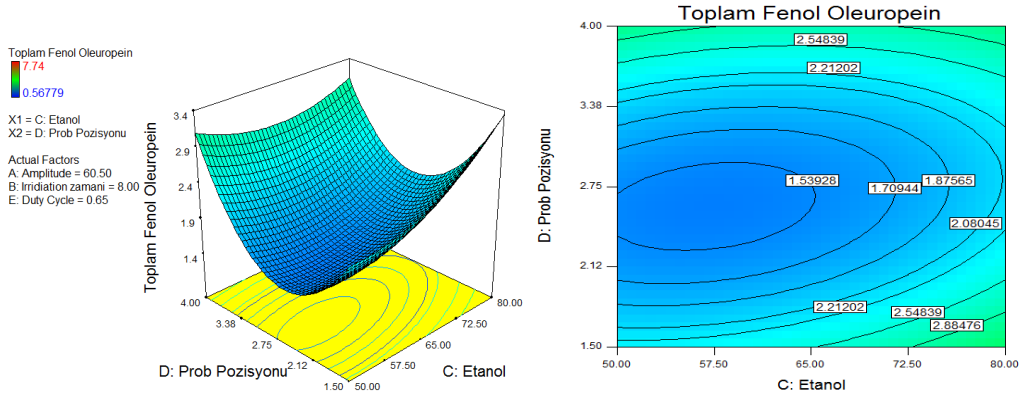
Şekil 5.128 SÖD uyg. süresi-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/oleuropein}$ =f(x)=+1.54 +0.40 B+0.27C +0.37BC +0.072B^2+0.29 C^2



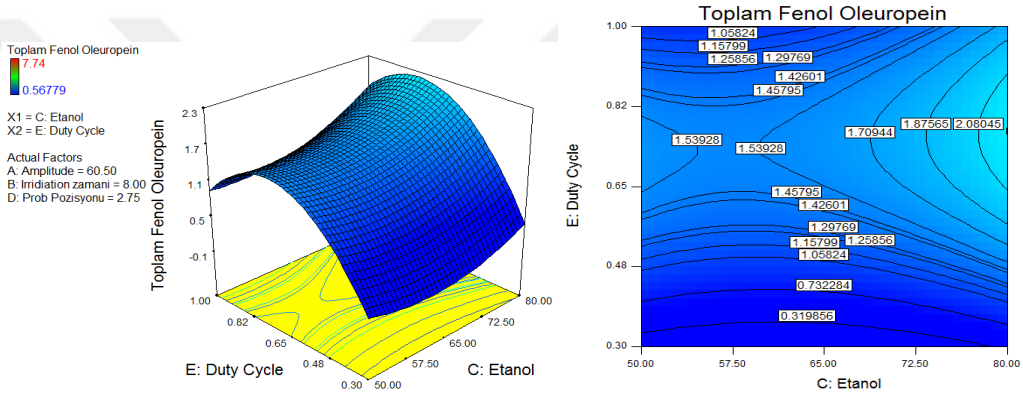
Şekil 5.129 SÖD uyg. süresi - prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =$f(x)$ =+1.54 +0.40 B +0.14 D -0.071 BD +0.072 B^2 +1.14 D^2



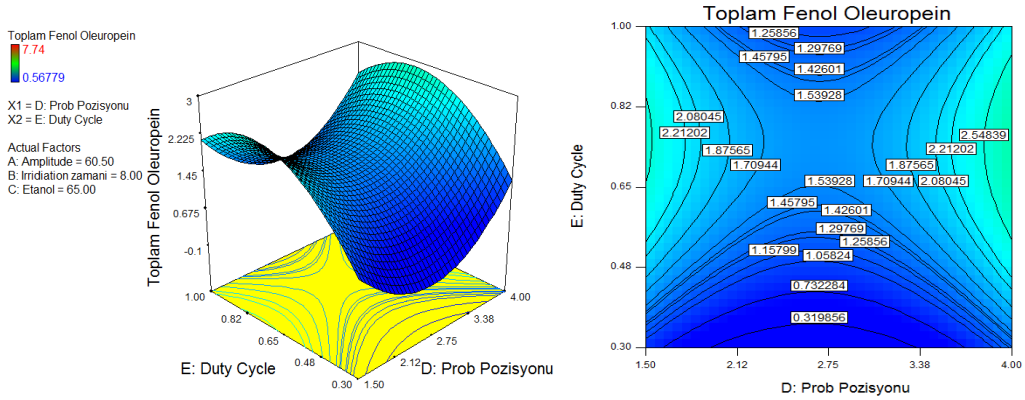
Şekil 5.130 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$=$f(x)$=+1.54+0.40B +0.55E+0.42B E+0.072 B^2-1.02E^2



Şekil 5.131 EtOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)= +1.54 +0.27C+0.14D-0.26 CD+0.29C^2+1.14D^2



Şekil 5.132 EtOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)=+1.54 +0.27C +0.55E+014CE+0.29 C^2-1.02E^2



Şekil 5.133 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Fenol/Oleuropein}$ =f(x)=+1.54+0.14D+0.55E-0.045D E+1.14D^2-1.02E^2

Şekil 5.124'de genlik-SÖD uyg.süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir. Modelde AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için p değeri (0,0102) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profili bir minimum bölge oluşturmaktadır. Şekil 5.125, genlik-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (genlik-EtOH) için p değeri (0,7755) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-EtOH arasınndaki yüzey profili bize bir minimum bölge oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.126, genlik/prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. AD (genlik/prob pozisyonu) için p değeri (0,0044) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Genlik/prob pozisyonu arasındaki yüzey profili bize minimum bölge olduğunu göstermektedir. Şekil 5.127, genlik-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri (0,001) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde plato görüntüsü ve maksimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.128, SÖD uyg.süresi-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde BC (SÖD uyg.süresi-EtOH) için p değeri (0,0275) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, minimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.129, SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi- prob pozisyonu) için p değeri (0,721) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.130, SÖD uyg.süresi -görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde BE (SÖD uyg.süresi- görev döngüsü) için p değeri (0,0262) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, plato bölge maksimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.131, EtOH-prob pozisyonu arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artış göstermektedir. Modelde CD (EtOH- prob pozisyonu) için p değeri (0,2019) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.132, EtOH-görev döngüsü arasındaki etkileşiminin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde CE (EtOH-görev döngüsü) için p değeri (0,3744) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölgesi etki ve maksimizasyon gözlenmiştir. Şekil 5.133'de verilen, prob pozisyonu-görev döngüsü arasındaki etkileşiminde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış yada düşüş göstermektedir. Modelde DE (prob pozisyonu -görev döngüsü) için p değeri (0,8333) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer noktası etki gözlenmiştir.

5.5.1.3 Cevap Faktörü 3: Oleuropein miktarı (HPLC) deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları

Tasarım matrisi ve oleuropein (HPLC) cevap faktörü için sonuçlar ile birlikte uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.28' de verilmiştir.

Çizelge 5.28 EtOH/H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda oleuropein (HPLC) cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi, df	Ortalamanın karesi	F Değeri	p-Değeri (P) > F	
Model	12,37	20	0,62	7,1	0,0015	**geçerli**
A-Genlik	1,43	1	1,43	16,44	0,0023	
B-SÖD uyg. süresi	0,92	1	0,92	10,57	0,0087	
C-EtOH	$5,25.10^{-3}$	1	$5,25.10^{-3}$	0,06	0,811	
D-Prob pozisyonu	0,19	1	0,19	2,17	0,1711	
E-Görev döngüsü	1,73	1	1,73	19,91	0,0012	
AB	0,81	1	0,81	9,25	0,0124	
AC	0,1	1	0,1	1,14	0,3098	
AD	0,51	1	0,51	5,91	0,0354	
AE	2,08	1	2,08	23,89	0,0006	
BC	0,11	1	0,11	1,3	0,28	
BD	$7,24.10^{-3}$	1	$7,24.10^{-3}$	0,083	0,779	
BE	1,16	1	1,16	13,35	0,0044	
CD	0,48	1	0,48	5,53	0,0405	
CE	$7,187.10^{-3}$	1	$7,187.10^{-3}$	0,083	0,7798	
DE	0,012	1	0,012	0,14	0,7201	
A^2	0,078	1	0,078	0,89	0,3675	
B^2	$1,71.10^{-3}$	1	$1,71.10^{-3}$	0,02	0,8913	
C^2	0,025	1	0,025	0,28	0,6065	
D^2	0,57	1	0,57	6,52	0,0287	
E^2	0,4	1	0,4	4,6	0,0575	
Arta Kalan	0,87	10	0,087			
UyumEksikliği	0,54	5	0,15	5,68	0,1398	**g.değil**
Hata	0,33	5	0,026			
Düzeltilmiş top.	13,25	30				

Önemli Model Terimleri		**A, B, E, AB, AD, AE, BE, CD, D^2, E^2**	
R^2	:0,9342	R^2_{Adj}	:0,8027

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,9342 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey

merkezli model ile %93,42 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin oleuropein (HPLC) tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,1398 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu durum; EtOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan üç amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda genlik, SÖD uyg. süresi, EtOH oranı, prob pozisyonu ve görev döngüsü'ın oleuropein (HPLC) miktarına etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Deneysel tasarımda belirlenen 31 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak elde edilen regresyon katsayıları hesaplanmış, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik oluşturulmuştur. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$$Y_{Oleuropein(HPLC)}=+0,58+0,29A+0,22B+0,016C+0,24D+0,29E+0,23AB-0,088AC-0,25AD+0,41AE+0,078BC+0,027BD+0,28BE-0,22CD-0,021CE+0,037DE+0,16A^2+0,026B^2-0,12C^2+0,86D^2-0,46E^2$$

Gerçek Değerlerle;

$$Y_{T.Fenol/Oleuropein}=-1,101-0,017A-0,177B+0,110C-1,753D+2,296E+1,131.10^{-3}AB-2,063.10^{-4}AC-7,139.10^{-3}AD+0,041AE+7,474.10^{-4}BC+3,056.10^{-3}BD+0,116BE-,.012CD-3,988.10^{-3}CE+0,085DE+2,027.10^{-4}A^2+5,208.10^{-4}B^2-5,229.10^{-4}C^2+0,554D^2-3,734E^2$$

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

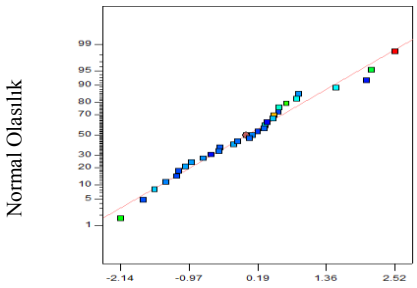
Kodlanmış değerlerle;

$$Y_{oleuropein(HPLC)}=+0,58+0,29A+0,22B+0,29E+0,23AB-0,25AD+0,41AE+0,28BE-0,22CD+0,86D^2$$

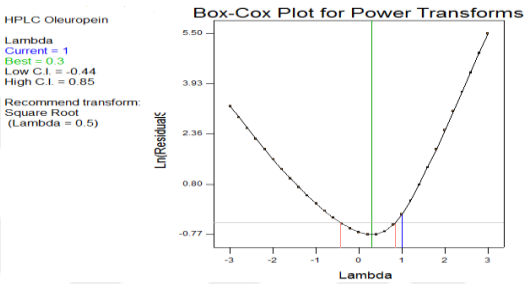
Gerçek Değerlerle;

$$Y_{T.Oleuropein(HPLC)}=-1,101-0,017A-0,177B+2,296E+1,131.10^{-3}AB-7,139.10^{-3}AD+0,041AE+0,116BE-3,988.10^{-3}CE+0,554D^2$$

Cevap faktörü 3: Oleuropein (HPLC)'in maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.134' de verilmiştir.

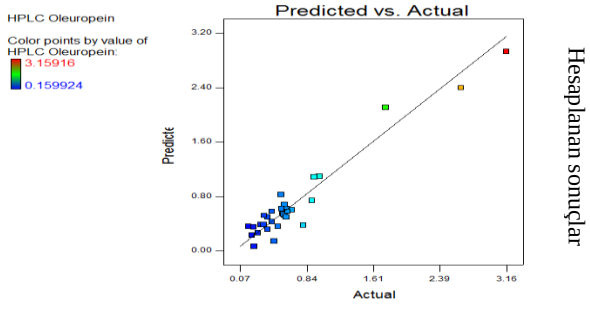


Şekil 5.134 Oleuropein(HPLC) maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık (probability) grafiği



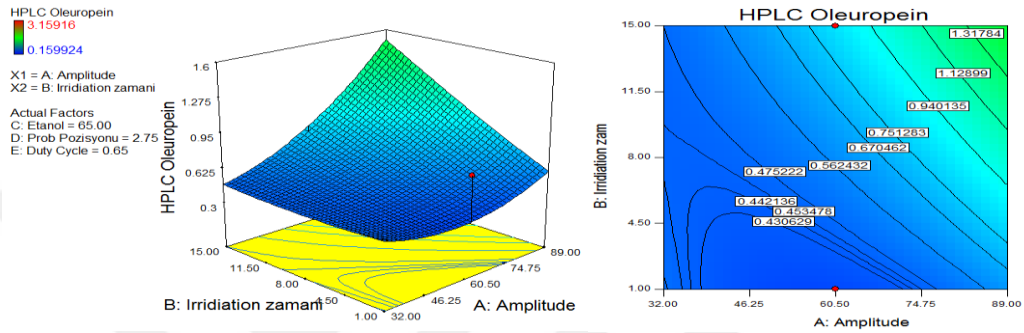
Şekil 5.135 Box-Cox grafiği

Şekil 5.135'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,30 bulunmuş, çalışmanın %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğuve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.136'da verilmiştir.

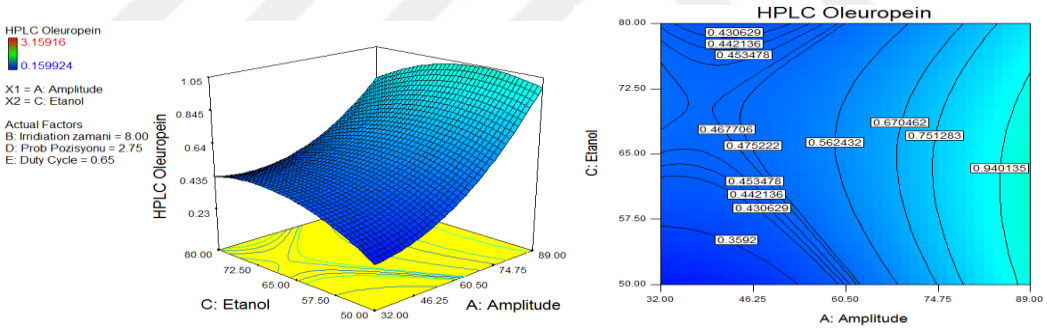


Şekil 5.136 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

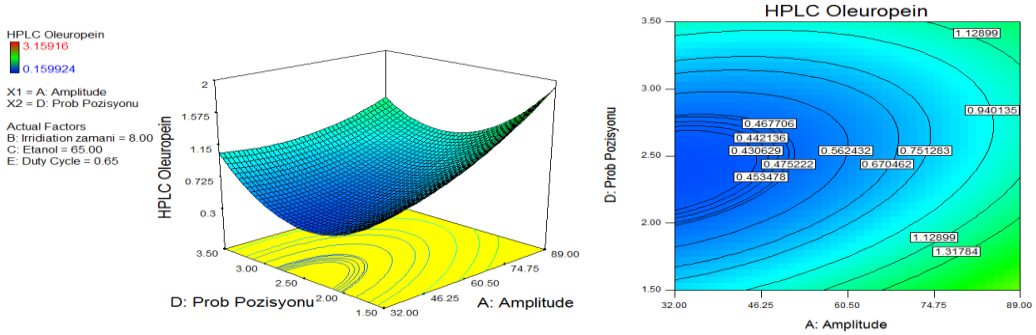
Model denkleminde genlik, SÖD uyg.süresi, ve görev döngüsü'ın önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uyg.süresi, genlik/prob pozisyonu, genlik/görev döngüsü, SÖD uyg.süresi/görev döngüsü, EtOH/prob pozisyonu arasındaki ilişkininve görev döngüsü'ın karesinin etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktörün seviyelerinin oleuropein (HPLC) miktarı üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



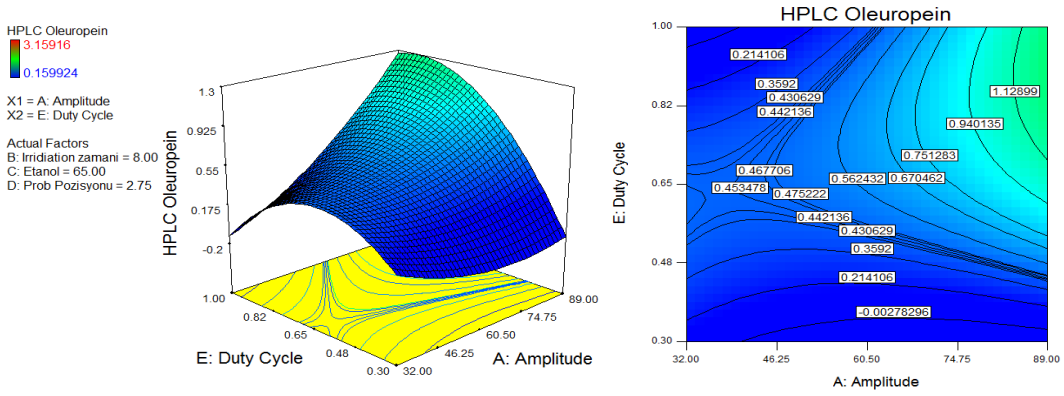
Şekil 5.137 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{oleuropein/HPLC}$= f(x)=+0.58+0.29A+0.22B +0.23AB +0.16A^2+0.026B^2



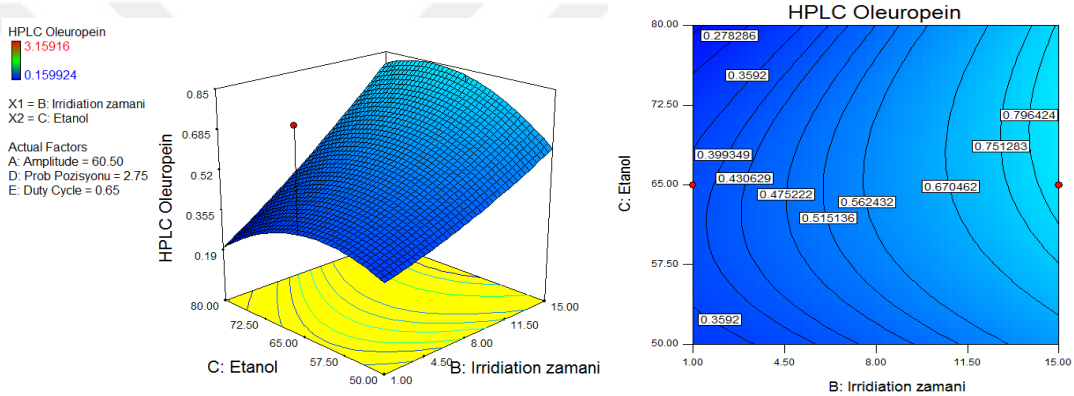
Şekil 5.138 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)=+0.58+0.29 A +0.016 C -0.088AC +0.16A^2-0.12C^2



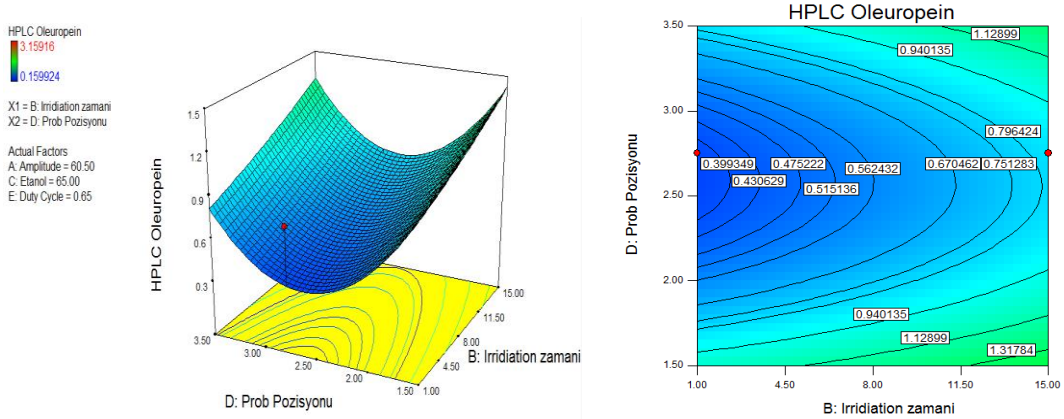
Şekil 5.139 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)=+0.58+0.29A +0.24D -0.25AD +0.16A^2 +0.86D^2



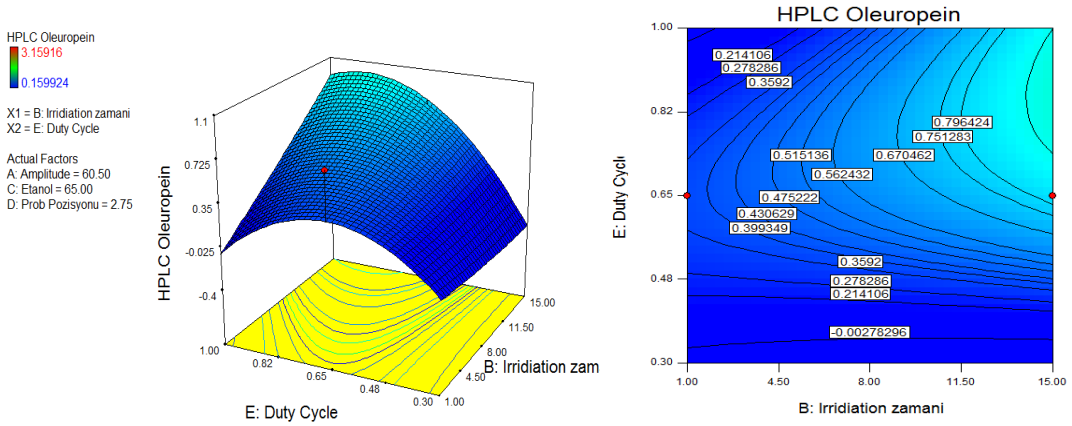
Şekil 5.140 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein/HPLC}$ =f(x)=+0.58+0.29 A +0.29E+0.41AE +0.16A^2 -0.46E^2



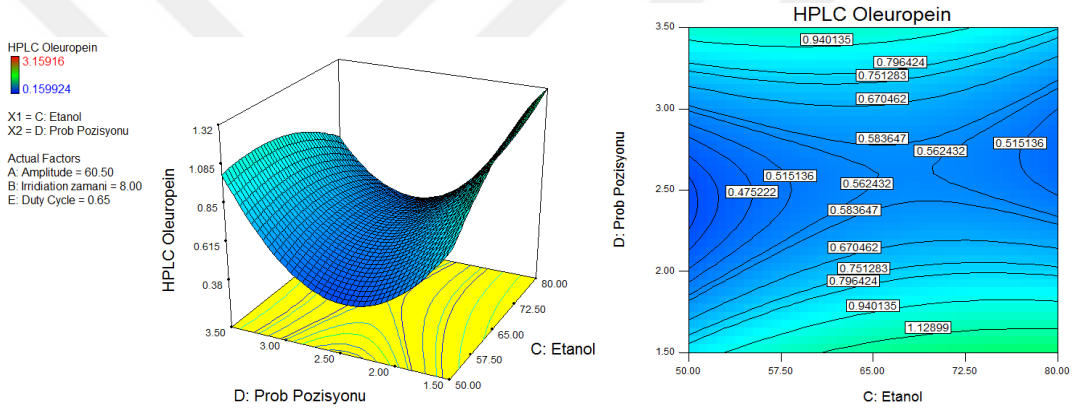
Şekil 5.141 SÖD uyg. süresi-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$=f(x)= +0.58 + 0.22 B +0.016 C +0.078B C +0.026 B^2-0.12 C^2



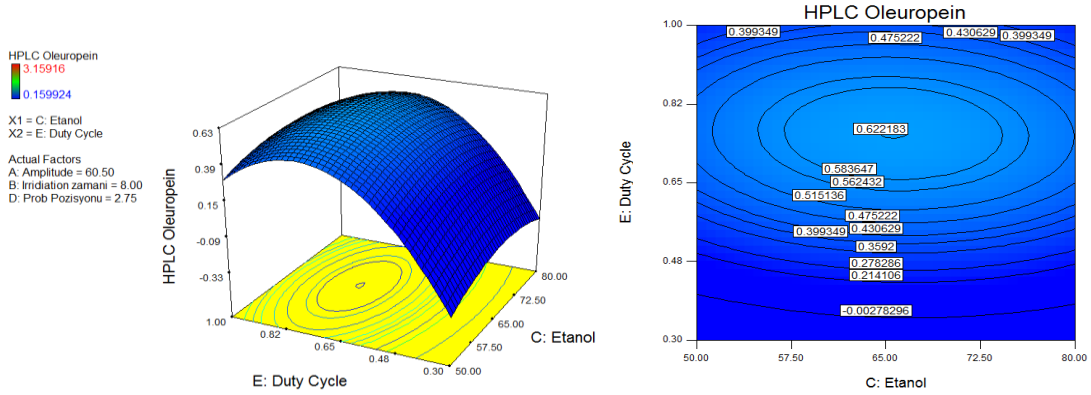
Şekil 5.142 SÖD uyg. süresi-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$=f(x)=+0.58 +0.22 B +0.24D +0.027BD +0.026B^2 +0.86D^2



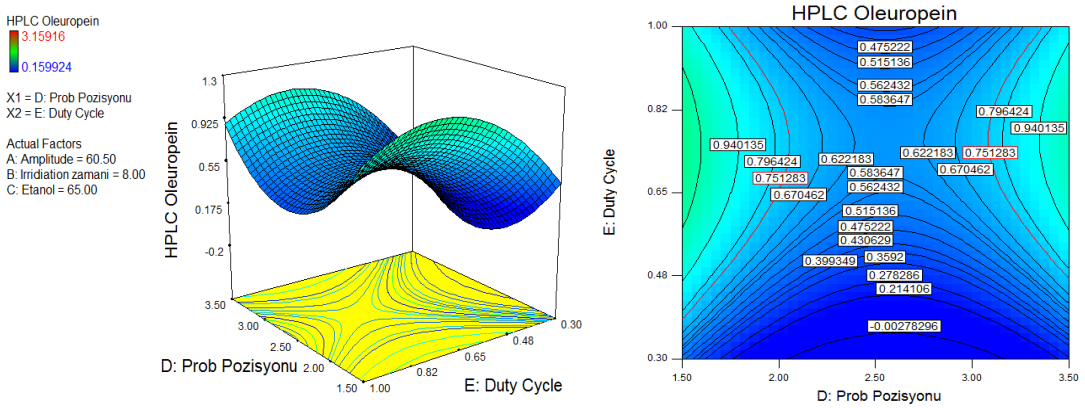
Şekil 5.143 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)} = f(x) = +0.58 +0.22\ B +0.29E +0.28BE+0.026B^2-0.46\ E^2$



Şekil 5.144 EtOH- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{/Oleuropein(HPLC)} = f(x) = +0.58 +0.016C+0.24D -0.22CD -0.12C^2+0.86D^2$



Şekil 5.145 EtOH-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)} = f(x) = +0.58 +0.016C +0.29E -0.021CE -0.12C^2 -0.46E^2$



Şekil 5.146 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{Oleuropein(HPLC)}$ =f(x)=+0.58 +0.24D+0.29E +0.037DE +0.86D^2-0.46E^2

Şekil 5.137'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-SÖD uyg.süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için p değeri (0,0124) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde minimum etki görülmektedir. Şekil 5.138' de genlik-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığı görülmektedir. Modelde AC (genlik-EtOH) için p değeri (0,3098) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-EtOH arasınndaki yüzey profili bize eyer bölgesi oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.139' da genlik/prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir. Modelde AD (genlik/prob pozisyonu) için p değeri (0,0354) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Genlik/prob pozisyonu arasındaki yüzey profili bize plato minimum bölge olduğunu göstermektedir. Şekil 5.140, genlik-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri (0,0006) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde plato görüntüsü ve maksimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.141' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (SÖD uyg.süresi-EtOH) için p değeri (0,2800) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge ve maksimum etki görülmektedir. Şekil 5.142, SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu) için p değeri (0,779) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge minimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.143, SÖD uyg. süresi-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde BE

(SÖD uyg.süresi-görev döngüsü) için p değeri (0,0044) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, plato bölge maksimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.144'de, EtOH-prob pozisyonu arasındaki etkileşim için, cevap değerlerinin (0,0) noktasından uzaklaştıkça yöne göre artış yada düşüş gösterdiği belirlenmiştir . Modelde CD (EtOH-prob pozisyonu) için p değeri (0,0405) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profilinde, eyer bölgesi gözlenmiştir. Şekil 5.145' de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-görev döngüsü arasındaki etkileşimde (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerlerinin düştüğünü göstermektedir. Modelde CE (EtOH-görev döngüsü) için p değeri (0,7798) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, maksimum noktası gözlenmiştir. Şekil 5.146' da prob pozisyonu-görev döngüsü etkileşiminde cevap değerlerinin (0,0) noktasından uzaklaştıkça, yöne göre artış ya da düşüş gösterdiği görülmektedir. Modelde DE (prob pozisyonu-görev döngüsü) için p değeri (0,7201) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, eyer bölgesi gözlenmiştir.

5.5.1.4 EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonda üç amaç fonksiyonlu optimizasyon çalışması

EtOH-H_2O çözücü sisteminde ultrasonik prob ile ekstraksiyonun, deneysel tasarım çalışmaları sonucu üç cevap faktörüne karşı alınan ANOVA sonuçlarında, elde edilen yeterli kesinlik, çalışmasının yeterli veri ile tamamlandığını göstermiştir. Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranı ile belirlenir ve bu oranın ise 4' ün üstünde olması sonuçların yeterli kesinlikte olduğunu gösterir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranları her bir cevap fonksiyonu için (toplam fenol-GAE; toplam fenol-OLE; oleuropein) sırası ile 11,374; 13,462 ve 11,777'dir.

Bu aşamadan sonra optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Bu amaçla; doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve kısıtlanmış optimizasyon uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan Box-Wilsonun dik yokuş yöntemi doğrusal bir regresyon modelle açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre maksimum miktarda Toplam Fenol (GAE ve OLE eşd) ve oleuropeinin (HPLC) elde

edildiği şartlarda optimizasyon yapılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır. 5 bağımsız değişken için pareto optimal çözüm sistemi kullanılmıştır.

Çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümü için, desirability değerlendirilmiştir. Denklem 5.2'ye göre geometrik ortalama alınarak oluşturulan toplu desirability fonksiyonunu, maksimize eden (x) değişken seviyesi kombinasyonu bulunmuştur.

Optimizasyonda, desirability çalışmaları sonucu elde edilen çözüm kümesi aşağıda verilmiştir. Optimizasyon noktasının seçiminde, cevap değişkenlerini maksimum yapan bağımsız değişken koşulları esas alınmıştır.

Number	Amplitude	Irridiation zamani	Etanol	Prob Pozisyonu	Duty Cycle	Toplam Fenol Gallik A	Toplam Fenol Oleurop	HPLC Oleuropein	Desirability	
1	33.14	1.62	51.32	1.61	0.68	4.28563	1.45179	0.426893	1.000	
2	89.00	15.00	50.00	1.50	0.30	5.25799	1.99289	0.60052	1.000	
3	87.86	1.62	51.32	2.86	0.97	4.9289	1.8541	0.703536	1.000	
4	60.50	1.00	80.00	1.50	1.00	5.64054	1.89279	0.55644	1.000	
5	87.86	1.62	66.32	1.61	0.33	3.99813	1.36897	0.645962	1.000	
6	32.00	1.00	65.00	3.50	1.00	2.21825	0.773818	0.231349	1.000	
7	32.00	15.00	50.00	3.50	0.30	2.40794	0.933164	0.266464	1.000	
8	32.00	15.00	80.00	3.50	1.00	5.58582	2.30828	0.739437	1.000	
9	60.50	1.00	50.00	3.50	0.30	3.78147	1.30941	0.38851	1.000	
10	89.00	15.00	80.00	1.50	1.00	16.6118	7.30967	2.92819	1.000	Selected
11	33.14	14.38	78.68	1.61	0.33	3.95536	1.35981	0.502186	1.000	
12	33.14	1.62	78.68	2.86	0.33	3.86505	1.2913	0.390217	1.000	
13	89.00	1.00	80.00	3.50	0.65	4.95757	1.6593	0.496702	1.000	
14	33.14	8.62	51.32	3.39	0.97	2.56488	0.95083	0.412946	1.000	
15	87.86	14.38	78.68	3.39	0.33	3.80274	1.31096	0.234725	1.000	
16	60.50	15.00	65.00	2.75	0.65	5.01715	2.00685	0.82648	1.000	
17	33.14	8.62	78.68	3.39	0.33	4.85294	1.69701	0.51961	1.000	
18	62.78	14.22	51.68	1.64	0.96	5.46015	2.409	1.10445	1.000	
19	32.00	8.00	80.00	1.50	1.00	3.21682	1.2985	0.38887	1.000	
20	87.86	14.38	51.32	3.39	0.97	8.21139	3.58865	2.17677	1.000	
21	87.86	14.38	78.68	1.61	0.33	8.57505	3.21116	1.02872	1.000	
22	89.00	15.00	50.00	3.50	0.30	1.79424	0.599237	0.350829	1.000	
23	89.00	15.00	80.00	3.50	1.00	11.1761	4.93895	2.10677	1.000	
24	60.50	1.00	65.00	2.75	0.65	3.76759	1.21303	0.37983	1.000	
25	60.50	1.00	50.00	1.50	0.30	3.96262	1.20652	0.316811	1.000	

Optimim koşullar; %89 genlik, 15 dk, SÖD uyg. süresi, % 80 EtOH, 1,5 cm prob pozisyonu, 1 görev döngüsü ve 28 Ç/K Oranı, 30ºC Sıcaklık olarak belirlenmiştir**.**

Deney doğrulama (experimental verification) CYY ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için yapılan deney doğrulama sonuçlarından, Toplam Fenol (GAE), Toplam Fenol (OLE eşd) ve Oleuropein miktarı sırası ile **16,82 mg/g yaprak, 7,31 mg/g yaprak, 2,93 mg/g yaprak** ve standart sapma değerleri sırasıyla 1,63; 0,61, ve 0,30 olarak bulunmuştur.

5.6 EtOH/H_2O Çözücülü Ultrasonik Prob Ekstraksiyonunda Toplam Antioksidan Aktivite Cevap Faktörü için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Çalışması

EtOH/H_2O çözücü sistemine ultrasonik prob etkisi ile kurutulmuş öğütülmüş zeytin yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonuna dayalı çalışma kapsamında; deney tasarımı metodlarından sisteme etki eden değişkenlerden en önemli olanların tespiti, ürün özelliği üzerinde etkileşimlerin etkin olup olmadığı belirlenmiştir. Deney tasarımı metotlarından olan cevap yüzey metodu ile sistemin optimum yanıtına, yani ürün özelliğini optimuma ulaştıracak değişkenlerin değerleri tespit edilmiştir. Cevap yüzey metodu ile beş farklı değişken yardımı ile tanımlanan yüzeylerin, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin yardımı ile modellemesi yapılmıştır. Süreçlerin optimizasyonunda sistemin performansını veya ürün kalitesini belirleyen toplam antioksidan aktivite tek yanıtı ile çalışılmıştır.

Probun düşük sıcaklıklarda da etkin olması nedeni ile sıcaklık 30 ^oC'de sabit tutularak, değişken olarak değerlendirilmemiştir. Çalışma çözücü/katı oranı 28 (**50 mL EtOH/H_2O çözeltisi/1,785 g yaprak)**'de sabit tutularak, probun etki ucunun girebileceği açıklıkta boşluk bulunan, ağzı kapalı cam beherler içinde yapılmıştır.

Deneysel tasarımda, D-optimal tasarım çalışılmıştır. 5 faktör için, kuadretik modelde köşe faktöriyel noktaları, kenarların merkezleri, kısıtlanmış düzlemsel ağırlık merkezleri, eksenel kontrol karışım noktaları, iç noktalar, tüm ağırlık merkezleri hesaplanmış ve 31 noktalı tasarım yapılmıştır.

Çizelge 5.29 Beş bağımsız değişken için D-optimal tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı

Sıralama ve Seviyeleri		
Faktörler(Bağımsız Değişkenler)	**+1**	**-1**
A: Genlik	89	32
B : SÖD uyg.süresi (dk)	15	1
C : EtOH %	80	50
D : Prob pozisyonu (cm)	3,5	1,5
E : Görev döngüsü	1	0,3

EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob uygulanmış ekstraktlarda, y_1: Toplam antioksidan aktivitesi (% inhibisyon) bağımlı değişken olarak belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan deneysel tasarım matrisi ve toplam antioksidan aktivite cevap faktörü için sonuçlar çizelge 5.30'da verilmiştir.

Çizelge 5.30 EtOH/H_2O çözücülü ultrasonik prob ekstraksiyonu tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarım noktaları ve sonuçları

Std	Run	Faktör1 A:Genlik, %	Faktör2 B: SÖD uyg.süresi dk	Faktör3 C:EtOH, %	Faktör4 D:Prob pozisyonu, cm	Faktör5 E:Görev döngüsü %	Cevap 1 Antioksidan Aktivite, %
20	1	32(-1)	8(0)	80(+1)	1,5(-1)	1(+1)	70,19
10	2	89(+1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	1(+1)	86,93
8	3	32(-1)	15(+1)	80(+1)	3,5(+1)	1(+1)	83,79
2	4	89(+1)	15(+1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	71,63
16	5	60,5(0)	15(+1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	86,67
19	6	32(-1)	8(0)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	47,58
3	7	89(+1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1(+1)	69,28
25	8	60,5(0)	1(-1)	65(0)	2,75(0)	0,65(0)	42,48
30	9	89(+1)	1(-1)	80(+1)	3,5(+1)	0,65(0)	39,22
26	10	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,3(-1)	34,38
11	11	32(-1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	61,44
17	12	32(-1)	8(0)	80(+1)	3,5(+1)	0,3(-1)	41,83
6	13	32(-1)	1(-1)	65(0)	3,5(+1)	1(+1)	42,48
18	14	60,5(0)	15(+1)	50(-1)	1,5(-1)	1(+1)	86,01
28	15	89(+1)	1(-1)	50(-1)	2,75(0)	1(+1)	73,21
15	16	89(+1)	15(+1)	80(+1)	3,5(+1)	0,3(-1)	55,29
24	17	89(+1)	15(+1)	80(+1)	3,5(+1)	1(+1)	85,88
1	18	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	46,41
7	19	32(-1)	15(+1)	50(-1)	3,5(+1)	0,3(-1)	73,99
4	20	60,5(0)	1(-1)	80(+1)	1,5(-1)	1(+1)	40,26
9	21	60,5(0)	1(-1)	50(-1)	3,5(+1)	0,3(-1)	20,92
27	22	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	22,62
23	23	89(+1)	15(+1)	50(-1)	3,5(+1)	0,3(-1)	67,19
29	24	32(-1)	8(0)	80(+1)	3,5(+1)	0,3(-1)	45,10
22	25	89(+1)	15(+1)	80(+1)	1,5(-1)	0,3(-1)	56,08
14	26	32(-1)	8(0)	50(-1)	3,5(+1)	1(+1)	86,54
13	27	89(+1)	1(-1)	80(+1)	3,5(+1)	0,65(0)	41,69
12	28	32(-1)	1(-1)	80(+1)	2,75(0)	0,3(-1)	31,38
31	29	32(-1)	1(-1)	50(-1)	1,5(-1)	0,65(0)	26,93
21	30	89(+1)	15(+1)	50(-1)	3,5(+1)	1(+1)	26,93
5	31	89(+1)	1(-1)	65(0)	1,5(-1)	0,3(-1)	40,14

Çizelge 5.31 EtOH/H_2O çözücü sisteminde ultrasonik prob ile yapılan tek amaç fonksiyonlu deneysel tasarımda, toplam antioksidan aktivite cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi, df	Ortalamanın karesi	F Değeri	p-Değeri (P) > F	
Model	12040.69	20	602.03	3.62	**0.0204**	**geçerli**
A-Genlik	9.58	1	9.58	0.058	0.8151	
B-SÖD uyg. süresi	5802.79	1	5802.79	34.91	**0.0001**	
C-EtOH	57.49	1	57.49	0.35	0.5695	
D-Prob pozisyonu	1505.66	1	1505.66	9.06	**0.0131**	
E-Görev döngüsü	1794.08	1	1794.08	10.79	**0.0082**	
AB	1044.45	1	1044.45	6.28	**0.0311**	
AC	384.73	1	384.73	2.31	0.1592	
AD	124.15	1	124.15	0.75	0.4077	
AE	360.01	1	360.01	2.17	0.1719	
BC	119.69	1	119.69	0.72	0.416	
BD	63.16	1	63.16	0.38	0.5514	
BE	67.52	1	67.52	0.41	0.5382	
CD	289.75	1	289.75	1.74	0.2162	
CE	375.05	1	375.05	2.26	0.164	
DE	180.32	1	180.32	1.08	0.3222	
A^2	172.06	1	172.06	1.04	0.333	
B^2	111.46	1	111.46	0.67	0.432	
C^2	9.37	1	9.37	0.056	0.8172	
D^2	1514.1	1	1514.1	9.11	**0.0129**	
E^2	72.33	1	72.33	0.44	0.5244	
Arta Kalan	1662.35	10	166.23			
UyumEksikliği	818.13	5	163.63	5.81	0.1381	**g.değil**
Hata	844.22	5	128.84			
Düzeltilmiş top.	13703.04	30				

Önemli Model Terimleri	**B,D,E, AB, D^2**
R^2 : 0.8787	R^2_{Adj} :0.6361

Uygulanan F testi ile Fischer'in F tablo değerlerinden regresyon modelin geçerliği sınanmış ve her iki test ANOVA istatistiği çizelge 5.31'de verilmiştir.

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8787 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 87,87 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen

model denklemin toplam antioksidan aktivitenin (%) tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Uyum eksikliği için F testi değeri 0,1381 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu durum; MeOH-H_2O çözücülü ultrasonik prob ile yapılan tek amaç fonksiyonlu ekstraksiyonda genlik, SÖD uyg. süresi, EtOH, prob pozisyonu ve görev döngüsü' nün Toplam antioksidan aktiviteye etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Tasarım kullanılarak 31 deneysel nokta çalışılmış ve deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak regresyon katsayıları hesaplanmış, yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model eşitlik elde edilmiştir. Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$Y_{T.AntioksidanAktivite}$=+72,24-0,75A+17,73B-1,65C-21,30D+9,23E-8,13AB+5,48AC-3,95AD-5,38 AE+2,55BC-2,50BD-2,16BE+5,29CD+4,78CE-4,58DE+7,75A^2-6,51B^2+2,29C^2-44,66D^2 + 6,14 E^2

Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=27,967-1,033A+6,905B -3,773C+137,628D-29,564E-0,0407AB+ 0,0128AC-0,111AD-0,539AE+0,0243BC-0,285BD-0,881BE+0,282CD+0,911CE-10,48DE+9,547.$10^{-3}$$A^2$-0,133$B^2$-28,583$C^2$-28,583$D^2$ +50,161E^2

En önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenen model denklem;

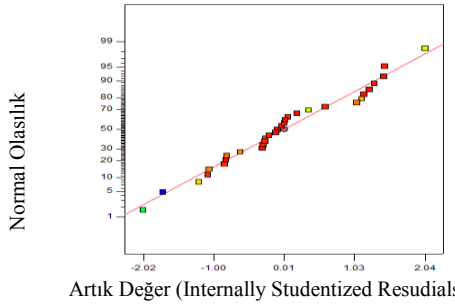
Kodlanmış değerlerle;

$Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=72,24 +17,73B-21,30D+9,23E-8,13AB+6,14E^2

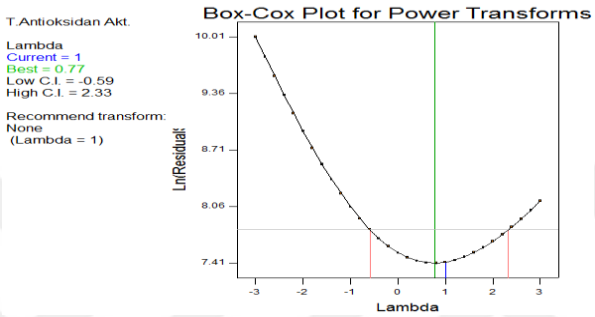
Gerçek Değerlerle;

$Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=27,967 +6,905B+137,628D-29,564E-0,041AB+50,161E^2 şeklindedir.

Cevap faktörü Toplam Antioksidan Aktivite'nin maksimizasyonu için artık değer-normal olasılık grafiği şekil 5.147' de verilmiştir.

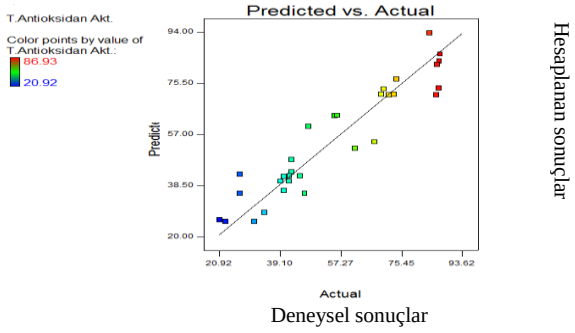


Şekil 5.147 Toplam Antioksidan Aktivite maksimizasyonu için artık değer- normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 5.148 Box-Cox grafiği

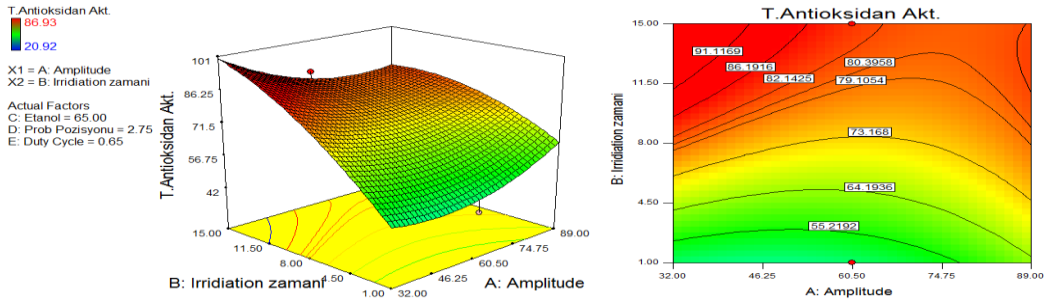
Şekil 5.148'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln değeri ile lambda değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,77 bulunmuş ve cevap değeri için çalışmanın %95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 5.149'da verilmiştir.



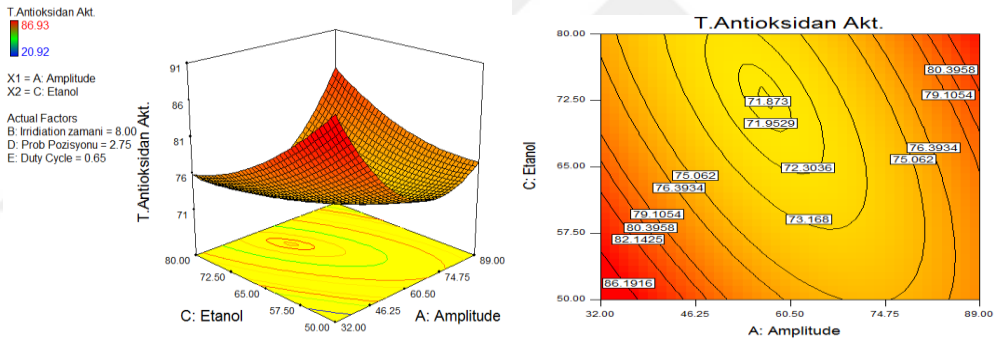
Şekil 5.149 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

Model denkleminde SÖD uyg. süresi, prob pozisyonu ve görev döngüsü'nün önemli parametreler olduğu, genlik/SÖD uyg.süresi arasındaki ilişkinin ve prob pozisyonu'nun

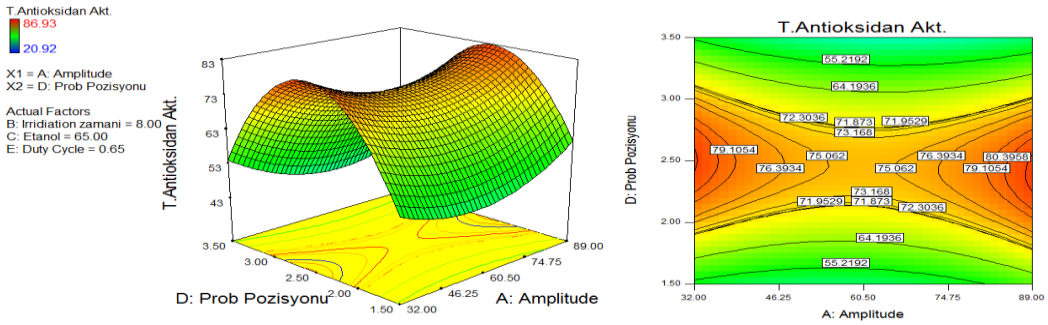
karesel etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden üç tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin Toplam antioksidan aktivite üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



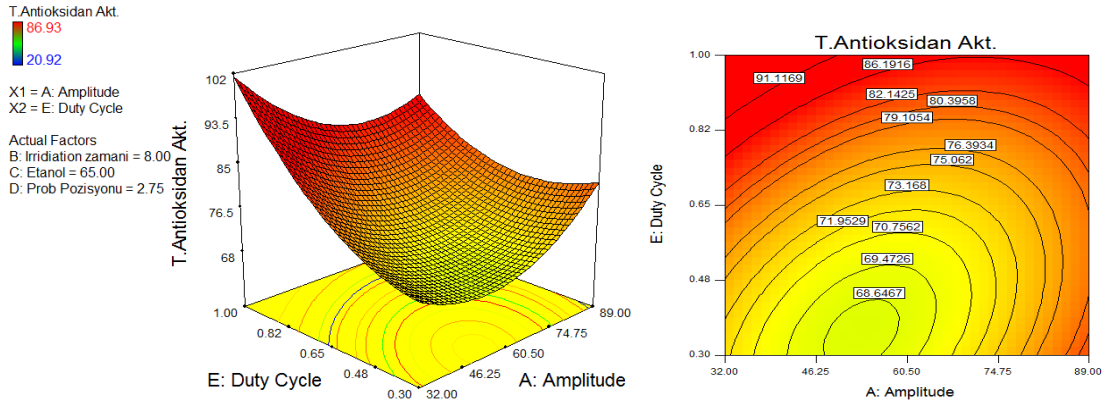
Şekil 5.150 Genlik-SÖD uyg.süresi iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24-0.75 A+17.73B -8.13AB+7.75A^2-6.51B^2



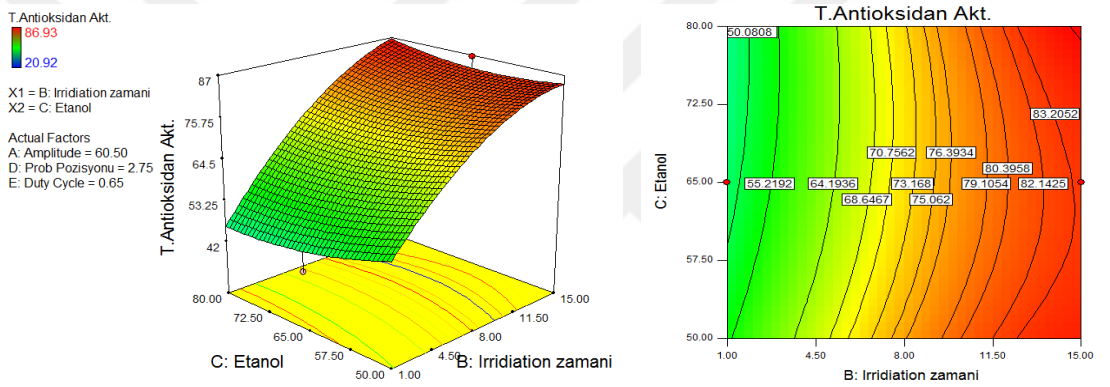
Şekil 5.151 Genlik-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.AntioksidanAktivite}$=+72.24-0.75A -1.65 C+5.48AC +7.75A^2+2.29 C^2



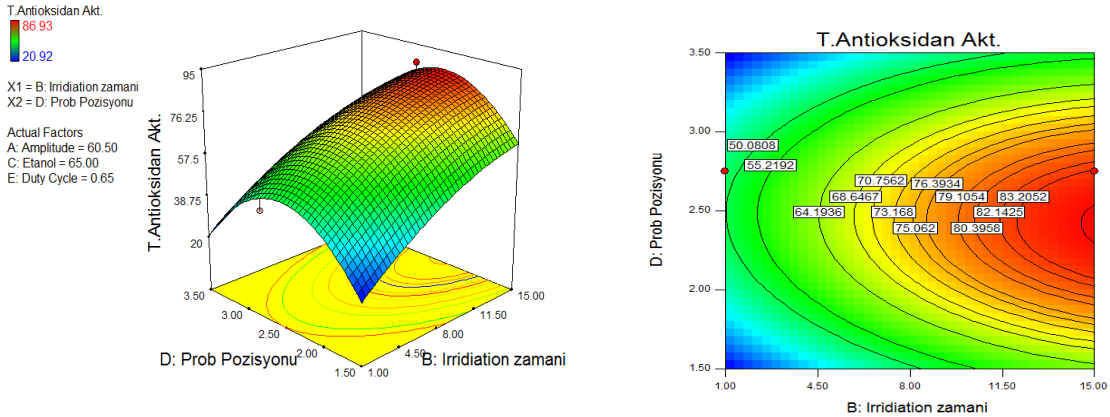
Şekil 5.152 Genlik/prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24-0.75 A -21.30D-3.95AD +7.75A^2-44.66D^2



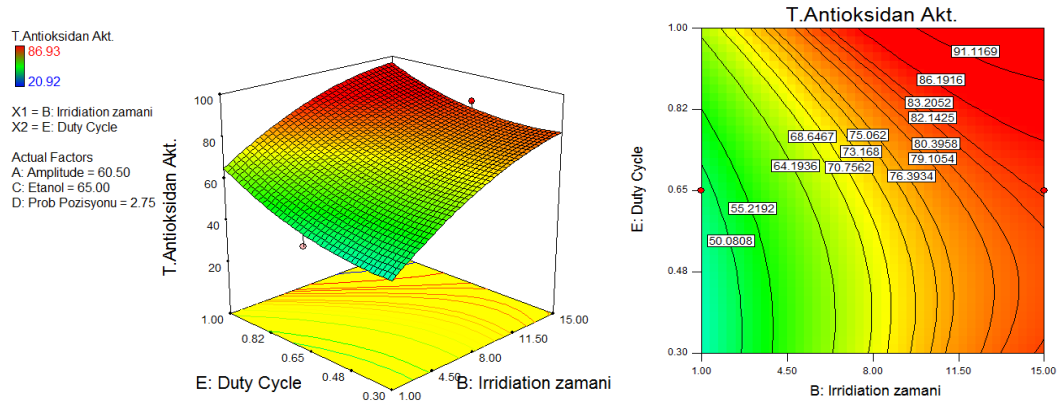
Şekil 5.153 Genlik-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24-0.75 A +9.23E-5.38AE+7.75A^2+6.14E^2



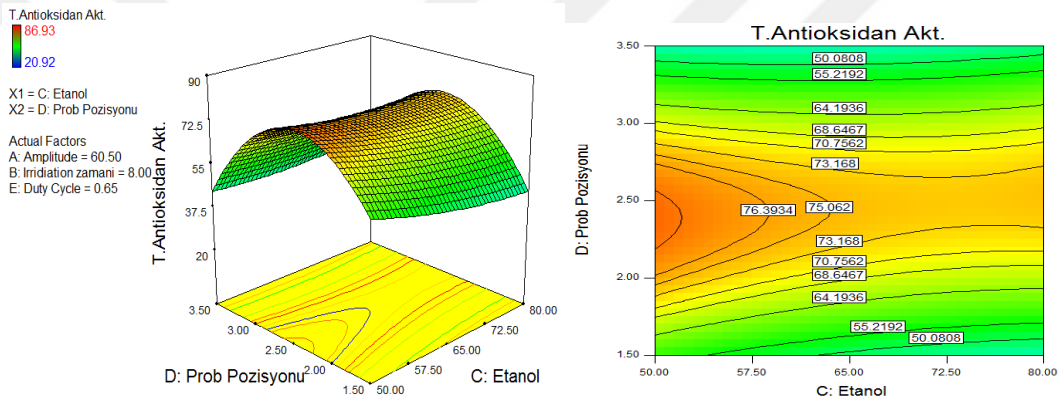
Şekil 5.154 SÖD uyg. süresi-EtOH iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 +17.73 B-1.65C+2.55BC-6.51B^2+2.29C^2



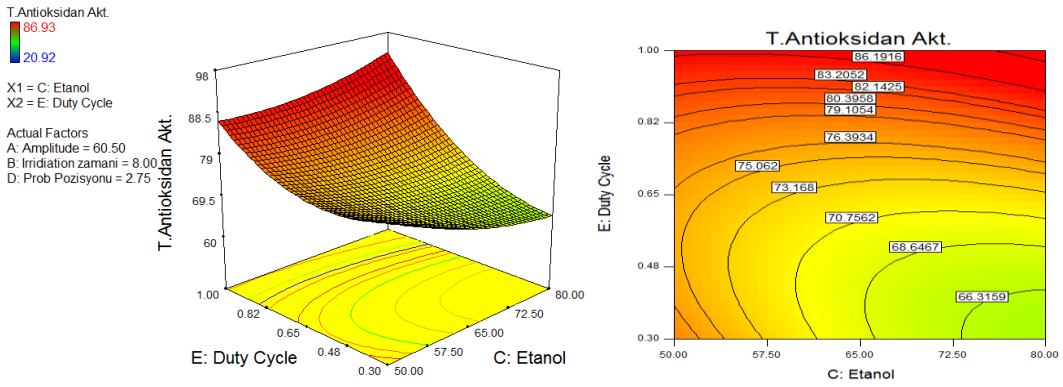
Şekil 5.155 SÖD uyg. süresi- prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 +17.73B -21.30 D-2.50BD -6.51 B^2-44.66D^2



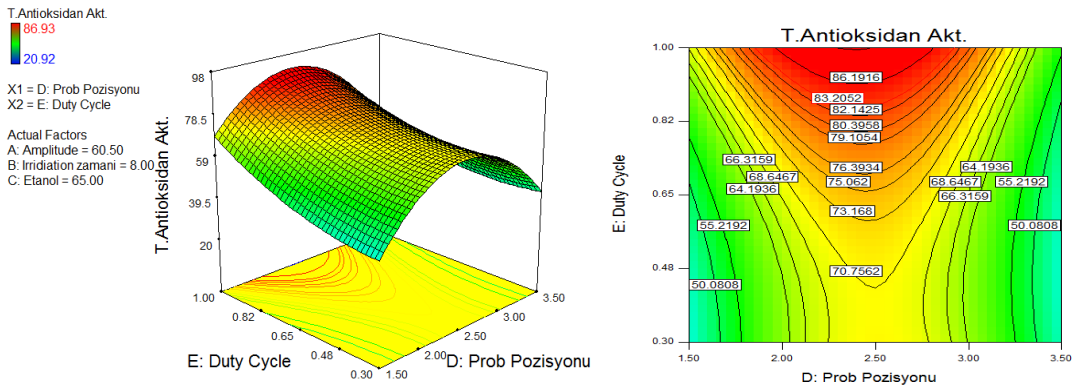
Şekil 5.156 SÖD uyg. süresi-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerler le eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$= +72.24+17.73B +9.23E-2.16BE -6.51B^2+6.14E^2



Şekil 5.157 EtOH-prob pozisyonu iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 -1.65C-21.30D+5.29CD+2.29C^2-44.66D^2



Şekil 5.158 EtOH- görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 -1.65 C +9.23E+4.78CE +2.29C^2+6.14E^2



Şekil 5.159 Prob pozisyonu-görev döngüsü iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{T.Antioksidan\ Aktivite}$=+72.24 -21.30 D+9.23 E-4.58DE -44.66 D^2+6.14E^2

Şekil 5.150'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-SÖD uyg.süresi arasındaki etkileşimin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelde AB (genlik-SÖD uyg.süresi) için p değeri (0,0311) hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey profili eyer bölge olduğunu göstermektedir. Şekil 5.151'de genlik-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AC (genlik-EtOH) için p değeri (0,1592) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-EtOH arasınndaki yüzey profili bize minimizasyon oluştuğunu göstermektedir. Şekil 5.152'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği, genlik-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AD (genlik-prob pozisyonu) için p değeri (0,4077) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Genlik-prob pozisyonu arasındaki yüzey profili plato bölge olduğunu göstermektedir. Şekil 5.153'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği genlik-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde AE (genlik-görev döngüsü) için p değeri (0,1719) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde minimizasyon etki görülmektedir. Şekil 5.154'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-EtOH arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BC (SÖD uyg.süresi-EtOH) için p değeri (0,416) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, SÖD uyg. süresi, EtOH'e göre daha etkili görülmektedir. Şekil 5.155, SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BD (SÖD uyg.süresi-prob pozisyonu) için p değeri (0,5514) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge maksimizasyon etki gözlenmiştir. Şekil 5.156'da verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği SÖD uyg.süresi-görev döngüsü arasındaki

etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde BE (SÖD uyg.süresi-görev döngüsü) için p değeri (0,5382) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, maksimum etki gözlenmiştir. Şekil 5.157, EtOH-prob pozisyonu arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde CD (EtOH- prob pozisyonu) için p değeri (0,2162) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato maksimizasyon etkisi gözlenmiştir. Şekil 5.158'de verilen izohips eğrisi ve üç boyutlu yüzey grafiği EtOH-görev döngüsü etkileşiminde, (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri yöne göre artış ya da düşüş göstermektedir. Modelde CE (EtOH-görev döngüsü) için p değeri (0,164) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Şekil 5.159, prob pozisyonu-görev döngüsü arasındaki etkileşimin anlamlı olmadığını göstermektedir. Modelde DE (prob pozisyonu -görev döngüsü) için p değeri (0,3222) hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Yüzey profilinde, plato bölge maksimum etki gözlenmiştir.

EtOH-H_2O çözücü karışımında ultrasonik prob ile ekstraksiyonun, deneysel tasarım çalışmaları sonucu tek cevap faktörüne karşı alınan ANOVA sonuçlarından elde edilen yeterli kesinlik, çalışmanın yeterli veri ile tamamlandığını göstermektedir. Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranına göre belirlenmekte olup bu oran 6,412'dir.

Optimizasyon çalışmalarında doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve kısıtlanmış optimizasyon uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan Box-Wilsonun dik yokuş yöntemi doğrusal bir regresyon modelle açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmıştır. Toplam antioksidan aktivitenin maksimizasyonu için optimizasyon yapılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır. 5 bağımsız değişken için pareto optimal çözüm sistemi kullanılmıştır. Tek yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümü için, desirability değerlendirilmiştir. Geometrik ortalama alınarak oluşturulan toplu desirability fonksiyonunu, maksimize eden (x) değişken seviyesi kombinasyonu bulunmuştur.

Optimizasyonda, desirability çalışmaları sonucu elde edilen çözüm kümesi, aşağıda verilmiştir. Optimum noktanın belirlenmesinde, cevap değişkeninin maksimum olduğu koşullar dikkate alınmıştır.

Number	Amplitude	Irridiation zamani	Etanol	Prob Pozisyonu	Duty Cycle	T.Antioksidan Akt.	Desirability	
1	34.39	7.66	56.15	2.80	0.87	91.6256	1.000	
2	83.88	9.41	54.30	2.24	0.98	89.8962	1.000	
3	82.67	5.76	77.79	2.55	0.98	92.6954	1.000	
4	71.33	14.71	50.70	2.58	0.35	87.118	1.000	
5	36.33	5.33	54.69	2.48	0.95	91.7978	1.000	
6	32.00	15.00	80.00	3.50	1.00	93.6223	1.000	
7	87.10	14.46	79.38	1.66	0.99	91.5448	1.000	
8	35.12	13.76	79.46	2.64	0.49	87.3423	1.000	
9	68.00	14.48	51.96	2.25	0.74	87.057	1.000	
10	84.66	12.89	76.41	2.51	0.33	87.3063	1.000	
11	36.24	8.60	50.56	2.91	0.93	95.5742	1.000	Selected
12	84.35	13.93	76.06	2.46	0.38	87.4354	1.000	
13	56.99	14.47	66.85	2.64	0.69	87.0648	1.000	

Optimim koşullar; %36,24 genlik, 8,6 dk. SÖD uyg. süresi, % 50,56 EtOH, 2,91 cm prob pozisyonu, %0,93 görev döngüsü ve 28 Ç/K Oranı, 30ºC sıcaklık olarak belirlenmiştir**.**

Deney doğrulama (experimental verification) CYY ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için yapılan deney doğrulama sonuçlarından, Toplam Antioksidan Aktivitesi **% 95,57** ve standart sapma **7,89** olarak bulunmuştur.

6. ARAŞTIRMA BULGULARI II

Bu bölümde zeytin yaprağından fitomoleküllerin ekstraksiyonu sonrası HPLC ile analizi için, yeni geliştirilen metoda ait; deney tasarımları, modelleme aşamaları ve ölçme işletim şartlarının optimizasyon çalışmaları sonuçları verilmiştir.

Kromatografik tekniklerle çalışan pek çok analitik laboratuvarında, en iyi kromatografik ayırıma ulaşmak için, çeşitli deneysel koşullardan oluşan kombinasyonlar ile çalışılması, çok zahmetli bir yoldur. Çeşitli işletim parametreleri ile başa çıkmak için, geleneksel yöntem uygulanmakta ve optimum çözüm, deneme yanılma yöntemi ile bir seferde bir değişkeni değiştirerek elde edilmektedir. Bu durum beraberinde çeşitli sorunlar oluşturur.

Günümüzde deneye dayalı yorumlayıcı yöntemlerin uygulanması, kromatografik optimizasyon işlemini sınırlı sayıda deneme ile yönlendirmek için bir anahtardır. Bununla birlikte farklı kromatogramlar ile ayırma kalitesinin karşılaştırılmasında, bu yorumlayıcı yöntemlerin uygulanması için bir sayısal yanıt elde etmek gerekir. Farklı kemometrik stratejilerin uygulanması ile aynı anda birden fazla optimizasyon hedefini değerlendiren çok amaçlı optimizasyona, kromatografik cevap fonksiyonu dahil edilebilir.

Son yıllarda, spesifik bir kromatogramda ayırma kalitesini iyileştirmek için, seçicilik, alıkonma faktörü, analiz süresi ve pik sayısı gibi ayrılma kalitesi kriterleri, ayrı ayrı ya da birlikte, kromatografik cevap fonksiyonu (CRF) ile birlikte kullanılmaktadır.

Literatürde CRF ile ilgili çalışmalar arasında, daha önce tanımlanan CRF (Berridge 1982, Morris vd. 1996, Duarte ve Duarte 2010) tanımı ile ilgili sorunları aşmak için, Jancic-Stojanovic vd. (2011) beş bileşikli bir karışımın kromatografik analizinde, NCRF olarak adlandırılan yeni bir CRF denklemi önermektedir.

NCRF aşağıda tanımlanmıştır;

$$NCRF = \left[\alpha \left(1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^{n-1} \theta_{s,l}}{N} \right) \right) + 1 \right] \mathrm{X} \left(1 + \left(\frac{t_f}{t_{opt}} \right)^b \right) \tag{6.1}$$

Burada;

t_f: Kromatogramdaki en son pikin elüsyon zamanı,

t_{opt}: Optimum analiz zamanı,

α ve b: seçilen düzeltme katsayıları,

n: pik sayısı,

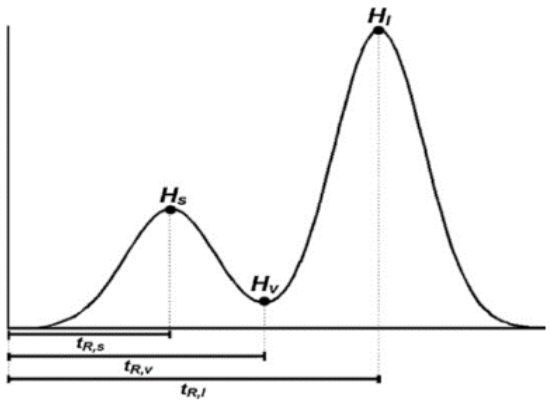
N: pik çiftlerinin sayısı,

θs,l: komşu pikler arasında pik-çukur oranı için Kaiser tanımı kullanılarak, Carle (1972) tarafından geliştirilmiş, ayırma kriterlerinin bir derecesi (Duarte ve Duarte, 2010 tarafından yaygınlaştırılmıştır.)

dir.

$$\theta_{s,l} = 1 - \left[\frac{\left(H\nu \times \left| t_{R,l} - t_{R,s} \right| \right)}{\left(\left| t_{R,\nu} - t_{R,s} \right| \times \left(H_l - H_s \right) + H_s \times \left| t_{R,l} - t_{R,s} \right| \right)} \right] \tag{6.2}$$

Burada, H_l, H_s, $H\nu$, t_{Rl}, t_{Rs} ve $t_{R\nu}$ ifadeleri şekil (6.1)'de tarif edildiği gibi, bitişik iki pikten küçük ve büyük piklerin yükseklikleri, pikler arasındaki çukurların yükseklikleri ve bu piklerin sırası ile elüsyon zamanlarıdır.



Şekil 6.1 1D kromatogramın, Carle (1972)'den uyarlanmış, pik çiftleri arasında ayırma kriteri parametrelerinin şematik gösterimi

Morris vd (1996) tarafından geliştirilen ve aşağıda denklemi verilen CEF (kromatografik üstel fonksiyon), 17 bileşenli fenol karışımının kapiler gaz kromatografi sistemi ile ayırımının optimizasyonu amacı ile kullanılmıştır.

$$CEF = \left[\left(\sum_{i=1}^{N-1} \left(1 - e^{a\left(R_{opt} - R_i\right)} \right)^2 \right) + 1 \right] \times \left(1 + \frac{t_f}{t_{\max}} \right) \tag{6.3}$$

Burada;

$R_{opt:}$ Seçilen en iyi ayırma gücü,

$R_{i:}$ IUPAC kromatografik ayırma gücü ölçümü (Ettre, 1993),

t_{max}: Maksimum olarak kabul edilebilir bir süre

dir. Kalan diğer parametreler, NCRF tanımında (denklem 6.1) tarif edilmektedir.

Diğer bir tanım olan DCRF, Duarte ve Duarte (2010) tarafından kompleks organik karışımların boyut-eleme kromatografisi ile ayırımın optimizasyonu için geliştirilmiştir.

$$DCRF = N + \sum_{i=1}^{N-1} \theta_{s,l} - f(t) \tag{6.4}$$

N: kromatogramda izlenen piklerin toplam sayısıdır, $\theta_{s,l:}$ denklem (6.2)'de verilen ayırım kriteri derecesidir, f (t): zaman tasarrufu sağlayan bir kriterdir ve denklem (6.5)'de tanımlanmıştır.

$$f(t) = \frac{t_{R,L} - t_0}{t_{R,L}} \tag{6.5}$$

Burada;

$t_{R,l:}$En son pikin elüsyon zamanı,

$t_{0:}$Ekstra kolon hacmine karşılık gelen elüsyon zamanı

dır.

Jancic-Stojanovic vd. (2011) kompleks karışımların kromatografik ayırım işleminin optimizasyonu için, önerdikleri yeni CRF fonksiyonunun, diğer tanımlara göre önemli ölçüde daha iyi olduğunu iddia etmişlerdir. NCRF'nin özellikle deneyden bağımsız olarak, birkaç kromatografik parametrenin (analizin optimal süresi ve ayrılacak piklerin sayısı gibi) bilinmesi durumunda, basit karışımların ayrılması ve optimum koşullarının bulunmasında, en uygun tanım olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir.

Tez çalışması kapsamında; zeytin yaprağından basit fenolik bileşikler, sekoiridoitler ve flavanoitlerin kromatografik yöntem ile ayrılması ve tayin edilmesi amacıyla, Avrupa Farmokope 2005'de (European Pharmacopoeia 2005) önerilen zeytin yaprağının temel sekoiridoid yapısı oleuropeinin, MeOH ve EtOH ile ekstraksiyonu sonrası HPLC sistemi ile analizine dayalı yönteme alternatif olarak geliştirilecek yeni analiz yönteminin, yöntem koşullarının ve bunların optimizasyon çalışmaları için, DCRF ve NCRF cevap değişkenleri olarak kullanılmıştır. Avrupa Farmakopisinde kullanılan yöntemin en büyük sorunu ODS-4 analitik kolonu kullanıldığında oleuropein ve apigenin-7-glikozit piklerinin çakışması ve birbirinin içine girmesidir. Yeni geliştirilen yöntemde özellikle bu iki pikin birbirinden ayrılması ve analiz süresinin mümkün olduğunca kısaltılması hedeflenmiş ve farklı senaryolar oluşturulmuştur.

6.1 İzokratik Yöntem Optimizasyonu

6.1.1 İzokratik elüsyon yöntemi için ön optimizasyon çalışması

Zeytin yaprağının temel bileşenlerinden hidroksitirozol, tirozol, oleuropein, apigenin-7-glikozit, luteolin-7-glikozit ve luteolinin izokratik ters faz HPLC sisteminde ayrılması için işletim koşullarının en optimal noktaları belirlenmiştir. Bu amaçla deneysel tasarım yapılmış, MeOH (%v/v), asetik asit çözeltisi (%v/v), akış hızı (mL/dk) bağımsız değişkenler, NCRF ve DCRF bağımlı değişken cevap faktörleri olarak kullanılmıştır. 20 noktalı tasarım noktalarında fotodiyot-array dedektör (DAD) kullanılarak, 280 nm dalga boyunda kromatogramlar alınmıştır. Shimadzu *LC Solution* yazılım programı ile her bir kromatogramdan NCRF ve DCRF tanımında kullanılacak verilere ulaşılmıştır.

Üç bloklu merkezi birleşik tasarım (CCD) uygulanan cevap yüzey tasarımında, kullanılan bağımsız değişkenlerin, incelenen etkinlik aralığı çizelge 6.1' de ve izokratik elüsyon yönteminin optimizasyonu için deneysel tasarım noktaları çizelge 6.2'de verilmiştir.

Çizelge 6.1 İzokratik elüsyon yönteminin optimizasyon için, üç faktörlü CCD tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı

	Sıralama ve Seviyeleri				
Faktörler (Bağımsız Değişkenler)	**+1,68 (+α)**	**+1**	**0**	**-1**	**-1,68 (-α)**
A : MeOH (v/v)	99,0	80,74	52,50	24,30	5,00
B : Asetik Asit (v/v)	6,00	4,80	3,10	1,30	0,20
C : Akış hızı (mL/dk)	1,75	1,40	1,365	1,00	0,80

Çizelge 6.2 İzokratik elüsyon yöntem optimizasyonu deneysel tasarım noktaları

			Factor 1	Factor 2	Factor 3
Std	Run	Blok	A:MeOH, %v/v	B:Asetik Asit, %v/v	C:Akış Hızı, mL/dk
6	1	1.Gün	80,74 (+1)	1,30 (-1)	1,75(+1,68)
10	2	1.Gün	52,50 (0)	3,10(0)	1,40(+1)
4	3	1.Gün	24,30 (-1)	1,30(-1)	1,00(-1)
9	4	1.Gün	52,50 (0)	3,10(0)	1,40(+1)
1	5	1.Gün	24,30(-1)	4,80(+1)	1,75(+1,68)
7	6	1.Gün	80,74(+1)	4,80(+1)	1,00(-1)
12	7	2.Gün	80,74(+1)	4,80(+1)	1,75(+1,68)
11	8	2.Gün	80,74(+1)	1,30(-1)	1,00(-1)
8	9	2.Gün	24,30(-1)	1,30(-1)	1,75(+1,68)
5	10	2.Gün	52,50(0)	3,10(0)	1,40(+1)
3	11	2.Gün	24,30(-1)	4,80(+1)	1,00(-1)
2	12	2.Gün	52,50(0)	3,10(0)	1,40(+1)
16	13	3.Gün	52,50(0)	3,10(0)	0,80(-1,68)
17	14	3.Gün	52,50(0)	6,00(+1,68)	1,40(+1)
13	15	3.Gün	5,00 (-1,68)	3,10(0)	1,40(+1)
14	16	3.Gün	52,50(0)	3,10(0)	1,36(0)
19	17	3.Gün	99,00(+1,68)	3,10(0)	1,40(+1)
15	18	3.Gün	52,50(0)	0,20(-1,68)	1,40(+1)
20	19	3.Gün	52,50(0)	3,10(0)	1,75(+1,68)
18	20	3.Gün	52,50(0)	3,10(0)	1,40(+1)

Tasarım noktalarında elde edilmiş kromatogramlardan tespit edilen altı polifenolik bileşiğe ait alıkonma zamanları, çizelge 6.3'de verilmiştir. Deneysel tasarımın herbir noktasında, altı polifenolik bileşiğin standart karışımının kromatografik olarak ayrılması ile elde edilen (kromatogramlardan hesaplanan) veriler ve bu verilerden hesaplanarak, denklem 6.2'de tanımlanan $\theta_{s,l}$ çizelge 6.4'de verilmiştir.

Tasarım noktalarının farklı işletim noktalarında, bileşenlerin farklı davranış karakteristikleri incelenmiştir. Ayırımı yapılan altı polifenolik bileşiğin, gözlemlendiği koşullar Run11 ve Run20'de sağlanmıştır. $\theta s,l$ değerleri kullanılarak hesaplanan NCRF ve DCRF değerleri çizelge 6.5'de verilmiştir.

Çizelge 6.3 İzokratik elüsyon yöntem için deney tasarımı noktalarında elde edilmiş kromatogramlardan sağlanan, ayırımı yapılan bileşiklerin alıkonma zamanları

Run	Hidroksi tirozol	Tirozol	Luteolin-7-Glikozit	Apigenin-7-Glikozit	Oleuropein	Luteolin
1	-	-	2,027	-	2,140	2,806
2	2,979	3,370	3,995	-	4,886	9,667
3	6,710	10,501	-	-	-	-
4	3,168	3,594	4,341	-	5,343	10,752
5	3,542	5,221	-	-	25,690	29,506
6	-	-	-	-	3,295	3,595
7	-	-	-	-	2,006	2,331
8	-	2,976	3,157	-	3,348	4,221
9	5,720	9,053	-	-	-	-
10	3,177	3,605	4,362	-	5,368	10,792
11	4,386	5,652	12,948	17,538	19,880	55,847
12	3,191	3,621	4,378	-	5,391	10,848
13	3,985	4,334	4,908	-	5,510	8,638
14	2,473	2,270	2,666	-	2,956	4,345
15	9,800	18,03	-	-	-	-
16	3,189	3,618	4,372	-	5,387	10,768
17	-	-	-	2,158	2,348	-
18	3,240	3,678	4,450	-	5,483	11,064
19	2,249	2,562	3,165	-	3,934	7,987
20	3,692	4,345	6,279	6,887	8,287	19,452

Çizelge 6.4 İzokratik yöntem optimizasyonu deney tasarımı noktalarından elde edilen kromatogramlardan sağlanan, $\theta_{s,l}$ tanımlamasında kullanılan veriler ve hesaplanmış $\theta_{s,l}$ değerleri

Run	t_s	t_l	t_{rv}	t_0	t_f	t_{opt}	H_v	H_s	H_l	$\Theta_{1,2}$	$\Theta_{2,3}$	$\Theta_{3,4}$	$\Theta_{4,5}$	$\Theta_{5,6}$	$*\Theta_{4,6}$	$\Theta_{top,}$
1	2,112	2,220	2,123	0,70	2,806	25	76000	72692	166718			0,076			1	**1,076**
2	2,979	3,370	3,211	0,50	9,669	30	3000	19158	29845	0,882						**3,848**
	3,370	3,995	3,740				800	391409	277984		0,9975					
	3,995	4,886	4,520				1200	14045	54674			0,9684			1	
3	6,710	10,501	-	1,35	10,501	20		575347	912292	1						**1,000**
4	3,168	3,594	3,420	0,50	10,752	30	2150	15563	23264	0,893						**3,844**
	3,594	4,341	4,020				450	23264	10738		0,972					
	4,341	5,343	4,939				600	10738	40846			0,979			1	
5	3,542	5,218	4,235	1,94	29,521	35	200	25962	33768	0,993						
	25,626	29,521	28,555				2200	9777	4214					1	0,6067	**2,599**
6	3,295	3,595	3,520	0,31	3,595	15	76214	348797	75000			1			0,4687	**1,468**
7	2,006	2,331	2,240	0,18	2,331	15	10000	343673	78425			1			0,9345	**1,935**
8	2,978	3,157	2,987	1,80	4,221	20	5200	4815	110840		0,999					**2,237**
	3,157	3,348	3,158				115400	110840	312159			0,238			1	
9	5,720	9,053	-	1,34	31,820	40		68486	104293	1	1					**2,000**
10	3,177	3,605	3,456	2,15	10,792	30	1500	13744	20580	0,9176						**3,857**
	3,605	4,362	4,053				450	20580	9465		0,968					
	4,362	5,368	4,971				750	9455	36549			0,971			1	
11	17,538	19,880	18,443	0,34	55,847	65	1200	4054	47942	1	1	1	0,943	1		**4,943**
12	3,191	3,621	3,487	1,68	10,848	30	1800	14376	21687	0,9073						**3,865**
	3,621	4,378	4,084				355	21687	9957		0,9755					
	4,378	5,391	5,002				500	9957	38066			0,9817				
13	3,985	4,334	4,160	0,371	8,638	30	1000	3345	8065	0,825						**3,579**
	4,334	4,908	4,523				4000	8058	100158		0,8958					
	4,908	5,510	5,259				22500	100158	200316			0,8581			1	

Çizelge 6.4 İzokratik yöntem optimizasyonu deney tasarımı noktalarından elde edilen kromatogramlardan sağlanan, $\theta_{s,l}$ tanımlamasında kullanılan veriler ve hesaplanmış $\theta_{s,l}$ değerleri (devam)

Run	t_s	t_l	t_v		t_0	t_f	t_{opt}	H_v	H_s	H_l	$\Theta_{1,2}$	$\Theta_{2,3}$	$\Theta_{3,4}$	$\Theta_{4,5}$	$\Theta_{5,6}$	$*\Theta_{4,6}$	$\Theta_{top,}$
14	2,270	2,473	2,325		0,250	4,574	15	4000	4552	49072	0,759						**3,068**
	2,473	2,666	2,560					35000	49072	125035		0,580					
	2,666	2,956	2,872					44000	125035	177630			0,729			1	
15	9,80	18,03			2,73	18,030	75				1						**1,000**
16	3,189	3,618	3,459		2,10	10,784	30	1510	13789	20610	0,908						**3,790**
	3,595	4,372	4,059					470	20610	9565		0,981					
	4,341	5,387	4,975					760	9504	36498			0,901			1	
17	2,158	2,348	2,219		0,77	2,348	10	187500	289420	311669				0,368			**0,368**
18	3,241	3,679	3,531		0,10	11,059	30	1800	12457	18791	0,892						**3,839**
	3,679	4,452	4,139					400	18791	8616		0,969					
	4,452	5,486	5,056					500	8616	32958			0,978			1	
19	2,249	2,562	2,432		0,21	7,982	15	6000	43502	64906	0,893						**3,835**
	2,562	3,165	2,901					1250	64908	30004		0,972					
	3,165	3,934	3,605					2250	30004	110390			0,970			1	
20	3,692	4,345	4,117		0,18	19,452	25	200	7139	10703	0,979						**4,697**
	6,279	6,887	6,720					500	4508	739		1	0,718*	1	1		

*$\Theta_{4,6}$: apigenin-7-glikozitin kromatogramda gözlenmediği durumlarda, oleuropein ile luteolin arasındaki ilişkiyi temsil etmektedir.
1.hidroksitirozol 2. tirozol 3.luteolin-7-glikozit 4. apigenin-7-glikozit 5.oleuropein 6.luteolin

Çizelge 6.5' de verilen NCRF değerleri hesaplanırken, aşağıda belirtilen kabuller yapılarak, üç farklı senaryo ile esnek NCRF değerleri hesaplanmıştır.

Kabuller;

$\alpha \rightarrow$ 1-5; $b \rightarrow$ 0-5
$\alpha \rightarrow max$; $b \rightarrow min$; NCRF$\rightarrow$opt
$\alpha \rightarrow max$; b$\uparrow$ t_{opt} küçük $t_f \rightarrow t_{opt}$

Senaryo 1: α:3; b:0,05 NCRF1
Senaryo 2: α:3; b:3 NCRF2
Senaryo 3: α:1; b:0,5 NCRF3

Çizelge 6.5 İzokratik elüsyon yönteminin optimizasyonu deney tasarımı noktalarında cevap değişkenlerinin (NCRF, DCRF) değerleri

Std	Run	Block	NCRF 1	NCRF 2	NCRF 3	DCRF
6	1	1.Gün	6,6	3,5	2,4	6,3
10	2	1.Gün	4,0	3,8	2,7	8,9
4	3	1.Gün	5,3	4,0	3,2	6,0
9	4	1.Gün	4,1	2,2	2,2	8,9
1	5	1.Gün	5,4	4,3	3,0	7,7
7	6	1.Gün	6,3	3,3	2,6	6,6
12	7	2.Gün	5,8	3,1	2,3	7,0
11	8	2.Gün	5,5	2,9	2,4	7,7
8	9	2.Gün	6,0	4,5	3,2	7,1
5	10	2.Gün	4,0	2,2	2,2	9,1
3	11	2.Gün	3,0	2,5	2,3	10,0
2	12	2.Gün	4,0	2,2	2,2	9,0
16	13	3.Gün	4,3	2,3	2,2	8,6
17	14	3.Gün	4,8	2,5	2,3	8,1
13	15	3.Gün	6,8	3,6	2,7	6,2
14	16	3.Gün	4,1	2,2	2,2	8,9
19	17	3.Gün	7,4	3,9	2,9	5,4
15	18	3.Gün	4,1	2,2	2,2	8,9
20	19	3.Gün	4,1	2,4	2,4	8,9
18	20	3.Gün	3,3	2,4	2,3	9,7

Her bir cevap faktörü için tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. Bu yöntemle herbir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güven

seviyesinde verilmiştir. İstatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelden çıkarılmıştır.

İkinci dereceden model:

y= $f(x) = \beta o + \sum_{i=1}^{3} \beta ixi + \sum_{i,j=1}^{3} \beta jixixj + \sum_{i=1}^{3} \beta ii$ x_i^2 +r_i tanımlanmıştır.

NCRF için tanımlanan NCRF1, NCRF2 ve NCRF3 cevap değişkenlerinden NCRF2 ve NCRF3 modellenememiştir. Bu yüzden tasarım NCRF1 ve DCRF'ye göre düzenlenmiş tir.

6.1.1.1 Cevap Faktörü 1: NCRF1 deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları (ön optimizasyon)

Tasarım matrisi ve NCRF1 cevap faktörü için sonuçlar çizelge 6.6'da verilmiştir.

Çizelge 6.6 İzokratik yöntem optimizasyonu NCRF1 cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi df	Ortalam anı	F Değer	p-Değeri (P) > F	
Model	24,89	9	2,77	6,72	**0,0066**	**geçerli**
Blok	0,99	2	0,49			
A-MeOH Oranı	3,98	1	3,98	9,69	**0,0144**	
B-Asetikasit Oranı	8,48 10^{-3}	1	8,48 10^{-3}	0,021	0,8894	
C-Akış Hızı	0,28	1	0,28	0,67	0,4359	
AB	1,01	1	1,01	2,46	0,1553	
AC	0,87	1	0,87	2,11	0,1845	
BC	0,023	1	0,023	0,056	0,8184	
A^2	18,71	1	18,71	45,43	**0,0001**	
B^2	0,053	1	0,053	0,13	0,7284	
C^2	0,80	1	0,80	1,95	0,2003	
Arta Kalan	24,23	8	0,42			
UyumEksikliği	14,10	5	2,81	0,83	**0,5877***	**g.değil**
Hata	10,13	3	4,60			
Düzeltilmiş top,	30,17	19				

Önemli Model Terimleri	**A, A^2**
R^2 : 0.8832 Pred R^2 :-0.8335	R^2 $_{Adj}$: 0.7519

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0.8832 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile %88.3 açıklanabileceğini göstermektedir. Bu sonuç elde edilen model denklemin NCRF1 için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır. Pred R^2 değerinin -0.8335 olması deneysel sonuçlarımın ortalamasının modelden daha iyi olduğunu göstermektedir.

Uyum eksikliği değeri 0.5877 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu durum; izokratik yöntem optimizasyonunda iki amaç fonksiyonlu modelde, MeOH oranı, asetik asit oranı ve akış hızı' nın NCRF1'e etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$$NCRF=+3,83+0,83A+0,092B+0,0283C+0,66AB-0,42AC+0,13BC+1,15A^2+0,22B^2+0,55C^2$$

Gerçek Değerlerle;

$$NCRF=10,083-0,113A-0,639B-4,915C+7,17.10^{-3}AB-0,033AC+0,087BC+1,45.10^{-3}A^2+0,020B^2+2,76C^2$$

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

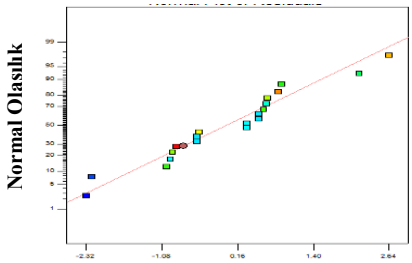
Kodlanmışdeğerlerle;

$$NCRF= 3,83 +0,83A +1,15A^2$$

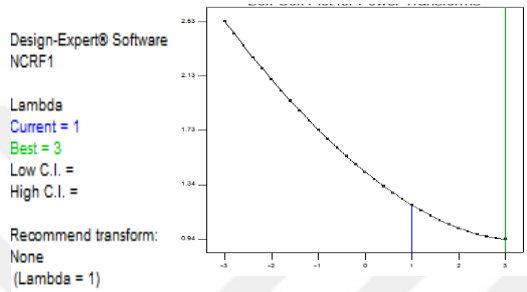
Gerçek Değerlerle;

$$NCRF= 10,083 -0,113A +1,45.10^{-3}A^2$$

Cevap faktörü 1 NCRF1'in çalışma aralığında hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek amacı ile artık değer-normal olasılık grafiği çizilmiş ve şekil 6.2'de verilmiştir



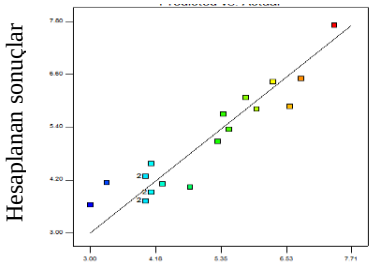
Şekil 6.2 NCRF1 çalışma aralığında artık değer- normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 6.3 Box-Cox grafiği

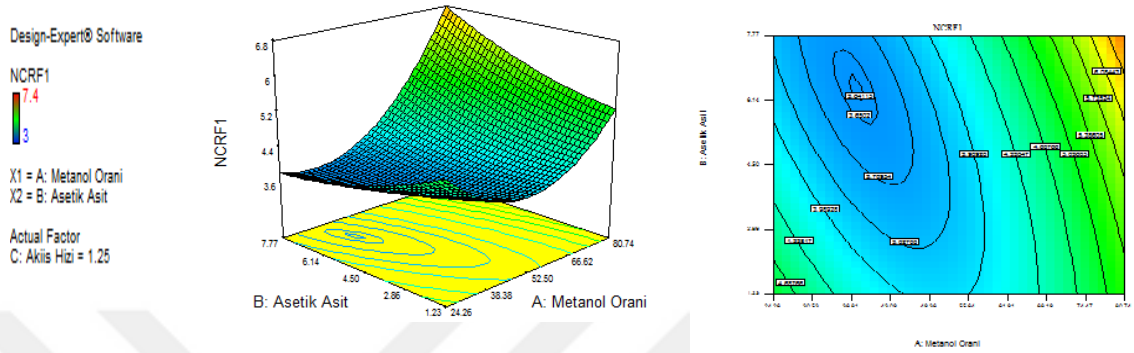
Şekil 6.3'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln'i ile lambda (λ) değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=1,00 bulunduğundan çalışmanın cevap değeri için %95 güven seviyesinde yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 6.4'de verilmiştir.

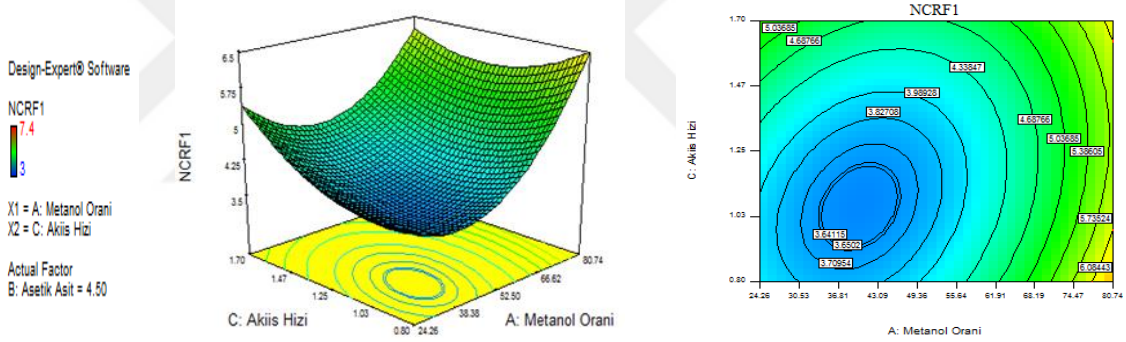


Şekil 6.4 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaş-tırılması

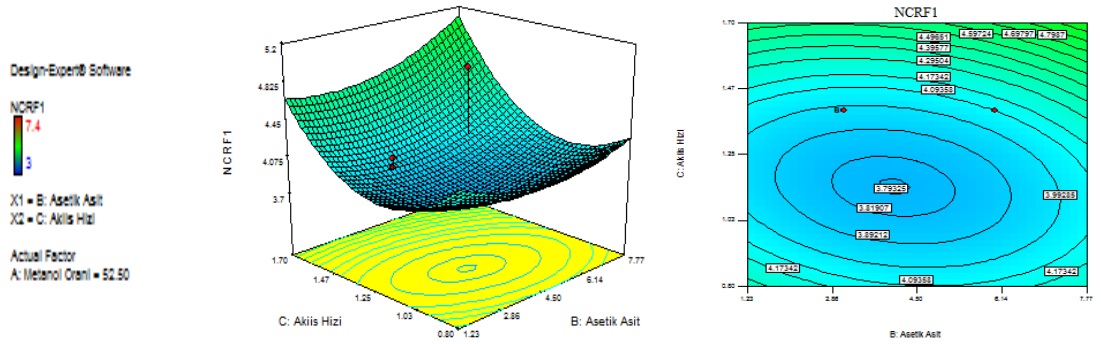
Model denkleminde MeOH oranı ve MeOH'ün iç etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin NCRF1 üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



Şekil 6.5 MeOH oranı-Asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)=+ 3.83+0.83A+0.092 B+0.66AB +1.15A^2+0.22B^2



Şekil 6.6 MeOH oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x) =+3.83 +0.83A +0.0283C - 0.42AC+1.15A^2+0.55C^2



Şekil 6.7 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)=+3.83 +0.092 B+0.0283C +0.13B C +0.22B^2+0.55C^2

Şekil 6.5'de MeOH oranı-asetik asit oranı arasındaki etkileşimi gösteren izdüşüm ve üç boyutlu grafiklerde, yanıt yüzeyinin kısmen eliptik yapısı MeOH-asetik asit arasındaki iç etkileşimin önemli olabileceğini göstermektedir ancak modelde AB (MeOH oranı-asetik asit oranı) için p değeri 0.1553 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. MeOH oranı cevap faktörüne etki ederken asetik asit oranının anlamlı bir etkisi görülmemektedir. Şekil 6.6'da MeOH oranı-akış hızı arasındaki etkileşimi görülmektedir. Yanıt yüzeyi minimum nokta vermekte ve x_0 (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artmaktadır. Modelde AC (MeOH oranı-akış hız) için p değeri 0.1845 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Şekil 6.7' de asetik asit oranı-akış hızı arasındaki etkileşimi verilmiştir. Modelde BC (asetik asit oranı-akış hız) için p değeri 0.8184 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Üç boyutlu yüzey grafiği minimum nokta vermekte ve x_0(0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri artmaktadır. Modelde ikli etkileşimler anlamlı bulunmamıştır.

6.1.1.2 Cevap Faktörü 2: DCRF deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları (ön optimizasyon)

Tasarım matrisi ve DCRF cevap faktörü için sonuçlar çizelge 6.7'de verilmiştir.

Çizelge 6.7 İzokratik yöntem optimizasyonu DCRF cevap faktörü için tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesi, df**	**Ortalamanın karesi**	**F Değeri**	**p-Değeri (p) > F**	
Model	27,26	9	3,03	5,67	**0,0114**	**geçerli**
Blok	2,77	2	1,39			
A-MeOH Oranı	4,41	1	4,41	8,25	**0,0208**	
B-Asetikasit	$3{,}378.10^{-3}$	1	$3{,}378.10^{-3}$	$6{,}32310^{-3}$	0,9386	
C-Akış Hızı	0,31	1	0,31	0,58	0,4684	
AB	3,08	1	3,08	5,77	**0,0430**	
AC	$6{,}812.10^{-3}$	1	$6{,}812.10^{-3}$	0,013	0,9129	
BC	0,51	1	0,51	0,95	0,3572	
A^2	20,65	1	20,65	38,66	**0,0003**	
B^2	0,16	1	0,16	0,30	0,6014	
C^2	0,84	1	0,84	1,58	0,2446	
Arta Kalan	27,43	8	0,78			
UyumEksikliği	15,10	5	3,11	0,85	**0,5641***	**g.değil**
Hata	12,33	3	4,60			
Düzeltilmiş top,	34,31	19				

Önemli Model Terimleri		**A,AB,A^2**
R^2	0,8645	R^2 Adj 0,7121
Pred R^2	-1,116	

(R^2) değeri 0,8645 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 86,5 açıklanabileceğini göstermektedir.

Uyum eksikliği için F testi değeri; 0,85 ve p; 0,5641 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu durum; İzokratik yöntem optimizasyonunda iki amaç fonksiyonlu modelde, MeOH oranı, asetik asit oranı ve akış hızı' nın DCRFye etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, ikinci dereceden model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

$$DCRF=+9.17-0.87A+0.058B-0.30C-1.16AB+0.037AC-0.60BC-1.21A^2-0.37B^2-0.56C^2$$

Gerçek Değerlerle;

$$DCRF=-2.833+0.181A+1.4995B+8.098C-0.0125AB+2.95.10^{-3}AC-0.409BC-1.5210^{-3}A^2-0.0348B^2-2.8C^2$$

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir.
Düzenlenmiş model denklemi:

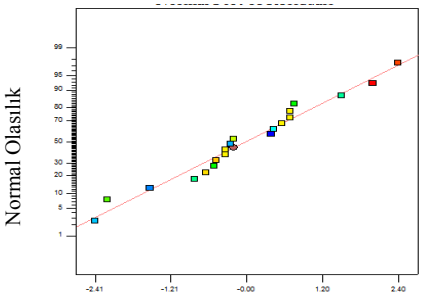
Kodlanmışdeğerlerle;

$$DCRF=+9.17-0.87A-1.16AB-1.21A^2$$

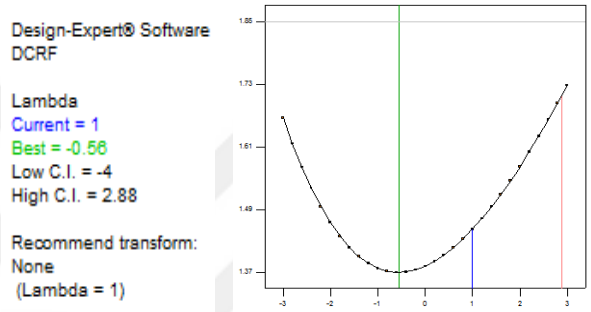
Gerçek Değerlerle;

$$DCRF=-2.8331+0.1814A-0.0125AB-1.5210^{-3}A^2$$

Cevap faktörü 2 DCRF'nin çalışma aralığında artık değer-normal olasılık grafiği şekil 6.8'de verilmiştir.



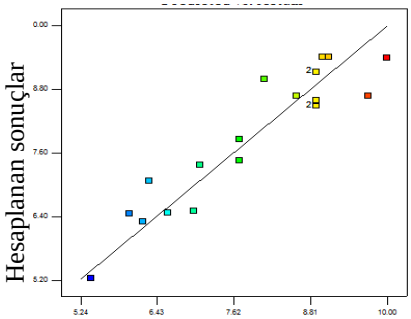
Şekil 6.8 DCRF çalışma aralığında artık değer-normal olasılık (probability) grafiği



Şekil 6.9 Box-Cox grafiği

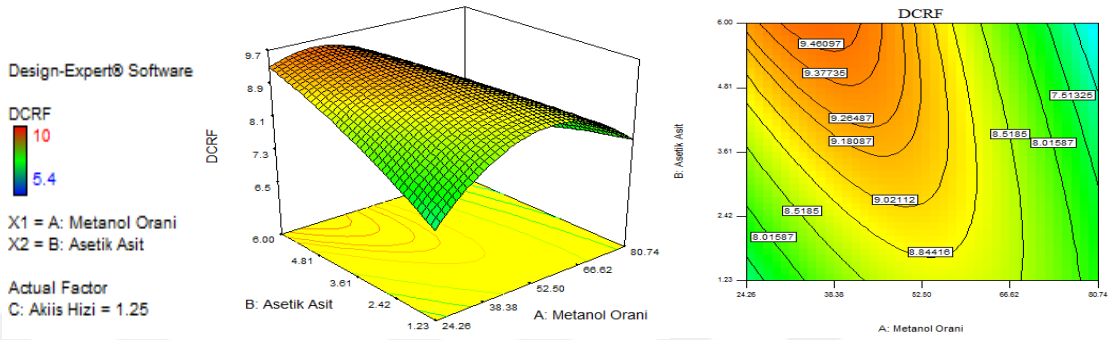
Şekil 6.9'da verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının ln'i ile lambda (λ) değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,56 bulunmuştur. Bu değer 1' e yakın olduğundan çalışmanın cevap değeri için % 95 güven aralığında yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 6.10' da verilmiştir.

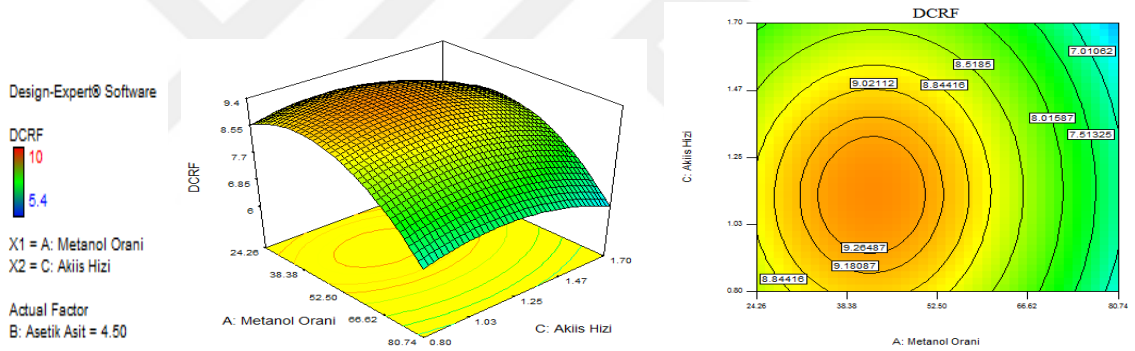


Şekil 6.10 Deneysel sonuçların kuadratik modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

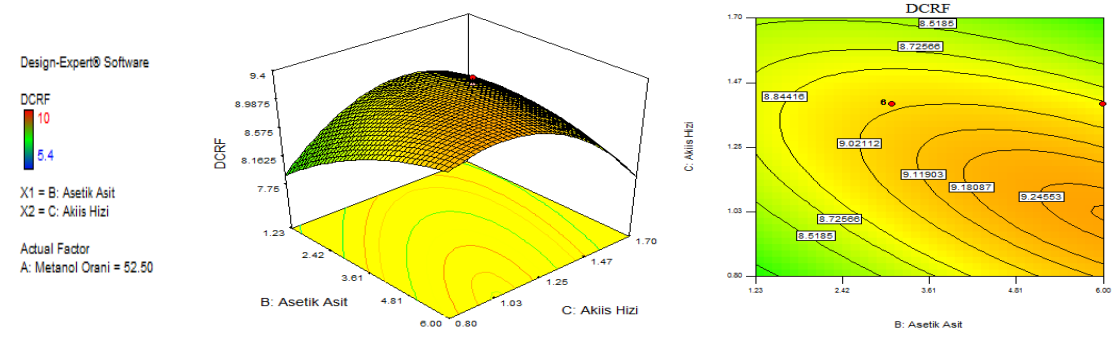
Model denkleminde MeOH oranı, MeOH oranı-asetik asit etkileşimi ve MeOH'ün iç etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin DCRF üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



Şekil 6.11 MeOH oranı-Asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}=f(x)=+9.17-0.87A+0.058B-1.16AB -1.21A^2-0.37B^2



Şekil 6.12 MeOH oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}=f(x)=+9.17-0.87A-0.30C +0.037AC -1.21A^2 -0.56C^2



Şekil 6.13 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{DCRF}= f(x)= +9.17+ 0.058B-0.30C- 0.60BC -0.37B^2-0.56C^2

Şekil 6.11'de verilen MeOH oranı-asetik asit oranı arasındaki etkileşimin p değeri 0.0208 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Cevap yüzeyinde plato bölge etki sözkonusudur ve deneysel bölge, çalışma aralığının dışındadır diyebiliriz. Ancak asetik asit aralığı için, ODS-4 kolonun çalışma sınırları kısıttır ve bu aralık dışına çıkılmamıştır. Şekil 6.12 MeOH oranı-akış hızı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimi göstermektedir. Modelde AC (MeOH oranı-akış hızı) için p değeri 0.9129 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Cevap yüzeyinde maksimum veren bir plato bölge sözkonusudur. x_0 (0,0) noktasından uzaklaştıkça cevap değerleri azalmaktadır. Şekil 6.13'de asetik asit oranı-akış hızı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşim, modelde p değeri 0.3572 hesaplanmış olduğundan anlamlı bulunmamıştır. Cevap yüzeyi, plato bölge vermektedir ve deneysel bölge çalışma aralığının dışındadır diyebiliriz. Ancak, sıvı kromatografide kullanılan analitik pompanın çalışma aralığında, kolon basıncının maksimum değeri kısıt olarak alınarak, akış hızı en iyi aralıkta tutulduğu için değişikliğe gerek duyulmamıştır.

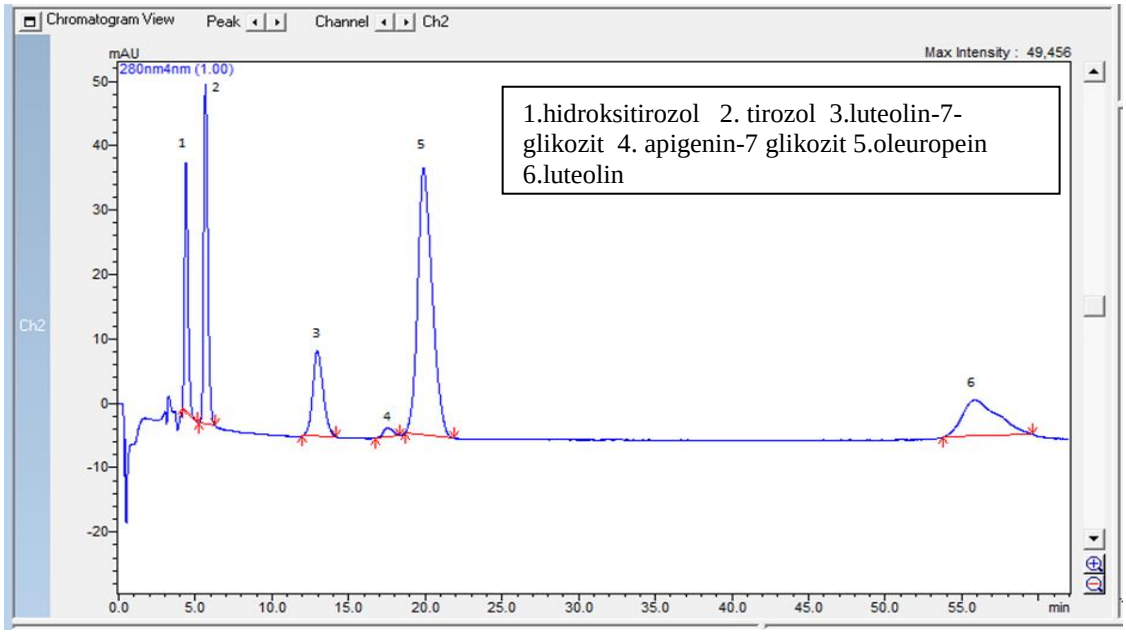
İzokratik yöntem optimizasyonu, deneysel tasarım çalışmaları sonucu iki cevap faktörüne karşı alınan ANOVA sonuçlarında elde edilen yeterli kesinlik sonuçları çalışmanın yeterli veri ile tamamlandığını göstermiştir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranları her bir cevap fonksiyonu için (NCRF1 ve DCRF) sırası ile 8,212 ve 7,349 dur.

Araştırmanın bu aşamasında, optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Optimizasyon kapsamında; doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve çalışma aralığında optimizasyon uygulanarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan Box-Wilsonun dik yokuş yöntemi doğrusal bir regresyon modelle açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır. Üç bağımsız değişken için, Pareto optimal sistemi kullanılmıştır. Çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümü için desirability değerlendirilmiştir. Optimizasyonda desirability çalışmaları sonucu, elde edilen çözüm kümesi çizelge 6.8'de verilmiştir.

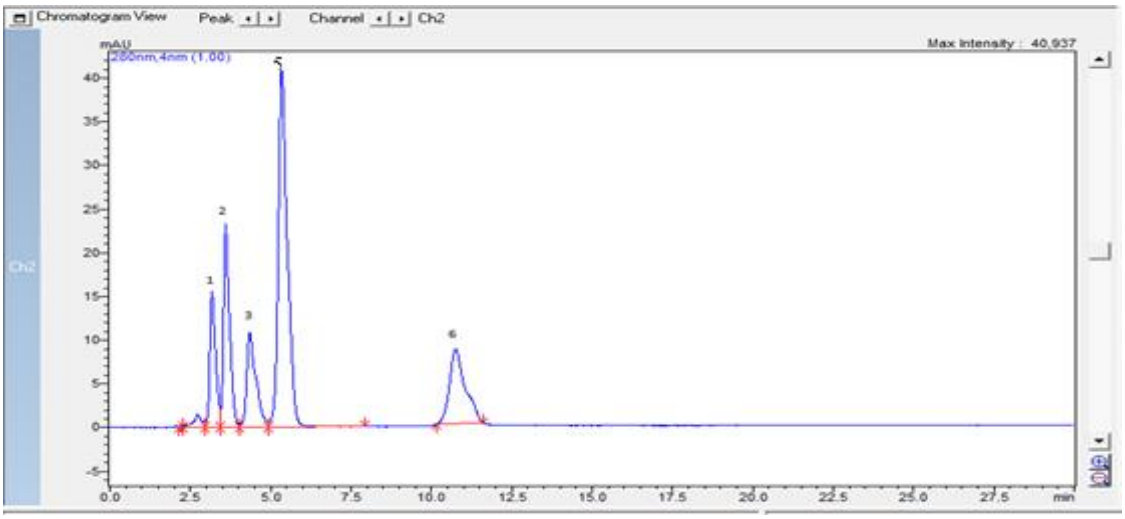
Çizelge 6.8 Çok amaçlı izokratik yöntem optimizasyonu için çözüm kümesi

Çözümler	MeOH % (v/v)	Asetik Asit (%)	Akış Hızı	NCRF1	DCRF	Desirability	
1	24,30	1,3	1,00	4,768	7,089	1	
2	80,70	1,3	1,00	5,597	7,525	1	
3	24,30	4,8	1,00	3,878	8,918	1	Seçildi
4	80,70	4,8	1,00	6,121	6,894	1	Seçildi
5	28,07	1,74	1,52	5,073	6,882	1	
6	76,98	1,67	1,52	5,085	7,510	1	
7	52,50	4,8	1,38	3,972	9,001	1	Seçildi
8	80,74	4,8	1,75	3,895	6,124	1	
9	52,5	3,05	1,38	3,546	8,779	1	

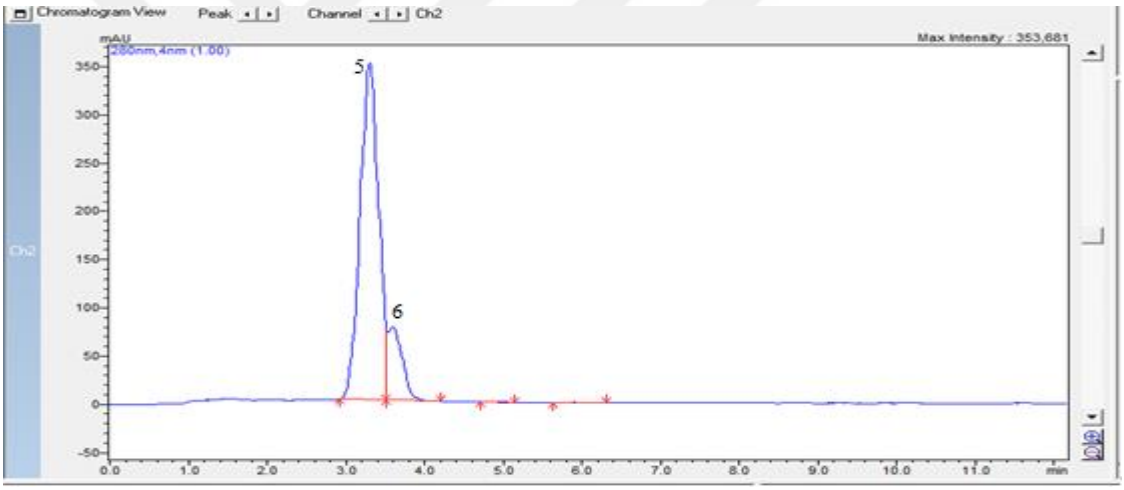
Optimizasyon sonrası elde edilen çözüm kümesinde, tasarım noktalarından Run11 ve Run 20 çalışma koşulları da dikkate alınarak, altı polifenolik bileşenin çizelge 6.3'de verilen alıkonma zamanları göz önüne alınmış, çözüm3 temel optimizasyon noktası olarak değerlendirilmiştir. Çözüm7 optimizasyon orta noktası ve çözüm4 zorlanmış uç nokta olarak alınmıştır. Bu üç optimum noktada alınan kromatogramlar, kromatogram 6.1-6.3'de verilmiştir.



Kromatogram 6.1 İzokratik yöntem optimizasyonu, optimum nokta1için kromatogram krom.koşullar: % 24,30 MeOH; % 4,8 Asetik Asit; Akış hızı: 1,00mL/dk



Kromatogram 6.2 İzokratik yöntem optimizasyonu, optimum nokta2 için kromatogram krom.koşullar:%52,50MeOH;%4,8Asetik Asit; Akış hızı: 1,38mL/dk



Kromatogram 6.3 İzokratik yöntem optimizasyonu, optimum nokta3 için kromatogram krom.koşulları:%80,74MeOH;%4,8AsetikAsit; Akış hızı: 1,00mL/dk

6.1.2 İzokratik elüsyon yöntemi için ara optimizasyon çalışması

İzokratik yöntem optimizasyonunun ikinci adımında, ilk optimizasyon sonuçlarından yararlanılmıştır. Temel optimum nokta olan nokta1 için kromatografik koşullar; % 24,30 MeOH; %4,8 asetik asit; 1,00 ml/dk akış hızı olarak belirlenmiştir. İzokratik yöntemin optimum noktasının işletim koşullarının en önemli sorununu, analiz süresinin uzunluğu oluşturmaktadır. Yaklaşık 65 dakikalık analiz süresi, yöntemin bu açıdan yeniden değerlendirilmesini gerektirmiştir. Analiz süresi; DCRF cevap faktöründe, f (t) ile zaman

tasarrufu sağlayan bir kriter üzerinden değerlendirilmektedir ve denklem 6.5'de tanımlandığı şekli ile kullanılmıştır. Bununla birlikte NCRF tanımında analiz süresi, denklem 6.1' de gösterildiği gibi üstel bir ifade ile tanımlanmış, *b* katsayısı ile daha seçici ve esnek bir özellik kazandırılmıştır. Aynı zamanda, oluşturulan model denklemlerinden, NCRF1'in DCRF'ye göre daha iyi bir model istatistiği geliştirdiği görülmüştür. Bu nedenlerle, bu aşamadan sonraki çalışmalar NCRF1 ile (α:3 b:0.05) değerlendirilmiştir.

Oleuropein ve apigenin-7-glikozit arasındaki ayırım, izokratik yöntem optimizasyonu çözüm noktalarında incelendiğinde, %24.30 MeOH-%75.70asetik asit (%4.8'lik) çözeltisi içeren mobil fazda her iki pik gözlemlenmiş, ancak MeOH oranı arttıkça apigenin-7-glikozit gözlemlenememiştir. Bununla birlikte MeOH'ün artan oranlarında, oleuropeinin pik alanı ve pik yüksekliğinin belirgin şekilde artışı, düşük MeOH oranlarındaki mobil fazda çalışmanın oleuropein için yeterli olmadığını göstermektedir. Aynı spesifik etki luteolin içinde geçerlidir. Bir diğer dikkat çeken konu yüksek MeOH oranlarında oleuropein-luteolin arasında yaşanan pik çakışması sorunu olmuştur.

Oluşturulan modelde, kullanılan bağımsız değişkenlerden sadece MeOH oranının etkisinin anlamlı bulunması; diğer değişkenlerin etkilerinin, MeOH değişkeni olmadan değerlendirilmesi gerektiğini, aynı zamanda yine asetik asit oranı ve akış hızı açısından, çalışma aralığının daraltılması gerekliliğini doğurmuştur. Bu amaçla yeni bir ara tasarım yapılarak, asetik asit ve akış hızı için en iyi değerler belirlenmiş ve analiz süresi tasarıma dâhil edilmiştir. Analiz süresinin tasarımda bağımsız değişken olarak belirlenmesi, daha dar bir optimum analiz süresi belirlemek ve çalışmanın gradient koşullarının belirlenmesinde, ön çalışma verileri elde etmek için önemlidir. Analiz süresinin en düşük çalışma noktası, çalışma aralığında ki en düşük akış hızında mevcut tüm polifenollerin görülebileceği koşuldur.

. Cevap yüzey tasarımında, Box-Behnken indirgenmiş (reduced) kuadretik tasarım modeli uygulanmış ve kullanılan bağımsız değişkenlerin, incelenen etkinlik aralığı çizelge 6.9' da verilmiştir.Yapılan yeni tasarımda, deneysel tasarım noktaları çizelge 6.10'da verilmiştir.

Çizelge 6.9 İzokratik optimizasyon (ara tasarım) üç faktörlü Box-Behnken tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin incelenen etkinlik aralığı

Faktörler(Bağımsız Değişkenler)	**+1**	**-1**
A: Analiz süresi (dk)	35	15
B : Asetik Asit çözeltisi (v/v)	4,80	3,40
C : Akış hızı (mL/dk)	1,65	1,20

Çizelge 6.10 İzokratik optimizasyonu ara deneysel tasarım noktaları ve cevap değerleri

			Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Cevap1 NCRF1	Cevap2 DCRF
Std	Run	Blok	A:Analiz süresi	B:Asetik Asit	C:Akış Hızı		
			dk	%v/v	ml/dak		
5	1	1.Gün	35,00(+1)	3,40 (-1)	1,65(+1)	2,94	10,09
11	2	1.Gün	15,00(-1)	3,40(-1)	1,65(+1)	5,99	7,14
8	3	1.Gün	25,00(0)	3,40(-1)	1,65(+1)	4,91	8,16
4	4	1.Gün	25,00(0)	3,40(-1)	1,65(+1)	3,95	9,13
3	5	1.Gün	35,00(+1)	3,40(-1)	1,45(+0,11)	2,97	10,08
14	6	1.Gün	15,00(-1)	3,40(-1)	1,45(+0,11)	6,82	6,25
9	7	1.Gün	15,00(-1)	3,40(-1)	1,65(+1)	4,96	8,02
10	8	1.Gün	25,00(0)	3,40(-1)	1,65(+1)	2,98	10,10
7	9	1.Gün	35,00(+1)	3,40(-1)	1,65(+1)	2,98	10,03
15	10	1.Gün	35,00(+1)	4,80(+1)	1,45(+0,11)	3,98	9,09
13	11	1.Gün	35,00(+1)	4,80(+1)	1,20(-1)	3,18	9,89
16	12	1.Gün	23,00(-0,20)	4,80(+1)	1,40(-0,11)	3,68	9,42
1	13	1.Gün	22,00(-0,30)	4,80(+1)	1,40(-0,11)	3,66	9,46
6	14	1.Gün	20,00(-0,50)	4,80(+1)	1,40(-0,11)	3,57	9,60
12	15	1.Gün	15,00(-1)	4,80(+1)	1,40(-0,11)	3,87	9,37
2	16	1.Gün	25,00(0)	4,80(+1)	1,20(-1)	3,88	9,43

Her bir cevap faktörü için tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir.

6.1.2.1 Cevap Faktörü 1: NCRF1 deneysel tasarım (ANOVA) sonuçları (ara optimizasyon)

Tasarım matrisi ve NCRF1 cevap faktörü için sonuçlar çizelge 6.11'de verilmiştir.

Çizelge 6.11 İzokratik yöntem optimizasyonu (ara tasarım) NCRF1 cevap faktörü için tanımlanan 2FI modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**df**	**Ortalamanın karesi**	**F**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	16,42	6	2,74	9,43	**0,0019**	**(geçerli)**
A-topt süre	5,48	1	5,48	18,88	**0,0019**	
B-asetik asit	1,85	1	1,85	6,39	**0,0323**	
C-Akış hızı	0,57	1	0,57	1,95	0,1957	
AB	4,23	1	4,23	14,59	**0,0041**	
AC	0,87	1	0,87	2,99	0,1180	
BC	0,31	1	0,31	1,06	0,3298	
Arta Kalan	2,61	9	0,29			
Uyum Eksikliği	0,20	5	0,039	0,065	0,9949	**geçerli değil**
Hata	2,41	4	0,60			
Düzeltilmiş	19,03	15				

Önemli Model Terimleri	**A, B,AB**
R^2 :0,8628	R^2_{Adj} :0,7713

Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8628 olarak elde edilmiştir. Uyum eksikliği değeri 0,9949 hesaplanmış ve önemli (uygun) ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu durum; İzokratik yöntem ara tasarımın optimizasyonun da, iki amaç fonksiyonlu modelde, analiz süresi, asetik asit oranı ve akış hızı' nın NCRF1'e etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan model denklemi aşağıda verilmiştir.

Kodlanmış değerlerle model denklemi;

NCRF=+4,36-0,95A-0,64B-0,51C+1,07AB+0,78AC+0,38BC

Gerçek Değerlerle;

NCRF= +55,74 -1,22A-8,15B -20,75C+0.153AB +0.347AC+2.39BC

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir. Düzenlenmiş model denklemi:

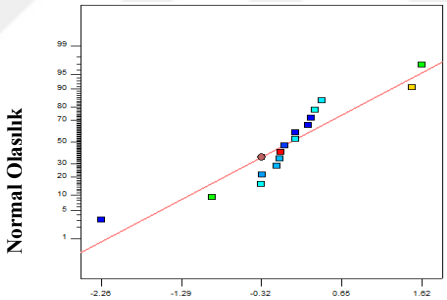
Kodlanmışdeğerlerle;

NCRF= =+4,36-0,95A-0,64B+1,07AB

Gerçek Değerlerle;

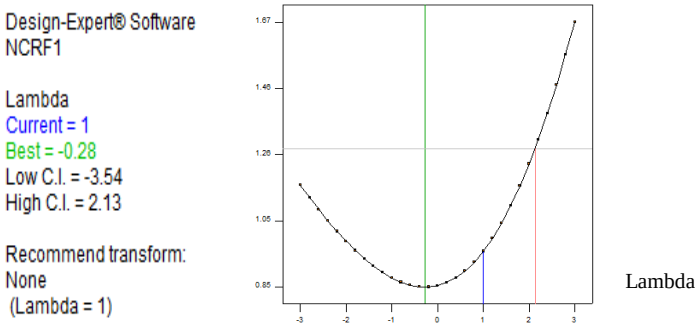
NCRF= +55.74 -1.22 A-8.15B+ 0.153AB

Cevap faktörü 1 NCRF1'in çalışma aralığında artık değer-normal olasılık grafiği şekil 6.14' de verilmiştir.



Şekil 6.14 NCRF1 çalışma aralığında artık değer- normal olasılık (probability) grafiği

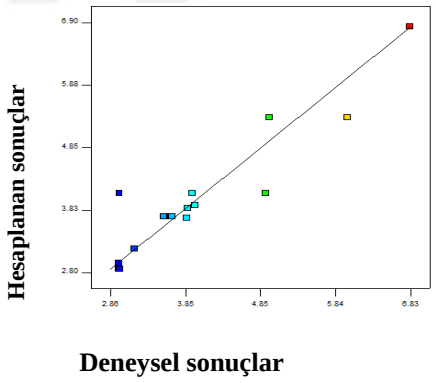
Normal olasılık (dağılım) grafiğinden; hangi etkilerin (bağımsız değişken) ya da etkileşmelerin önemli olduğuna karar vermek amacı ile yararlanılmıştır.



Şekil 6.15 Box-Cox grafiği

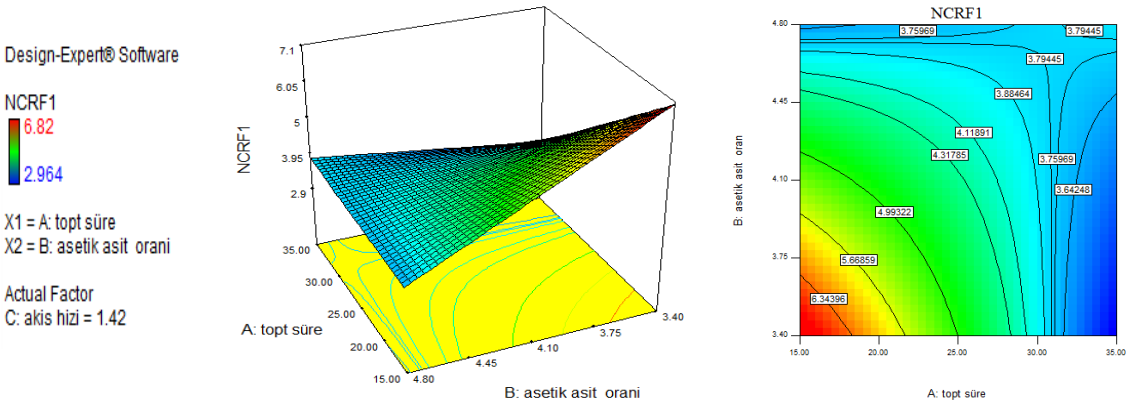
Şekil 6.15'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının doğal logaritması (ln) ile lambda (λ) değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=0,28 bulunmuş, çalışmanın cevap değeri için % 95 aralığında 2F1 modelle yapılmasının uygun olduğu ve ayrıca transformasyona (dönüşüme) gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Deneysel sonuçların modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 6.16' da verilmiştir.

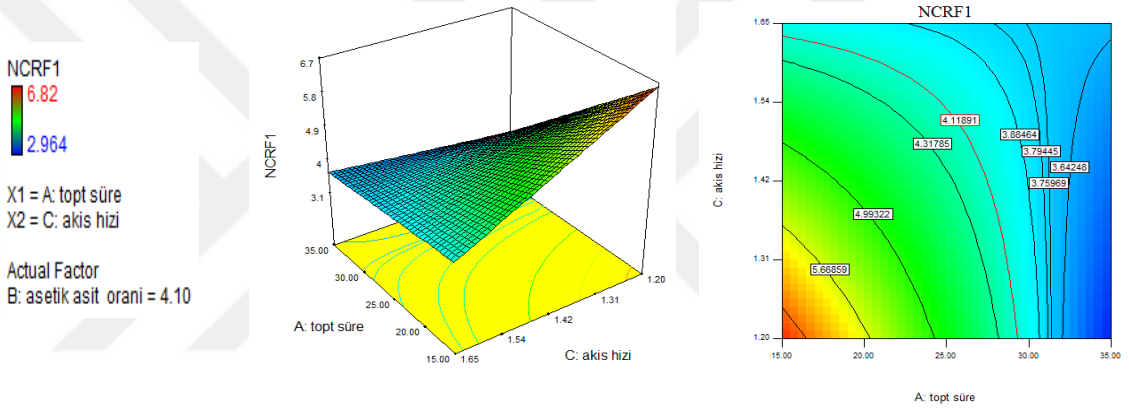


Şekil 6.16 NCRF1 için deneysel sonuçların 2FI modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

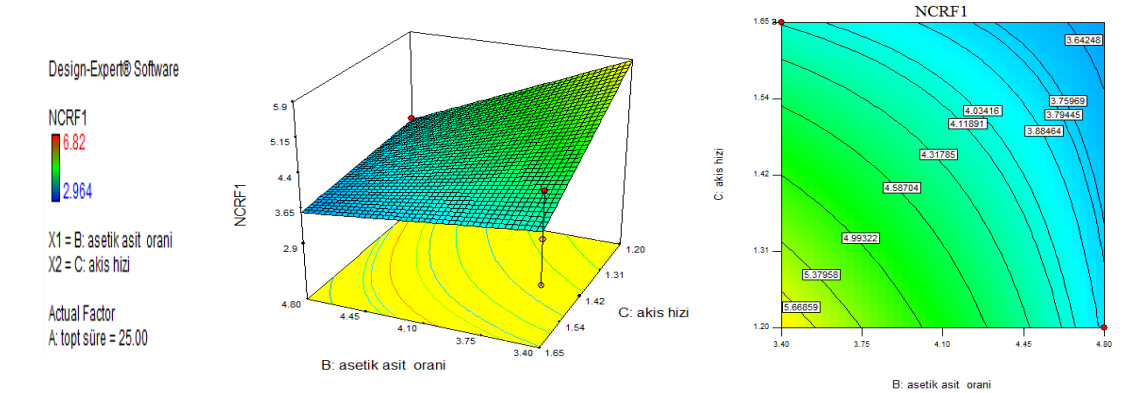
Model denkleminde analiz süresi, asetik asit oranı ve bu etkilerin ikili etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin NCRF1 üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



Şekil 6.17 Analiz süresi-Asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1}=f(x)=+4,36-0,95A-0,64B+1,07AB



Şekil 6.18 Analiz süresi-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1} =f(x)= +4,36-0,95A -0,51C +0,78AC



Şekil 6.19 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, Y_{NCRF1}=f(x)=+4,36-0,64B-0,51C +0,38BC

Şekil 6.17'de analiz süresi-asetik asit oranı arasındaki etkileşimi gösteren izohips ve üç boyutlu grafiklerde, yanıt yüzeyinin kısmen eliptik yapısı analiz süresi-asetik asit arasındaki iç etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir, modelde AB için p değeri 0,0041 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Analiz süresi cevap faktörüne etki etmezken, asetik asit oranının anlamlı bir etkisi görülmektedir. Şekil 6.18'de analiz süresi-akış hızı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimi görülmektedir. Yanıt yüzeyi eğrilik vermektedir. Modelde AC(analiz süresi-akış hız) için p değeri 0.1180 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Şekil 6.19'da asetik asit oranı-akış hızı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimi verilmiştir. Modelde BC (asetik asit oranı-akış hız) için p değeri 0,3298 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Üç boyutlu yüzey grafiğinde, asetik asit belirgin bir etki vermezken, akış hızı cevap değerlerini artırmaktadır.

6.1.2.2 Cevap Faktörü 2: DCRF deneysel tasarım sonuçları (ara optimizasyon)

Tasarım matrisi ve DCRF cevap faktörü için sonuçlar çizelge 6.12' de verilmiştir.

Çizelge 6.12 İzokratik yöntem optimizasyonu (ara tasarım) DCRF cevap faktörü için tanımlanan 2FI modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	**Kareler toplamı**	**Serbestlik derecesidf**	**Ortalamanın karesi**	**F**	**p-Değeri (P) > F**	
Model	16,62	6	2,77	10,03	**0,0015**	**(geçerli)**
A-Analiz süresi	4,74	1	4,74	17,16	**0,0025**	
B-Asetikasit Oranı	2,01	1	2,01	7,29	**0,0244**	
C-Akış Hızı	0,42	1	0,42	1,52	0,2488	
AB	4,38	1	4,38	15,85	**0,0032**	
AC	0,76	1	0,76	2,74	0,1320	
BC	0,43	1	0,43	1,56	0,2428	
Arta Kalan	2,49	9	0,28			
UyumEksikliği	0,21	5	0,042	0,075	0,9930	**geçerli değil)**
Hata	2,27	4	0,57			
Düzeltilmiş top.	19,11	15				

Önemli Model Terimleri	**A,B,AB**
R^2 : 0,8699	R^2_{Adj} :0,7831

(R^2) değeri 0,8699 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer, deneysel verilerin yüzey merkezli model ile % 86,99 açıklanabileceğini göstermektedir.

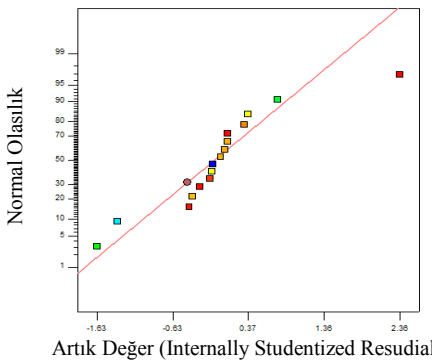
Uyum eksikliği için F; 10,03 ve p değeri 0,9930 hesaplanmış ve önemli ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu durum; İzokratik yöntem optimizasyonunda iki amaç fonksiyonlu modelde analiz süresi, asetik asit oranı ve akış hızı nın DCRF'ye etkilerinin, oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğini göstermektedir.

Bütün parametrelerin etkisi dikkate alınarak oluşturulan, model denklemi aşağıda verilmiştir.

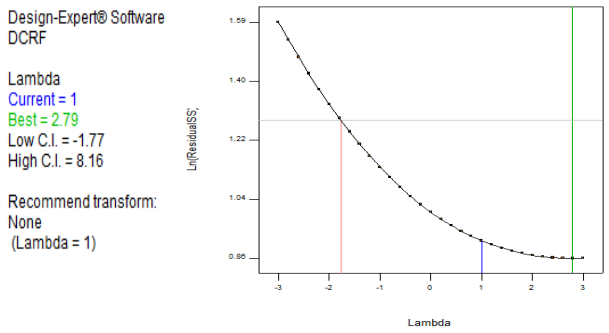
Kodlanmış değerlerle model denklemi;
DCRF=+8,73-0,89A+0,66B+0,44 C-1,09AB-0,73AC-0,45BC
Gerçek Değerlerle;
DCRF= -44,245+1,189A+8,88B +21,684C-0,156AB-0,324AC-2,835BC

Model denklemi en önemli model parametrelerine göre yeniden düzenlenmiştir.
Düzenlenmiş model denklemi:
Kodlanmışdeğerlerle;
DCRF=+8,73-0,89A+0,66B -1,09AB
Gerçek Değerlerle;
DCRF= -44,245 +1,189A +8,88B -0,156AB

Cevap faktörü 2 DCRF'nin çalışma aralığında artık değer-normal olasılık grafiği şekil 6.20' de verilmiştir.

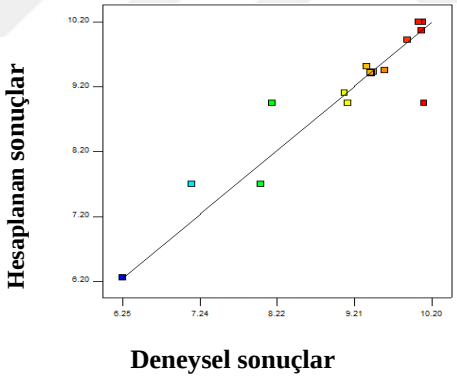


Şekil 6.20 DCRF çalışma aralığında artık değer-normal olasılık (probability) grafiği



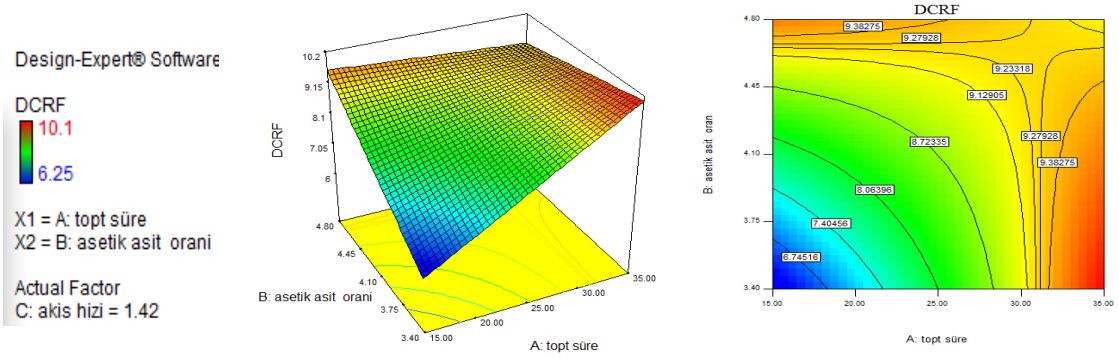
Şekil 6.21 Box-Cox grafiği

Şekil 6.21'de verilen Box-Cox grafiğinde, artıkların kareleri toplamının doğal logaritması (ln) ile lambda (λ) değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen verilere göre λ=2,79 bulunmuştur. Bu değer 1 değerinden farklı olmakla beraber düşük CI ve yüksek CI aralığında kaldığından, y fonksiyonu üzerinde bir kuvvet dönüşümü yapılmasına gerek olmadığı, çalışmanın cevap değeri için %95 seviyesinde 2F1 modelle yapılmasının uygun olduğu anlaşılmıştır. Deneysel sonuçların 2FI modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması şekil 6.22'de verilmiştir.

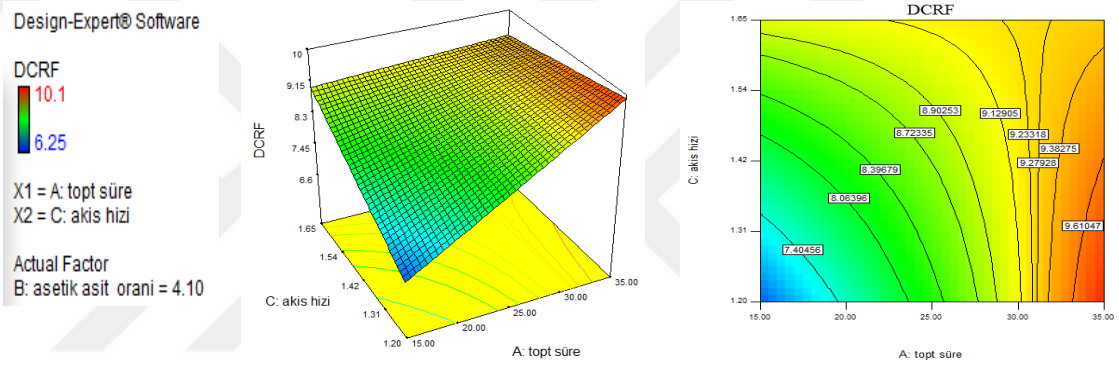


Şekil 6.22 Deneysel sonuçların 2FI modelden hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılması

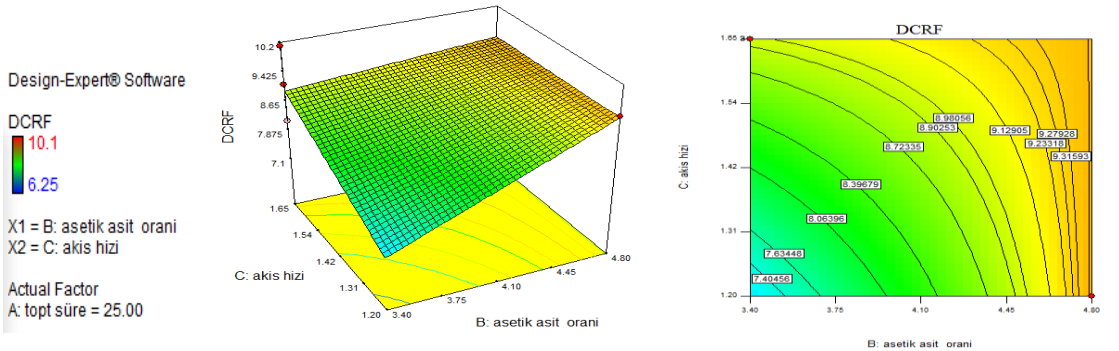
Model denkleminde analiz süresi, asetik asit oranı ve analiz süresi-asetik asit etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir. Parametrelerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin DCRF üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.



Şekil 6.23 Analiz süresi-asetik asit iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{DCRF}=f(x)=+8,73-0,89A+0,66B -1,09AB$



Şekil 6.24 Analiz süresi-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrilik içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{DCRF}=f(x)=+8,73-0,89A +0,44C -0,73AC$



Şekil 6.25 Asetik asit oranı-akış hızı iki faktörlü modeli için, kodlanmış değerlerle eğrili içeren üç boyutlu yüzey grafiği ve izohips eğrisi, $Y_{DCRF}=f(x)=+8,73 +0,66 B+0,44 C -0,45BC$

Şekil 6.23’ de verilen analiz süresi-asetik asit oranı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşimde p değeri 0,0032 hesaplanmış ve anlamlı bulunmuştur. Yüzey grafiği; her iki değişkenin yüksek değerlerinde iki ayrı bölgede eliptik izdüşümleri olduğunu göstermektedir. Şekil 6.24’de analiz süresi-akış hızı arasındaki etkileşimi göstermektedir. Modelde AC (analiz süresi-akış hızı) için p değeri 0,1320 hesaplanmış ve anlamlı bulunmamıştır. Şekil 6.25’ de asetik asit oranı-akış hızı arasındaki (interaksiyon etkileri) etkileşim, modelde p değeri 0,2428 hesaplanmış olduğundan anlamlı bulunmamıştır.

İzokratik elüsyon yöntem optimizasyonu, deneysel ara tasarım çalışmaları sonucu iki cevap faktörüne karşı alınan ANOVA sonuçlarında elde edilen yeterli kesinlik sonuçları çalışmanın yeterli veri ile tamamlandığını göstermiştir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranları her bir cevap fonksiyonu için (NCRF1 ve DCRF) sırası ile 11,160 ve 11,316’ dır.

Optimizasyon kapsamında; doğrusal programlama yapılmış, dinamik ve çalışma aralığında optimizasyon uygulanarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan Box-Wilsonun dik yokuş yöntemi doğrusal bir regresyon modelle açıklanan proseslerin optimizasyonu için kullanılmıştır. Optimum şartları temsil eden çözüm noktasında deneyler yapılmış ve tahmini cevap değerleri ile karşılaştırılmıştır. Üç bağımsız değişken için, Pareto optimal sistemi kullanılmıştır. Çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümü için desirability değerlendirilmiştir. Optimizasyonda desirability çalışmaları sonucu, elde edilen çözüm kümesi çizelge 6.13’ de verilmiştir.

Çizelge 6.13 Çok amaçlı izokratik elüsyon yöntem optimizasyonu (ara tasarım) için çözüm kümesi

Çözümler	Analiz süresi, dk.	Asetikasit çözeltisi, %	Akış hızı, mL/dk.	Desirability	
1	35,00	4,80	1,40	1	Seçildi
2	35,00	4,80	1,20	1	
3	35,00	3,40	1,45	1	
4	35,00	3,40	1,65	1	
5	35,00	4,80	1,45	1	

İzokratik elüsyon yöntemin ara tasarımının optimizasyonunda, 35 dak. analiz süresi, % 4,8 asetik asit oranı, 1.40 ml/dak akış hızı optimum analiz yöntemi işletim noktaları olarak seçilmiştir. Optimum nokta seçiminde,NCRF1 cevap değişkenini maksimum yapan 1,2 ve 5. Çözüm noktası içinde en iyi kromatogram tekrarlanabilirliğini veren nokta seçilmiştir. Belirlenen sonuçlar izokratik elüsyon yöntemin ilk tasarımından elde edilen optimum çalışma noktaları ile uyum içindedir.

Bu aşamada gradient elüsyonun gerekliliğine net bir karar verebilmek amacı ile gradient koşul karar verme kriterleri değerlendirilmiştir. Kromatografik çalışmalarda gradient çalışmanın gerekli olduğuna;

$$\Delta t/t_G < 1/S\Delta\varphi \; log \; (k_2/k_a)_{max}$$

yaklaşımı ile karar verilir. Δt: son pik ile ilk pik arasındaki fark, t_G; gradient süresi olmak üzere

1. $\Delta t/t_G > 0,25$ gradient
2. $\Delta t/t_G < 0,25$ izokratik çalışma koşuludur.

Çalışma için $\Delta t/t_G > 0,25$ koşulu geçerli olduğundan, bundan sonraki bölümde gradient yöntem optimizasyonu çalışmalarına geçilmiştir.

6.2 Gradient Elüsyon Yönteminde Doğrusal Çözücü Gücü Modeli *(Linear Solvent Strenght Model-LSSM)* ve Alıkonma Modeli ile Metod Geliştirme Basamakları ve Optimizasyon Sonuçları

Ters faz HPLC yöntemi ile metod geliştirme, çalışılan numuneye uygun olan elüsyon çözücülerinde, numunedeki bileşenlerin ayırımıyla başlar. Eğer başlangıçta izokratik elüsyon çalışılırsa, ayırım için en iyi mobil fazın gücü ile ilgili bir tahmin yapılabilir. Gradient elüsyonda, en iyi gradient aralığın (başlangıç ve bitiş %organik çözücü) belirlenmesi gerekir. Gradient çalışmanın başlangıç aşamasındaki optimum % organik çözücünün tahmini için farklı prosedürler önerilmiştir. Bu prosedürlerden en önemli olanı 'de Galan' yaklaşımıdır ve araştırmacılar tarafından en uygun yaklaşım olarak belirlenmiştir (Snyder ve Dolan, 1996). Bu yaklaşım yaygın olarak kullanılan MeOH, MeCN ve THF'in izokratik koşullarda en optimum %'sinin tahmini ile başlar, bu

aşamadan sonra MeOH/H_2O gradienti ile devam eder. Eğer MeCN kullanımı mümkünse, gradientin başlangıcında MeOH'den daha çok önerilmektedir.

MeCN/H_2O çözücüleri genellikle düşük vizkozluktadırlar ve düşük UV (<210nm)'de dedeksiyona izin verirler. *de Galan* yaklaşımı MeOH/H_2O yerine MeCN/H_2O gradientine dayalı başlangıç ayırım uygulamalarını içerir. Başlangıç aşamasındaki doğru tahminler, gradient adımların iyi anlaşılabilmesi açısından çok önemlidir. Çalışma bu açıdan hem MeOH hemde MeCN/asetik asit çözelti mobil fazlarını içerecek şekilde planlanmıştır. Bu nedenle çalışmanın başlangıç gradient adımlarında; sekoiridoid, flavanoid ve basit fenolik maddelerden oluşan polifenolik karışımın kromatografik ayırımı için MeOH-asetik asit çözelti karışımı kullanılmıştır. Daha sonra MeCN/asetik asit çözelti mobil faz çalışmalarına geçilmiştir. Gradient optimizasyonun aşamaları bölüm 3.6' da verilen temeller esas alınarak çalışılmıştır.

Bu yaklaşımda, organik düzenleyicinin (MeOH, MeCN) mobil fazdaki hacimsel oranı ve alıkonma faktörünün logaritmik değeri arasında lineer olmayan bir ilişki olduğu görülmektedir (denklem 6.6). Bu denklem çeşitli doğrusal gradient koşullarda alıkonma zamanı tahmini için modifiye edilerek, alıkonma modeli ile adapte edilmiştir. Bu yaklaşım, su ile güçlü bir organik çözücünün birarada kullanıldığı sistem olan doğrusal çözücü gücü modelinin de *(linear solvent strenght model-LSSM*) temelini oluşturur.

$$\log k = \log k_w - S\varphi \qquad (6.6)$$

Burada; k: alıkonma faktörü, φ:organik çözücünün hacim fraksiyonu (0.01 x %organik modifiyer aralığı) su için φ=0, *S*:bileşenler için bir sabittir (regular ve irregular) ve ters faz kromatografide $S = 0.25\ (molekül\ ağırlığı)^{1/2}$' dir. Modeli zamanla (t) ilişkilendirerek düzenlersek; c ve d sabit bir değer olmak üzere, % B = c + *dt* yaklaşımı ile

log k= a–bc-b*dt* = (sbt) - (sbt)*t* 'dir.

k 'yı kolonun başlangıcından, gradient süresi boyunca, mobil fazda ki organik çözücü molar fraksiyonunun değişimine göre ifade etmek gerekmektedir. Burada karşımıza

gradient adımlarının tanımlanması gerekliliği çıkmaktadır. Aynı zamanda denklem 3.60 'da verilen eşitlik yardımı ile tanımlama yapılmış ve alıkonma modeli olarak;
$\ln k(\varphi) = c_0 - c_1\varphi + c_2\varphi^2$ seçilmiştir. Bu aşamadan sonra k ifadesini veren denklemler, t ve $\Delta\varphi$ değerlerine göre tanımlanarak çalışılmıştır.

b: instrinsic (deney dışı veri) gradient adımları olarak tanımlandığında;

$b = t_0 \Delta\varphi S / t_G$

olarak ifade edilir ve t_G; gradient süresi'dir.

$t_0 = V_m / F$ olarak hesaplanır.

F: akış hızı,

t_0: kolon ölü zamanı,

V_m: 1,875 ml

(C18, 25cm uzunluk, 4,6mm iç çaplı kolon için) alındığında; $b = V_m \Delta\varphi\, S / t_G F$ 'dir.

Gradient elusyonunda erken elue olan pikler için k* =1/1.5 b olarak tanımlanmıştır. S ve k_w kromatogramdan hesaplanmıştır ve F, t_g ve φ bağımlı değişken olarak kullanılabilecek parametrelerdir. Hesaplanan log k_w ve S değerleri çizelge 6.14' de verilmiştir.

Çizelge 6.14 Başlangıç gradient adımında elde edilen log k_w ve S değerleri

		log k_w	***S***	
1.	Hidroksitirozol	2,275	3,10	Regular (Düzenli)
2.	Tirozol	2,578	2,94	Regular (Düzenli)
3.	Luteolin-7-glikozit	2,919	5,29	Regular (Düzenli)
4.	Oleuropein	3,924	5,81	Regular (Düzenli)
5.	Apigenin-7-glikozit	3,765	5,20	Irregular (Düzensiz)
6.	Luteolin	4,534	4,23	Regular (Düzenli)

Başlangıç gradientinde ilk ve son pik arasındaki mobil faz kompozisyonunun dağılımı;

$$\varphi_i = \left(\left[t_R - t_0 - t_D \right] / t_G \right) \Delta\varphi + \varphi_0 \qquad (6.7)$$

denklemi ile ifade edilmiştir.

Denklem 6.7'de verilen eşitlikte t_R ilk veya son pik bandının alıkonma zamanı olarak alınmıştır. Gradient çalışmaya, izokratik çalışmanın iki ayrı tasarımının optimum şartları, dikkate alınarak başlanmıştır. ODS-4 kolonda (250mm*4,6mm,5µm) mobil faz kompozisyonu (MeOH- %4,8'lik asetik asit çözeltisi) %0-100 aralığında olacak şekilde çalışılmıştır. HPLC sisteminde dwell hacmi, V_D =2,75 mL'dir.

Elüsyonda k'nın ve k*/2 değeri, k=10 koşulunda geçerlidir. Eğer gradient basamakları yada eğimi değiştirilmezse denklem(6.8), φ_i ve φ_l değerleri kullanılarak, sözkonusu numune için gradient aralığını tanımlama için kullanılabilir.

$$\varphi_i = 0.018(t_R - 2.46) + 0.03 \tag{6.8}$$

Gradient koşullarda mobil faz organik çözücü fraksiyonu başlangıç ve bitişte denklem (6.9) ve (6.10) ile hesaplanmıştır.

$$\varphi_0^{'} = \varphi_0 + ((t_i + t_0 + t_D)/t_G)\Delta\varphi \tag{6.9}$$

$$\varphi_l^{'} = \varphi_l + ((t_l + t_0 + t_D)/t_G)\Delta\varphi \tag{6.10}$$

Kromatografik ayırımı geliştirirken, izokratik ve ön gradient çalışmalar karar amaçlı kullanılmıştır. Seçilen gradient adımlar kromatografik çalışmanın başında ve sonunda zaman boşluklarını önlemek için optimize edilmiştir.

Gradient çalışmanın ilk optimizasyon aşamasında gradient aralığı ve analiz süresi bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Bağımlı değişken olarak NCRF1 alınmıştır. Faktoriyel tip, D-optimal (koordinat değişimli) deneysel tasarımda dokuz nokta ile çalışılmıştır. D-optimal faktöriyel tasarım kategorik faktörleri kullanan bir tasarımdır ve genel faktöriyel tasarıma alternatif olarak kullanılmaktadır. D-optimal tasarım belirttiğimiz modele dayanan tüm olası kombinasyonlar için, ideal bir alt küme seçecektir. Bu tasarımda belirtilen model 2FI, 2 faktörlü etkileşim modelidir. Gradient elüsyonun optimizasyon çalışmasında $\Delta\varphi$ değerleri, 0.3, 0.4 ve 0.6' dır. Gradient

optimizasyon için deneysel tasarım noktaları değerleri ve cevap değerleri çizelge 6.15' de verilmiştir.

Çizelge 6.15 Gradient optimizasyonuna ait tasarım noktaları ve cevap değerleri

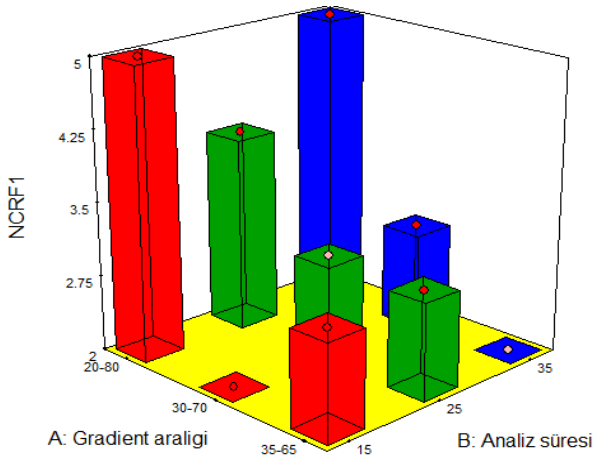
Std	Run	Block 1	%Gradient Aralığı	Analiz süresi (dk)	Cevap1 NCRF1
8	1	Block 1	30-70	35	3
7	2	Block 1	20-80	35	5
6	3	Block 1	35-65	25	3
4	4	Block 1	20-80	25	4
2	5	Block 1	30-70	15	2
1	6	Block 1	20-80	15	5
3	7	Block 1	35-65	15	3
5	8	Block 1	30-70	25	3
9	9	Block 1	35-65	35	2

Optimizasyonda; bağımsız değişkenleri çalışma aralığında, NCRF1 cevap değerini maksimumda tutacak çözüm kümesi, çizelge 6.16'da desirability yaklaşımına göre verilmiştir.

Çizelge 6.16 Gradient yöntem optimizasyonu için çözüm kümesi

Çözümler	Gardient	Analiz	NCRF1	Desirability	
1	20-80	15	5	1,000	Seçildi
2	20-80	35	5	1,000	Seçildi
3	20-80	25	4	0,667	
4	35-65	15	3	0,333	
5	30-70	25	3	0,333	

Cevap değerlerine göre katagorik faktörlerin üç boyutlu gösterimi şekil 6.26'da verilmiştir.



Şekil 6.26 D-optimal fraksiyon tasarım ile katagorik faktörlerin cevap değişkenine göre değişimi

Olası kombinasyonlar içinde en iyi çözüm alt kümesinin belirlenmesi sonucu elde edilen değerlerden, % 20-80 gradient aralığı ve 15 ve 35 dk. analiz süresi en iyi çözümler olarak değerlendirilmiştir.

Gradient optimizasyonun, alıkonma modeli ve doğrusal çözücü gücü modeli için hesaplanan verileri, çizelge 6.17'de verilmiştir. Bu verilerin hesaplanması için çalışma koşullarına karar verme kriterleri, izokratik ve gradient optimizasyondan elde edilen optimum koşullara dayanmaktadır. Çizelge 6.17'de verilen tek doğrusal gradient adımla tanımlanan organik modifiyer $\Delta\varphi$ değerleri; 0.25-1.00 aralığında 36 noktada, simülasyon çalışmasına imkan verecek geniş bir aralıkta tanımlanmıştır.

Çizelge 6.17 MeOH mobil fazlı lineer gradient yöntem optimizasyonu için LSSM modelinde kullanılan, hesaplanmış ve kromatogramlardan ölçülmüş veriler

										Cevap Değişkenleri			
	Kromatografik metod koşulları	Akış hızı F(ml/dk)	Organik modifiyer aralığı	Δφ*	T_g*	t_0	t_f	t_g	θ_{top}	NCRF1	NCRF2	NCRF3	DCRF
1	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,65	30-70	0,40	1,14	1,89	21,59	35	5,00	2,96	1,85	2,08	10,09
2	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,65	30-70	0,40	2,67	1,97	14,61	15	2,00	5,97	5,77	3,31	7,14
3	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,65	30-70	0,40	1,60	1,38	12,38	25	3,00	4,91	2,80	2,56	8,16
4	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,65	20-80	0,60	2,40	1,83	14,32	25	4,00	3,95	2,38	2,34	9,13
5	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	30-70	0,40	1,14	1,74	23,26	35	5,00	2,97	1,50	2,12	10,08
6	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	30-70	0,40	4,67	1,31	5,23	15	1,00	6,82	3,65	2,93	6,25
7	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	80-20	-0,6	4,00	1,95	2,61	15	1,00	6,71	3,52	2,60	6,75
8	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,65	30-70	0,40	2,67	0,18	10,82	15	3,00	4,96	3,44	2,75	8,02
9	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,65	30-70	0,40	1,60	1,81	18,15	25	5,00	2,98	2,07	2,16	10,10
10	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,65	20-80	0,60	1,71	0,90	22,09	35	4,99	2,98	1,88	2,09	10,03
11	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	35-65	0,30	0,75	1,12	19,02	40	1,26	6,62	3,73	3,02	6,32
12	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	15-85	0,70	1,75	1,03	24,60	40	1,68	6,25	3,89	3,07	6,72
13	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	25-75	0,50	1,67	1,11	18,55	30	0,8	7,11	4,45	3,33	5,87
14	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	15-85	0,70	2,33	1,11	20,00	30	1,78	6,16	4,03	3,09	6,84
15	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	35-65	0,30	1,50	0,10	2,03	20	1,10	6,53	3,45	2,40	6,15
16	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	15-85	0,70	3,50	1,12	15,65	20	2,50	5,47	4,07	2,98	7,57
17	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	25-75	0,70	2,50	1,07	2,49	20	0,70	6,94	3,66	2,55	6,13
18	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	35-65	0,70	1,00	0,1	16,96	30	2,40	5,52	3,31	2,80	7,41
19	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	25-75	0,50	1,25	1,01	39,26	40	2,85	5,15	5,01	3,04	7,88
20	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	65-35	-0,30	0,75	1,07	4,63	40	1,87	5,82	3,07	2,26	7,10

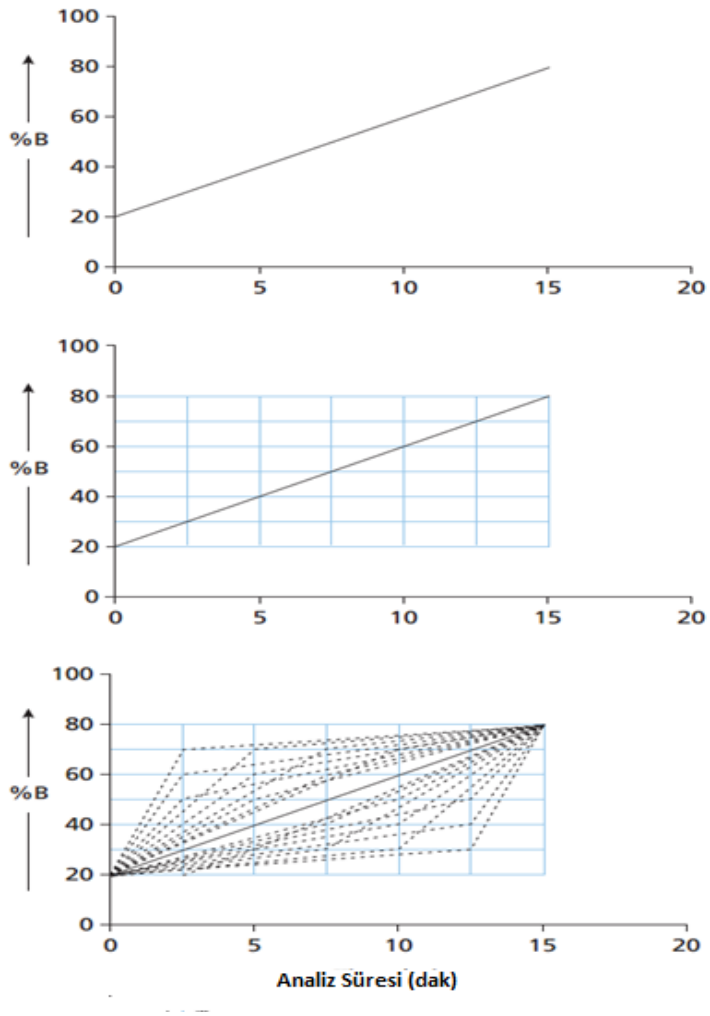
Çizelge 6.17 MeOH mobil fazlı lineer gradient yöntem optimizasyonu için LSSM modelinde kullanılan, hesaplanmış ve kromatogramlardan ölçülmüş veriler (devam)

										Cevap Değişkenleri			
	Kromatografik metod koşulları	Akış hızı F(ml/dk)	Organik modifiyer aralığı	Δφ*	T_g* T gradienti	t_0	t_f	t_g	θ_{top}	NCRF1	NCRF2	NCRF3	DCRF
21	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	85-15	-0,70	1,75	1,01	7,33	40	1,85	5,90	3,09	2,42	6,99
22	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	75-25	0,50	1,67	1,18	3,63	30	1,69	6,00	3,16	2,32	7,01
23	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	15-80	0,75	2,17	1,10	4,46	30	2,31	5,43	2,85	2,24	7,56
24	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	35-60	0,25	1,25	1,12	4,80	20	1,96	5,83	3,06	2,49	7,19
25	MeOH/Asetikasit çöz. (%3,4)	1,45	15-90	0,75	3,75	1,10	3,94	20	1,68	6,07	3,18	2,48	6,97
26	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,45	25-75	0,50	2,50	1,13	3,70	20	1,80	5,95	3,12	2,43	7,10
27	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,45	35-65	0,30	1,00	1,05	4,63	30	1,93	5,80	3,05	2,34	7,17
28	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,45	25-75	0,50	1,25	1,13	3,70	40	2,60	3,15	2,71	2,20	7,75
29	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,45	0-100	1,00	2,86	2,50	29,16	35	4,00	3,98	3,16	2,55	9,09
30	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,20	35-100	0,65	1,86	2,36	27,30	35	4,80	3,18	2,36	2,59	9,89
31	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,20	20-100	0,80	3,48	2,52	19,32	23	4,30	3,88	2,95	2,46	9,43
32	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,20	10-100	0,90	4,09	2,11	17,89	22	4,30	3,68	2,85	2,44	9,42
33	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	10-100	0,90	4,50	2,14	16,45	20	4,32	3,66	2,75	2,42	9,46
34	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	25-100	0,75	3,75	2,15	15,79	20	4,31	3,76	2,85	2,43	9,45
35	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	0-80	0,80	5,33	2,17	10,89	15	4,40	3,57	2,49	2,35	9,60
36	MeOH/Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	0-85	0,85	3,40	2,11	24,58	25	4,29	3,87	3,62	2,56	9,37

Δφ=0,01x(Organik modifiyerin başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki fark)

$T_{g=}$ (Organik modifiyerin başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki fark)/t_g

Çalışmanın bu aşamasında çizelge 6.16' da hesaplanan veriler dikkate alınarak, öncelikle %20-80 gradient aralığı ve 15 dak. analiz süresi için olası gradient adımları lineer ve basamaklı olarak hesaplanmış ve simülasyonu yapılmıştır. Simülasyon adımları şekil 6.27' de verilmiştir.



Şekil 6.27 %20-80 gradient aralığı ve 15 dak. analiz süresi için olası lineer ve basamaklı gradient adımlarının simülasyon sonuçları

Simülasyon çalışmaları için MATLAB R2015b (Academic) yazılım programı kullanılmıştır; MATLAB yazılımında *sim syntax* dizimi kullanılarak, yapılandırma setinin nasıl oluşturulacağı aşağıda gösterilmiştir.

```
model = 'vdp';
load_system(model)
simMode = get_param(model, 'SimulationMode');
set_param(model, 'SimulationMode', 'rapid')
cs = getActiveConfigSet(model);
model_cs = cs.copy;
set_param(model_cs,'AbsTol','1e-5',...
      'SaveState','on','StateSaveName','xoutNew',...
      'SaveOutput','on','OutputSaveName','youtNew')
simOut = sim(model, model_cs);
set_param(model, 'SimulationMode', simMode)
```

Simülasyonu yapılan basamaklı gradient çalışma adımları kullanılarak, MeOH ve MeCN mobil fazlı bir dizi kromatografik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucu elde edilen kromatogramlardan alınan veriler, çizelge 6.18'de gösterilmiştir.

Gradient basamaklarının olası kombinasyonları θ_{top} değerini en iyileyecek değerlerden seçilmiştir. Simülasyonla elde edilen kombinasyonlardan sağlanan verilerle, temel denklemlerin çözümünden elde edilen veriler bir araya getirilmiştir. En iyi lineer gradient aralığı ve en iyi gradient adımının belirlenmesi için MeOH-sulu asetik asit mobil fazında yapılan çalışmalardan elde edilen değerlerin, MeCN organik modifiyerinde kullanılabilir olduğu kabul edilmiştir.

Son adım optimizasyon çalışması simülasyon sonucu elde edilen veriler, çizelge 6.14 ve 6.15'de elde edilen kromatografik çalışma koşulları ile biraraya getirilerek, MeOH'lü mobil faz için dokuz çalışma noktası ve MeCN için on nokta seçilerek yapılmıştır. Optimizasyon çalışması için *Levenberg-Marquardt Algoritması* (LMA) kullanılmıştır. LMA; problemleri doğrusal olmayan en küçük kareler minimizasyonu ile çözer ve gradient iniş ile Gauss-Newton tekrarlamalarının harmanlanması şeklinde bir algoritmadır. MATLAB'da *Levenberg-Marquardt Algoritması,* Yapay Sinir Ağını (Adaptive Neural Network, ANN) kullanır. Burada denetimsiz öğrenme (unsupervised learning) kullanılmaktadır. Çıkış değerlerinin (cevap değerleri) girilmesine gerek olmayan, öğrenme süresince sadece örnek giriş değerleri verilen algoritmada, örnekler arasındaki ilişkiler ile sistemin kendi kendisine öğrenmesi sağlanmaktadır. Bu çalışmada çıkış değerleri vermek yerine, verilen giriş değerlerine göre çıkışı değerlendirerek öğrenme sağlanmıştır (Haykin 1999).

Çizelge 6.18 MeCN ve MeOH mobil fazlı, basamaklı gradient yöntem optimizasyonu için kromatogramlardan elde edilen ve hesaplanan veriler

											Polifenollerin alıkonma zamanları (t_R)					
	Kromatog-rafik metod koşulları	Akış hızı Fml/dk	Organik modifiyer aralığı	Gradient çalışma basamakları (organik modifiyer % sine göre verilmiştir)	$\Delta\varphi$*	T_g*	t_0	t_f	t_g	θ_{top}	Hid-roksi tirozol	Tirozol	Luteolin-7-glikozit	Apigenin -7-glikozit	Oleuropein	Luteolin
1	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,20	0-100	0-2dak; %0-20 2-10 dak; %20-30 10-25 dak; %30-55 25-35 dak; %55-100	0,20+ 0,10+ 0,25+ 0,45+ 1,00 top	10+ 1,25+ 1,67+ 4,5+ 2,86 top	2,50	29,16	35	4,00	5,84	8,42	14,90	-	23,48	29,16
2	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,20	0-100	0-7,5dak; %0-25 7,5-15dak; %25-35 15-35 dak; %35-65 35-40 dak; %65-100	0,25+ 0,10+ 0,30+ 0,35+ 1,00 top	3,33+ 1,33+ 1,50+ 2,33+ 2,50 top	2,36	27,30	40	4,80	7,30	10,52	21,78	23,14	23,71	27,30
3	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,20	0-100	0-10dak; %0-40 10-12 dak; %40-45 12-22 dak; %45-100 22-23 dak; %100-100 23-30 dak; %100-75	0,40+ 0,05+ 0,55+ 0,00+ - 1,00 top	4,00+ 2,50+ 5,50+ 0+ - 4,35 top	2,52	19,32	23	4,03	6,55	9,63	16,05	16,77	17,08	19,32
4	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	0-90	0-10dak; %0-35 10-12 dak; %35-50 12-22 dak; %50-90 22-25 dak; %90-50 25-30 dak; %50-75	0,35+ 0,15+ 0,40+ - - 0,90 top	3,50+ 7,50+ 4,00+ - - 4,09 top	2,11	17,89	22	4,03	5,90	8,80	14,91	15,47	15,79	17,89
5	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	0-100	0-10 dak; %0-50 10-20 dak; %50-100 20-25 dak; %100-75	0,50+ 0,50+ - 1,00 top	5,00+ 5,00+ - 5,00 top	2,15	15,79	20	4,32	5,54	7,87	12,50	13,18	13,51	15,79
6	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	20-100	0-5dak; %20-50 5-15 dak; %50-0 15-20 dak; %0-80	0,30+ 0,50+ - 0,80 top	6,00+ 5,00+ - 5,33 top	2,17	10,89	15	4,40	3,86	5,09	7,86	8,42	8,77	10,89

Çizelge 6.18 MeCN ve MeOH mobil fazlı, basamaklı gradient yöntem optimizasyonu için kromatogramlardan elde edilen ve hesaplanan veriler (devam)

7	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	15-100	0-5dak; %15-20 5-10 dak; %20-25 10-15 dak; %25-35 15-20 dak; %35-50 20-25 dak; %50-100 25-30 dak; %100-0	0,05+ 0,05+ 0,10+ 0,15+ 0,50+ - 0,85 top	1,00+ 0,50+ 2,00+ 7,50+ 25,0+ - 3,40 top	2,11	24,58	25	3,92	4,13	6,50	19,29	-	21,44	24,58
8	MeOH/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	15-100	0-5dak; %15-20 5-7,5dak; %20-25 7,5-10 dak; %25-45 10-15 dak; %45-60 15-20 dak; %60-80 20-25 dak; %80-100 25-30 dak; %100-15	0,05+ 0,05+ 0,20+ 0,15+ 0,20+ 0,20+ - 0,85 top	1,00+ 2,50+ 8,00+ 3,00+ 4,00+ 4,00+ - 3,40 top	2,14	17,76	25	4,60	4,19	6,53	13,65	14,53	14,85	17,76
9	MeCN/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	20-100	0-5 dak; %20-50 5-15 dak; %50-0 15-20 dak; %0-80	0,30+ 0,50+ - 0,80 top	6,00+ 5,00+ - 5,33 top	1,90	6,80	15	4,80	2,97	3,69	4,46	5,67	5,14	6,80
10	MeCN/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	15-100	0-5dak; %15-20 5-10 dak; %20-25 10-15 dak; %25-35 15-20 dak; %35-50 20-25 dak; %50-100 25-30 dak; %100-0	0,05+ 0,05+ 0,10+ 0,15+ 0,50+ - 0,85 top	1,00+ 0,50+ 2,00+ 7,50+ 25,0+ - 3,40 top	1,81	16,38	25	4,98	2,96	3,87	7,00	11,71	10,24	16,38
11	MeCN/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	0-100	0-5dak; %15-20 5-7,5dak; %20-25 7,5-10 dak; %25-45 10-15 dak; %45-60 15-20 dak; %60-80 20-25 dak; %80-100 25-30 dak; %100-15	0,05+ 0,05+ 0,20+ 0,15+ 0,20+ 0,20+ - 0,85 top	1,00+ 2,50+ 8,00+ 3,00+ 4,00+ 4,00+ - 3,40 top	1,90	17,54	25	4,92	3,17	6,61	11,92	14,57	13,75	17,54

Çizelge 6.18 MeCN ve MeOH mobil fazlı, basamaklı gradient yöntem optimizasyonu için kromatogramlardan elde edilen ve hesaplanan veriler (devam)

12	MeCN/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	0-100	0-2,5dak; % 0-0 2,5-5,0dak; %0-10 5,0-7,5dak; %10-20 7,5-10 dak; %20-25 10-15 dak; %25-35 15-20 dak; %35-50 20-25 dak; %50-100 25-30 dak; %100-15	0,00 0,10+ 0,10+ 0,05+ 0,10+ 0,15+ 0,50+ - 1,00 top	0,00 4,00+ 4,00+ 2,00+ 4,00+ 3,00+ 10,0+ - 4,00 top	1,95	17,29	25	4,98	2,87	6,97	11,68	14,13	13,29	17,29
13	MeCN/ Asetikasit çöz. (%4,8)	1,40	0-100	0-15 dak; % 0-15 15-30 dak; %15-30 30-45 dak; %30-50 45-60 dak; %50-100 60-80 dak; %100-50	0,15+ 0,15+ 0,20+ 0,50+ - 1,00 top	1,00+ 1,00+ 1,33+ 3,33+ - 16,67to	1,12	31,71	60	1,12	2,98	2,36	20,60	24,54	26,25	31,71

Δφ=0,01x(Organik modifiyerin başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki fark)
Tg= (Organik modifiyerin başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki fark)/tg
1.hidroksitirozol 2. tirozol 3.luteolin-7-glikozit 4. apigenin-7-glikozit 5.oleuropein 6.luteolin

MATLAB, *Levenberg-Marquardt* Algoritması kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasında kullanılacak olan ondokuz adet giriş verisine ait değerler, çizelge 6.19'da verilmiştir.

Çizelge 6.19 *Levenberg- Marquardt* Algoritması optimizasyonu çalışmasında kullanılan veriler

	Veri Adı	**$\Delta\varphi_{LM}$**	**t_G**
1	VarName2	0.06	15
2	VarName3	0.3	40
3	VarName4	0.7	40
4	VarName5	0.5	30
5	VarName6	0.7	30
6	VarName7	0.3	20
7	VarName8	0.7	20
8	VarName9	0.5	20
9	VarName10	0.3	30
10	**VarName11**	**0.5**	**40**
11	VarName12	0.35	40
12	VarName13	0.75	40
13	VarName14	0.55	30
14	VarName15	0.65	30
15	VarName16	0.25	20
16	VarName17	0.75	20
17	VarName18	0.45	20
18	VarName19	0.35	30
19	VarName20	0.2	40

MATLAB'da *Levenberg-Marquardt* Algoritması kullanılarak, yapılandırma setinin ve syntax komutlarının nasıl oluşturulacağı aşağıda verilmiştir.

trainlm
Levenberg-Marquardt geri yayılımı
Syntax
net.trainFcn = 'trainlm'
[net,tr] = train(net,...)
Description
Trainlm; Levenberg-Marquardt optimizasyonuna göre ağırlık ve sapma değerlerini güncelleyen bir ağ eğitim işlevi
net.trainFcn = 'trainlm' sets the network trainFcn property.
[net,tr] = train(net,...) trains the network with trainlm.

Eğitim, aşağıda verilen ***trainlm*** eğitim parametrelerine göre yapılmıştır.

net.trainParam.epochs	1000	Maximum number of epochs to train
net.trainParam.goal	0	Performance goal
net.trainParam.max_fail	6	Maximum validation failures
net.trainParam.min_grad	1e-7	Minimum performance gradient
net.trainParam.mu	0.001	Initial mu
net.trainParam.mu_dec	0.1	mu decrease factor
net.trainParam.mu_inc	10	mu increase factor
net.trainParam.mu_max	1e10	Maximum mu
net.trainParam.show	25	Epochs between displays (NaN for no displays)
net.trainParam.showCommandLine	false	Generate command-line output
net.trainParam.showWindow	true	Show training GUI
net.trainParam.time	inf	Maximum time to train in seconds

trainlm ; newcf,newdtdnn, newff, ve newnarx dahil olmak üzere birçok ağ oluşturma işlevleri için ön tanımlı eğitim işlevidir.

Chromatography
Here a neural network is trained to predict median gradient chr..
[x,t] = gradient_dataset;
*net = feedforwardnet(**19**,'trainlm');*
net = train(net,x,t);
y = net(x)

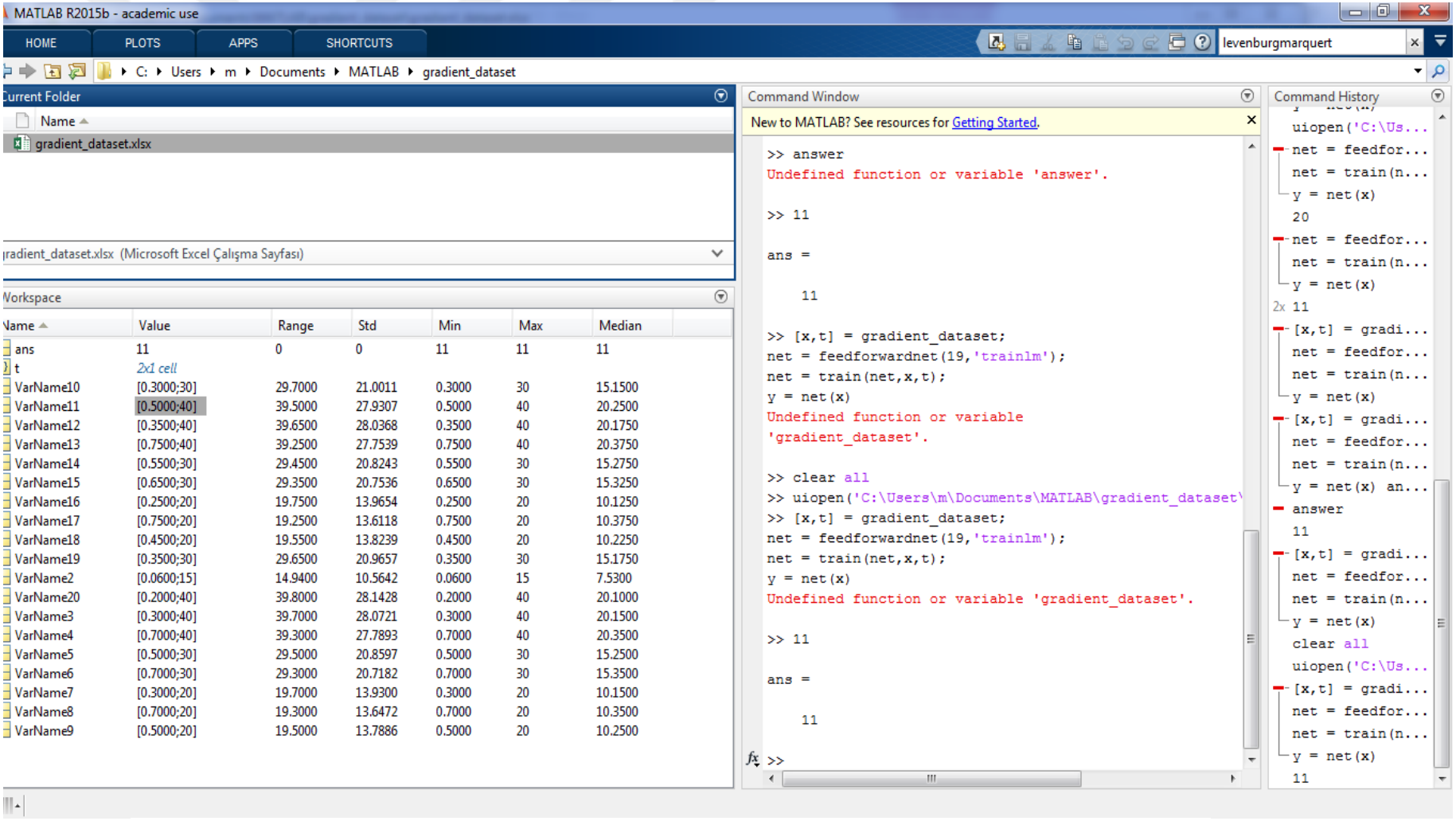
Optimizasyon sonuçları çizelge 6.20'de verilmiştir. En optimum nokta; Δφ değeri 0,5, gradient çalışma süresi 40 dk olan, 'VarName11' olarak adlandırılmış veridir. Bu noktanın kromatografik çalışma koşulları aşağıda tanımlanmıştır.

'VarName11' verisine ait gradient elüsyon program koşulları:

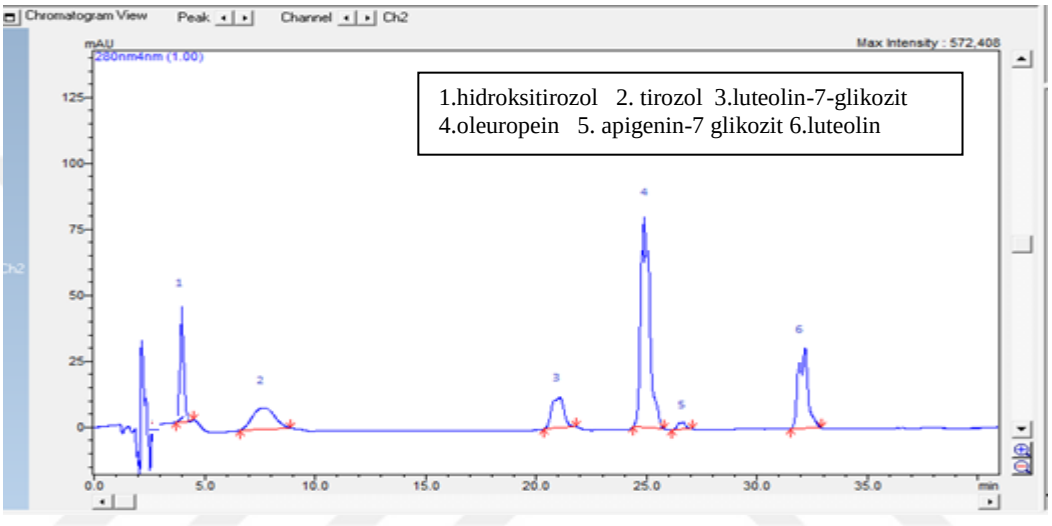
Mobil faz A: %4,8 Asetik Asit çözeltisi Akış hızı: 1,4mL/dk
Δφ= 0,5 Organik Modifiyer: MeCN

0-15dk. % 100 A- %85A
15-30dk % 85 A- %70A
30-40dk % 70 A- %50A

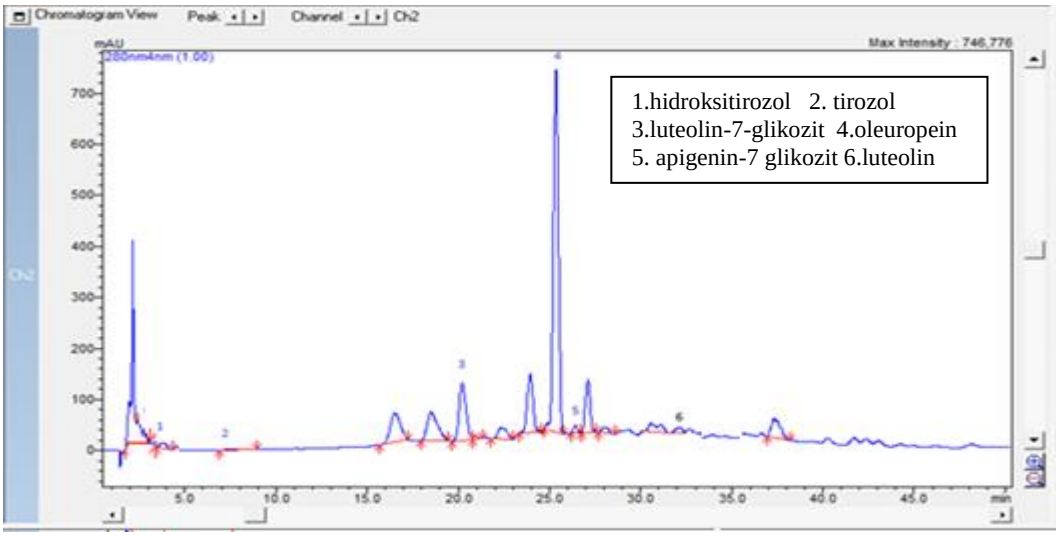
Çizelge 6.20 Gradient yöntemin *Levenberg- Marquardt* Algoritması ile optimizasyon sonuçları



VarName11' verisine ait gradient elüsyon kromatografik koşullarda çalışılan standart karışımın ve Farmakope 5.0 yönteminde belirlenmiş MeOH'lü zeytin yaprağı ekstraktının kromatogramları, kromatogram 6.4 ve 6.5'de verilmiştir. **Avrupa Farmakope 5.0'da verilen yöntem; standart ekstraksiyon yöntemi** olarak kullanılmış ve bu yönteme göre **MeOH'lü ekstraktlar; 1,00g zeytin yaprağı, 50mL MeOH ile 60ºC'de, 30dk** süresince su banyosunda karıştırılarak ekstrakte edilmiştir. Süzülen MeOH'lü ekstrakt, saf su ile 1/10 oranında seyreltilmiştir.

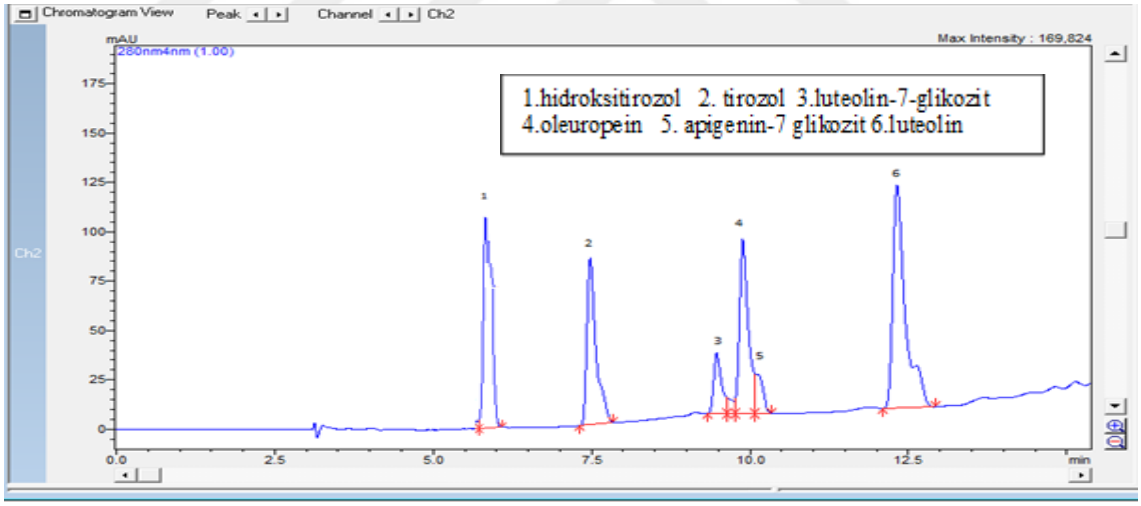


Kromatogram 6.4 Gradient yöntem optimizasyonu, optimum noktada standart polifenol karışım kromatogramı

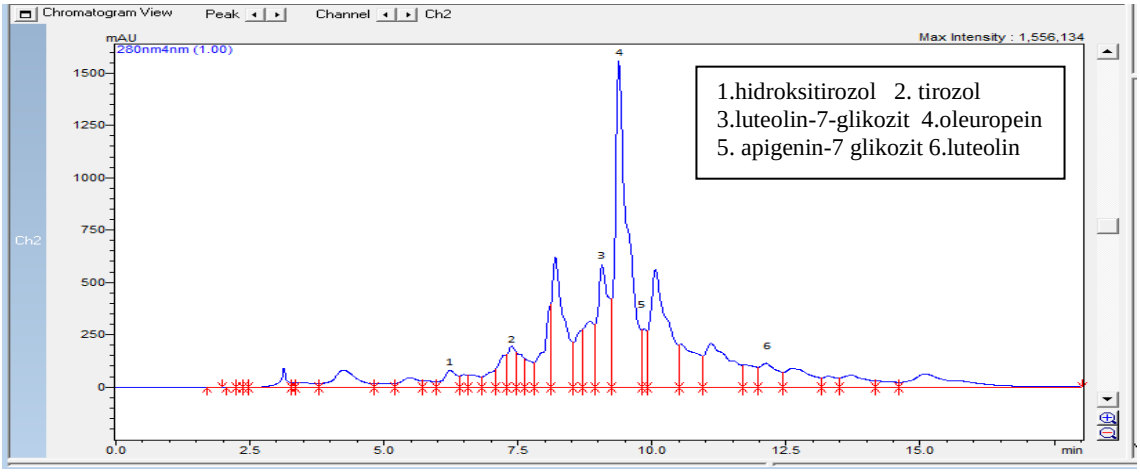


Kromatogram 6.5 Gradient yöntem optimizasyonu, MeOH/H_2O çözücülü bitki ekstrakt kromatogramı

Gradient elüsyon yöntem geliştirme basamaklarının son aşamasında, zeytin yaprakları ekstraktlarında mevcut sekoiridoid, flavanoid ve basit fenoliklerden oluşan polifenollerden, hidroksitirozol, tirozol, luteolin-7-glikozit, apigenin-7-glikozit, oleuropein ve luteolinin kromatografik ayırımı gerçekleştirilmiştir. Ön temizleme ve ekstraksiyon işlemi uygulanmaksızın kullanılan bitki ekstraktları, oldukça karmaşık bir matrikse sahiptir. Bu matriks etki gözönüne alındığında kemometrik yaklaşımla geliştirilen analiz yöntemi, sözkonusu karışımın kromatografik ayırımı için uygundur. Aynı zamanda kromatografik koşulların belirlenmesinde kullanılan doğrusal çözücü gücü (LSSM) ve alıkonma zamanı modelleri ile NCRF yaklaşımının, bitki ekstraktlarından polifenolik maddelerin kromatografik ayırımında kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Tez kapsamında önerilen analiz yöntemi, Avrupa Farmakope5.0, zeytin yaprağının MeOH'lü ekstraktlarından oleuropeinin kromatografik analizi yöntemine alternatif olarak geliştirilmiştir. Farmokopi analiz yöntemi kullanılarak elde edilen standart karışıma ve zeytin yaprağı bitki ekstratına ait kromatogramlar, kromatogram 6.6 ve 6.7'de verilmiştir.



Kromatogram 6.6 Avrupa Farmakope 5.0 analiz yöntemi, standart polifenolik karışım kromatogramı



Kromatogram 6.7 Avrupa Farmakope 5.0 analiz yöntemi, MeOH/H_2O çözücülü bitki ekstrakt kromatogramı

Kromatografik koşullar ve cevap değişkenleri açısından, Avrupa Farmakope 5.0 zeytin yaprağı MeOH/H_2O çözücülü ekstraktlardan oleuropeinin kromatografik analiz yöntemi ve alternatif olarak geliştirilen analiz yöntemi arasında yapılan karşılaştırmalar, çizelge 6.21'de gösterilmiştir. θ_{top} ve bu değere bağlı olarak hesaplanan NCRF kromatografik fonksiyon değeri, Avrupa Farmakope 5.0 ve alternatif geliştirilen yöntem açısından karşılaştırıldığında, alternatif yönteme ait olan verilerin aralık içinde ve maksimum değerde olduğu belirlenmiştir.

Her iki yöntem için; polifenolik maddelerin ayırımı sonrası elde edilen kromatogramdan belirlenen alıkonma zamanları, çizelge 6.22' de verilmiştir.

Avrupa Farmakope 5.0 yöntemi standart alınarak hazırlanan MeOH' lü zeytin yaprağı ekstraktında, oleuropein miktarın geliştirdiğimiz gradient analiz yöntemi ve Avrupa Farmakope 5.0 analiz yöntemi kullanılarak belirlenen sonuçları çizelge 6.23'de verilmiştir.

Çizelge 6.21 Avrupa Farmokope 5.0 ve geliştirilen alternatif yönteme ait kromatografik tanımlama ve cevap fonksiyonu değerleri

Yöntem	Kromatografik metod koşulları	Akış hızı Fml/dak	Organik modifiyer aralığı	Gradient çalışma basamakları (organik modifiyer % sine göre verilmiştir)	Δφ*	T_g*	t_0	t_f	t_g	θ_{top}	NCRF
Avrupa Farmakope 5.0 yöntemi	MeOH/Asetik asitçöz. (%1,0)	1,00	15-80	0-5dk; %15-60 5-12 dk; %60-80 12-15 dk; %80-15	0,45+ 0,20+ 0,65+ 1,00 top	9+ 2,86+ 21,67+ 33,53 top	3,5	12,50	15	2,80	3,15
Geliştirilen alternatif yöntem	MeCN/Asetik asitçöz. (%4,8)	1,40	0-100	0-15dk; %0-15 15-30dk; %15-30 30-40 dk; %30-50	0,15+ 0,15+ 0,20+ 0,50 top	1,00+ 1,00+ 2,00+ 4,00 top	2,08	31,71	40	4,80	5,85

Çizelge 6.22 Avrupa Farmokope 5.0 ve geliştirilen alternatif yöntem ile ayrılan polifenolik maddelerin alıkonma zamanları

Yöntem	Hidroksitirozol	Tirozol	Luteolin-7-glikozit	Oleuropein	Apigenin-7-glikozit	Luteolin
Avrupa Farmakope 5.0	6,23	7,52	9,27	10,00	10,30	12,50
Geliştirilen alternatif yöntem	4,10	7,50	21,01	24,54	26,25	31,71

Çizelge 6.23 Standart ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında iki analiz yöntemi için cevap değişkeni sonuçları

	OLE(HPLC) mg/1,0 g yaprak
Avrupa Farmakope 5.0 yöntemi	7,22± 0,65
Geliştirilen alternatif yöntem	9,96± 0,78

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

ARAŞTIRMA BULGULARI I İÇİN SONUÇLAR

- Sekoiridoitlerin önemli bir polifenolik grup olduğu ve kemitaksonomik değerlendirmeye dahil edilmesi gerektiği son yıllarda üzerinde durulan bir konudur. *Olea europaea* türünde mevcut en önemli grup olan sekoiridoitleri oluşturan oleuropeositlerin, teşhisi ve tayini kemotaksonomik sınıflandırma açısından önemlidir. Çalışmamızın bu konuda ki çalışmalara destek olacağını ümit ediyoruz.
- Oleuropein bakımından zengin olan zeytin yaprağından polifenollerin ekstraksiyonu için çok az yöntem ya da tam olarak geliştirilmemiş yöntemler bulunmaktadır. Yapraklardan polifenollerin kazanımı için MeOH-EtOH/H_2O karışımları veya hekzan gibi çözücülerin kullanıldığı çözücü ekstraksiyonu veya Soxhlet ekstraksiyonu gibi yöntemlerin yanı sıra süper-ısıtılmış sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga veya ses ötesi dalga ekstraksiyon yöntemleri kullanılabilir. Bu yöntemlerin ekstraksiyon süresi, yaprak miktarı ve çözücü hacmi gibi veya metodolojiden kaynaklanan parametreler açısından farklılıkları bulunmaktadır. Bu doğrultuda, ekstraksiyon yöntemlerinin sanayiye uygulanabilirliği açısından, uygun olup olmadıklarının belirlenmesi önemlidir. Bu kapsamda, çalışmamızın sanayide uygulanabilen yöntem çalışmalarına ve sanayinin bu konuda ki sorunlarına ışık tutabileceğini düşünüyoruz.
- Bitki örneklerinden numune hazırlamak ve uygun bir ekstraksiyon metodu seçmek oldukça zordur. Çünkü, birden fazla yöntemin bir arada kullanılması gerekir. Tez çalışması kapsamında, kompleks matrisin zorluğuna rağmen ön işlemsiz, basit, hızlı, ekonomik, toksisitesi düşük çözücü ve/veya çözücü karışımlarının kullanıldığı çözücü ekstraksiyon yöntemleri ile birlikte, yeni tekniklerden ses ötesi dalga etkili ultrasonik prob ekstraksiyonu yöntemi geliştirilmiştir. Her iki ekstraksiyon yönteminde MeOH/H_2O ve EtOH/H_2O çözücü karışımları için, cevap yüzey yöntemleri kullanılarak deneysel tasarım ve varyans analizi yapılmış, desirability ve pareto algoritmalarından yararlanılarak çeşitli bağımsız değişkenlere karşı çok amaçlı optimizasyon uygulanmıştır.
- Çalışma kapsamında yeni geliştirilen çözücü ekstraksiyonu ve ses ötesi dalga ekstraksiyonuna dayalı yöntemlerin optimizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar toplu olarak aşağıda verilmiştir.

		Cevap Değişkeni			
Çözücü ve Opt. Tipi	Optimum Koşullar	T. Fenol (GAE) mg/1,0 g yaprak	T.Fenol (OLE) mg/1,0 g yaprak	OLE (HPLC) mg/1,0 g yaprak	T.Antioks. Aktivite % İnhibisyon
MeOH/ H_2O	%61,75(v/v)MeOH, 58,3 ºC, 71,25dk., 12,8 Ç/K oranı (CCD tasarım)	25,03± 2,02	12,08± 1,01	5,22± 0,65	%94,09± 0.86
MeOH/ H_2O Ultrasonik banyo	%61,75(v/v)MeOH, 58,3 ºC, 71,25dk., 12,8 Ç/K oran, 50 Hz sabit frekans	26,8± 1,96	13,5± 1,56	5,9± 0,83	%96,06± 0.75
MeOH/ H_2O çözücülü Ultrasonik Prob eks.	%51,32(v/v)MeOH, %87,85 genlik, 14,38dk. SÖD uyg. süresi, 3,89cm prob pozisyonu, %0,97 görev döngüsü, 12,78 Ç/K oranı,30 ºC, (D-optimal tasarım)	15,32± 1,52	7,100± 0,650	5,185± 0,450	
MeOH-/ H_2O çözücülü Ultrasonik Prob eks.	%63,84(v/v) MeOH,%46,15 genlik, 5,91 dk. SÖD uyg. süresi 2,54 prob pozisyonu, %0,84 görev döngüsü ve 12,78 Ç/K oranı, 30ºC (D-optimal tasarım)				%85,94± 0,03
EtOH/ H_2O ekst.	%62,50(v/v)EtOH, 58,5 ºC, 71,25dk., 28 Ç/K oranı (CCD Tasarım)	26,85± 1,01	17,85± 0,72	17,53± 0,71	%95,93± 5,28
EtOH/H_2O Ultrasonik banyo	%62,50(v/v)EtOH, 58,5 °C, 71,25dk., 28 Ç/K oranı , 50 Hz sabit frekans	22,26± 1,78	15,60± 1,15	15,60± 0,82	%91,71± 3,28
EtOH/ H_2O çözücülü Ultrasonik Prob eks.	% 80(v/v) EtOH %89 genlik, 15 dk, SÖD uyg. süresi, , 1,5 cm prob pozisyonu, %1 görev döngüsü ve 28 Ç/K oranı, 30ºC (D-optimal tasarım)	16,82± 1,63	7,31± 0,61	2,93± 0,30	
EtOH/ H_2O çözücülü Ultrasonik Prob eks.	%50,56(v/v)EtOH,%36,24 genlik, 8,6 dk. SÖD uyg. süresi, 2,91cm prob pozisyonu, %0,93 görev döngüsü ve 28 Ç/K oranı, 30ºC (D-optimal tasarım)				%95,57± 7,89
Avrupa Farmakope 5.0 eks. yöntemi	%100(v/v)MeOH, 60 ºC, 30dk., 50 Ç/K oranı	17,85± 1,04	11,10± 0,65	7,22± 0,65	%80,32± 0,11

- Zeytin yaprağından sekoiridoid, flavanoid ve basit fenolik maddelerin ekstraksiyonunda, toplam fenol (GAE ve OLE), oleuropein miktarı ve toplam antioksidan aktivite bağımlı değişkenlerine göre yapılan optimizasyon sonuçlarında en yüksek değerler EtOH/H_2O optimizasyonunda elde edilmiştir. EtOH/H_2O çözücü sisteminin zeytin yaprağının polifenoliklerinin ekstraksiyonu için iyi bir çözücü sistemi olduğu söylenebilir. Ultrasonik prob ekstraksiyonu sonuçları dikkate alındığında, tüm bağımlı değişkenlerde belirgin ölçüde düşüş sözkonusudur. Sadece

EtOH/H_2O çözücü ekstraksiyonunda toplam antioksidan aktivite miktarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ultrasonik prob ile ses ötesi dalga ekstraksiyonunun, zeytin yaprağından polifenollerin ekstraksiyonu için uygun bir yöntem olmadığı söylenebilir. Ancak ultrasonik banyo ile verilen ses ötesi dalga etkisi, ekstraksiyonu geliştiren sonuçlar vermiştir.

- Literatürde MeOH'ün, fenoloksidaz gibi enzimleri inhibe ederek bitkisel kaynaklı polifenolik bileşiklerin yükseltgenmesini önlediği düşünülmektedir (Proestos vd. 2006). Bu çalışmada, MeOH'ün ses ötesi dalga etkisinde, oleuropein cevap değişkeni için koruyucu etkisinden bahsedilebilir.
- Zeytin yaprağından sekoiridoidlerin ekstraksiyonunda, cevap yüzey yöntemi (CCD tasarım) dört faktörün üç amaç fonksiyonu üzerindeki etkilerini, D-optimal tasarım beş faktörün, üç amaç fonksiyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmış ve zeytin yaprağı ekstraktlarında kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.
- Zeytin yaprağı ekstraktları glikozit yapıda fenolikler bileşikler içermesine rağmen, optimize ettiğimiz ekstraksiyon yöntemlerinde birçok çalışmada uygulanan stabilizasyon ön işlemi gerçekleştirilmemiştir. Aynı zamanda yapraklardan polifenollerin ekstraksiyonu öncesi, asidik veya bazik hidroliz uygulanmamış, böylelikle oleuropeinin, hidroksitirozol ve elenolik asite dönüşümü engellenmiştir. Bu bakımdan geliştirmeye çalıştığımız yöntemlerin bir avantaj oluşturabileceğini düşünmekteyiz.
- Literatürde oleuropein miktarı; %9,04-14,32 (Savournin vd. 2001), %1,44-5,20 (Altınyay ve Altun, 2006), 22,6 g/kg yaprak (Japan-Lujan vd. 2006a), 102,11±0,02 mg/100g yaprak (Lee vd. 2009), %80 EtOH, 60 ^oC koşullarında 6,84 mg/kg (Yateem vd. 2014) ve 858,29 µg/g (Sifaoni vd. (2015) değişen değerlerinde verilmiştir. Makris vd. (2007) çalışmasında, 2058±92mg GAE/100g kuru yaprak, Bilek S.E., (2010) çalışmasında, %43 EtOH(v/v), 50^oC, 15 saat, K/Ç oranı 7 optimum koşullarında *Memecik cv.* türü zeytin yaprağında toplam fenolik miktarını (GAE), 4586,3mg GAE/100g kuru yaprak olarak belirlemiştir. Talhoui vd. (2014) çalışmasında %80 MeOH çözeltisi ile, 10 dk ultrasonik banyoda ses ötesi dalga etki verildiğinde zeytin yaprağında toplam fenolik madde miktarını, 52,12-60,64 mg GAE/kg yaprak bulmuştur. Literatürde verilen bu sonuçlar, çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur.

ARAŞTIRMA BULGULARI II İÇİN SONUÇLAR

- Kromatografik yöntem geliştirme; optimizasyon metodolojisini ve son yıllarda kromatografik kalite değerlendirmesine esas olan kromatografik cevap fonksiyonları (CRF'ler) kullanımını gerektirmektedir. Bu amaçla kullandığımız NCRF faktörü yaklaşımı, polifenolik maddelerin ayırımında ilk defa bu çalışma kapsamında kullanılmıştır.
- Karmaşık bir matrikse sahip zeytin yaprağı ekstraktı gibi bitki örneklerinin polifenolik maddelerinin kromatografik yöntem ile ayırımı, ters faz sıvı kromatografinin en zor çalışma alanlarındandır. Yöntemin pratik avantajlarını ve çalışma prosedürlerini göstermek için, örnek olay ve veri seti olarak sekoiridoid, flavanoid ve basit polifenolik yapılardan hidroksitirozol, tirozol, luteolin-7-glikozit,oleuropein, apigenin-7-glikozit ve luteolin kullanılmıştır.
- Tez kapsamında, ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi gradient ayırımı için yapılan yöntem geliştirme çalışmalarının RSM ve Levenberg-Marquardt algoritması kullanarak çok amaçlı optimizasyona dayanan, ilk geliştirilen optimizasyon modeli çalışması olduğunu düşünmekteyiz.
- Zeytin yaprağındaki doğal organik maddelerin, dağılımının belirlenmesi için düzenlenen optimal kromatografik ayrım hedefleri, *yeni bir kromatografik cevap fonksiyonu (NCRF)* ile sunulmuştur. Kullanılan NCRF'nin, asimetrik ve üst üste binmiş pikler ile bilinmeyen çözeltilerin karışımlarına uygulanabilir olduğu, ters faz kromatografide dağılma metodolojisine uygun olarak işlevsel olduğu, literatürde bu tez çalışması kapsamında ilk kez gösterilmiş olacaktır.
- Bu tez çalışması kapsamında ilk kez, çözücü gücü modeli, alıkonma zamanının ve gradient adımlarının belirlenmesinde *yeni kromatografik cevap fonksiyonu (NCRF)* ile birlikte kullanılmıştır.
- Literatürde *doğrusal çözücü gücü modeli (LSSM)*'nin dar bir organik modifiyer aralığında kullanılabilir olduğu vurgulanırken, çalışmamızda geniş bir organik modifiyer aralığında kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Model, gradient elüsyon koşullarının band profillerinin deneysel ve simüle edilmiş verilerinde, doğrusal ve doğrusal olmayan koşullarda uygulanmıştır.

- NCRF fonksiyonunun, ayırma ve zaman terimi tahmini kavramları ile kromatogramdaki önemli zorluklardan üst üste gelmiş veya asimetrik pik görünümleri, çok uzun analiz süresi gibi durumların herbirinin ağırlıklı etkisini ve önemini yansıtmakta olduğu ve aynı zamanda dağılma (partitisyon) kromatografisi için geliştirilen *doğrusal çözücü gücü modeli (LSSM)* ve *alıkonma modeli* kavramları ile birlikte kullanılarak, bağımlı cevap değişkeni olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir.
- Bu çalışmada, optimizasyon prosesinin temel adımları ve farklı algoritmalar için yeni başlatma modlarını içeren, yeni araçlar (t_R, $\Delta\varphi$ ve θ) sunulmuştur.
- LSSM modelde; k'ya karşı t, pH, T ifadeleri için cebirsel sigmoid fonksiyonuna dayalı çözümler gerekmektedir (Nikitas ve Pappa-Louisi, 2009a; Fasoula vd. 2015). Ancak bu modelin temel zayıflığı alıkonma zamanını veren ifadelerin oldukça karmaşık olmasıdır. Alıkonma zamanı, programlanmış zaman gradient ile belirlenen durumlarda, basit doğrusal modeller kullanılarak bu zayıflığın üstesinden gelinmektedir. Bu çalışma kapsamında LSSM modeli doğrusallaştırılmış olup k ifadesini veren denklemler, t ve $\Delta\varphi$ değerlerine göre tanımlanarak oluşturulmuştur. Bu çalışma ile birden fazla gradient adımı tanımlanmasına rağmen, modelin olumsuzluklardan etkilenmediği görülmüştür.
- Bu çalışma ile çok amaçlı optimizasyonu için kullandığımız yeni güçlü kemometrik araçlarla, kromatografi laboratuvarı donanımının ve yazılımının geliştirilebileceği gösterilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızın bu anlamda kromatografik yazılımların geliştirilmesine ışık tutacağına inanmaktayız.
- Yaprak örneklerinden, sekoiridoid yapıların diğer basit fenolikler ve flavanoidlerden ayrılması için, temel sekoiridoid bileşik olan oleuropeinin analizine yönelik, Avrupa Farmokopisinde mevcut yönteme alternatif olacak, yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Yeni geliştirilen yöntem, araştırmacının tecrübesine dayanan ve deneme yanılma şeklinde pek çok analiz denemesini gerektiren klasik kromatografik yöntem geliştirme metodlarından farklı olarak, bilgisayar destekli, farklı matematiksel algoritmaların kullanıldığı yeni bir çalışma konusudur. Son yıllarda gelişen, kimyanın bilgisayar ile desteklenmesinin önemli olduğunu düşünen araştırmacılar için, gelişmelere açık kemometrik çalışmalar içinde, kromatografik yöntem

geliştirmeye dayalı çalışmalar oldukça azdır. Çalışmamızın bu anlamda yeni bir çalışma olduğunu ve literatüre büyük ölçüde katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

ÖNERİLER

- Çalışmamız kapsamında bitki materyalinden polifenollerin ekstraksiyonunda, çok amaçlı cevap fonksiyonlarına dayalı çalışmalar için deterministik optimizasyon çözümleri üretilmiştir. Bu çalışmaların stokastik metodolojiler dikkate alınarak, ileri algoritmalardan parçacık sürü analizi, sıralama (sorting), arama (searching), yapay sinir ağları, karınca koloni, genetik, ısıl işlem, tavlama benzetim, tabu arama algoritmaları kullanarak ya da bulanık mantık yapay sinir ağları(ANFIS) gibi güçlü algoritmalarla uygulanabilirliğinin denenmesi, bundan sonraki çalışmalar için önerilebilir.
- Zeytin yaprağı gibi güçlü antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antihipertansif, antiflamatuar, antihipoglisemik vb. özellik gösteren değerli bir kaynağın, sanayide katma değeri yüksek bir ürüne dönüştürülmesi önemli bir konudur. Bu amaçla çalışmamızın temel bir zemin oluşturduğunu ve ses ötesi prob ekstraksiyonu gibi yeni bir tekniğin kullanılabilirliğini göstermesi açısından önemini vurgulamakla beraber, farklı ileri ekstraksiyon teknikleri kullanılarak daha fazla geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.
- Kromatografi metodolojisinde temel gelişmeler kolon karakteristiklerinin iyileştirilmesi yönündedir. Bununla beraber ayırma parametrelerinin geliştirilmesi ve yazılımsal gelişmeler, son yıllarda geliştirilmesine önem verilmiş, yeni çalışma konularıdır. Tez kapsamında zeytin yaprağından diğer polifenollerin varlığında sekoiridoidlerin ayrılması ve analizine dayalı çalışmamız kemometrik metodoloji ile gradient ters faz yöntem geliştirme adımlarına örnek teşkil etmekte ve kromatografik yazılımın geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu aşamadan sonra bu çalışmalar farklı algoritmalarla desteklenebilir ve kromatografik cihazlar için hazır yazılım haline getirilebilir. Bu tür yazılımların geliştirilebilmesi için, benzer çalışmaların farklı organik molekül gruplarıyla tekrarlanması ve veri grupları oluşturulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H. and Zarrouk, M. 2015. Olive tree (*Olea europeae L.*) leaves:importance and advances in the analysis of phenolic compounds. Antioxidants (Basel), 4(4); 682-698.

Adıgüzel, C. 2009. Etodolak'ın Stabilite Göstergeli Sıvı Kromatografisi ile İlaç Dozaj Şekillerinden Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara

Agalias, A., Melliou, E., Magiatis, P., Mitaku, S., Gikas, E., and Tsarbopoulos, A. 2005. Quantitation of oleuropein and related metabolites in decoctions of *Olea europaea* leaves from ten Greek cultivated varieties by HPLC with diode array detection (HPLC-DAD). Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 28, 1557-1571.

Al-Azzawie, H. and, Alhamdani, M. S. 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. Life Sciences, 78(12); 1371-1377.

Al-Bakain, R., Rivals, I., Sassiat, P., Thiebaut, D., Hennion, M. C., Euvrard, G. and Vial, J. 2011. Comparison of different statistical approaches to evaluate the orthogonality of chromatographic separations: application to reverse phase systems. J Chromatogr A, 1218(20); 2963-2975.

Altınyay, Ç. and Altun, M.L. 2006. HPLC analysis of oleuropein in *Olea europaea L.* Ankara Ecz.Fak. Dergisi, 35(1); 1-11.

Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O. and Ülkü, S. 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea L.*) by adsorption on silk fibroin. Sep. Purif. Technol., 62, 342–348.

Al-Qarawi, A.A., Al-Damegh ,M. A. and Elmoug,y S. A. 2002. Effect of freze dried extract of *Olea europaea* on the pituitary-thyroid axis in rats. Phytotherapy Research, 16, 286-287.

Andrikopoulos, N. K., Antonopoulou, S. and Kaliora A. C. 2002. Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 35, 479-484.

Anonim. 2013. 2012 Yılı Zeytin ve Zeytinyağı Raporu. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Koop.Genel Müdürlüğü (GTB), Ankara, 23 s.

Anonim. 2015. Doğu Akdeniz Kalkınma Ajansı (DOĞAKA), TR63 Bölgesi, Zeytincilik Sektör Raporu, Hatay, 55 sayfa.

Anonymous. 2005. European Pharmacopoeia. Fifth Edition (Volume 2), Council of Europe, Strasbourg.

Aouidi, F., Dupuy, N., Artaud, J., Roussos, S., Msallem, M., Perraud, Gaime, I. and Hamdi, M. 2012. Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses. Industrial Crops and Products, *37*(1); 292-297.

Apaydın, A. and 2002. Optimizasyon. AÜFF Döner Sermaye İşletmesi Yayınları, 389 s. Ankara.

Armutcu, F., Akyol, S., Hasgul, R. and Yigitoglu, M. 2011. Biological Effects and the Medical Usage of Olive Leaves. Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery, 1(3); 159-165.

Artık, N., Anlı, R.E., Konar, N. and, Vural, N. 2016. Gıdalarda Bulunan Fenolik Bileşikler ve Sağlık Açısından Önemleri, Sidas Yayınevi.

Bartolozzi, F., Rocchi, P., Camerini, F. and Fontanazza, G. 1999. Changes of biochemical parameters in olive (*Olea europaea L.*) leaves during an entire vegetative season, and their correlation with frost resistance. Acta Hort 474: 435-440.

Baş, C. 2010. Cevap yüzeyi tasarımları ve sinir ağları yaklaşımı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.

Baş, D. and Boyacı, İ. H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering, 78(3); 836-845.

Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi. Nobel Tıp Kitapevi,2.Baskı, 369 s.,İstanbul.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J. A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L*. leaves. Food Chemistry, 68, 457-462.

Berridge, J.C. 1982. Unattended optimisation of normal phase high-performance liquid chromatography separations with a microcomputer controlled chromatography. Chromatographia, 16(1); 172-174

Bezerr, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. and Escaleira, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76(5); 965-977.

Bianco, A., Chiacchio, A.A., Grassi G., Iannazzo, D., Piperno, A., and Romeo, R. 2006. Phenolic components of *Olea europaea*: Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. Food Chemistry, 95, 562-565.

Bilek, S.E. 2010. The effects of time, temperature, solvent:Solıd ratio and solvent composition on Extraction of total phenolic compound from dried olive (*Olea europaea L.*) leaves. Gıda, 35(6); 411-416.

Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. J. Pharm. Pharmacol., 51, 971-974.

Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H. and Sayadi, S. 2011. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. Food Chem Toxicol, 49(1); 179-184.

Bouazziz ,M. and Sayadi, S. 2005. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 497–504.

Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I. and Kechaou, N. 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. Industrial Crops and Products, 29(2-3); 412-419.

Box, G.E.P. and Draper, N.R. 2007. Response Surface Mixtures and Ridge Analysis. John Wiley and Sons, 857 p., New Jersey.

Brahmi, F., Flamini, G., Issaoui ,M., Dhibi, M,. Dabbou ,S., Mastouri ,M. and Hammami, M. 2012. Chemical composition and biological activities of volatile fractions from three Tunisian cultivars of olive leaves. Medicinal Chemistry Research, 21(10); 2863-2872.

Brahmi, F, Flamini ,G, Mechri, B, Dhibi, M. and Hammami, M. 2015. Antioxidant activity of the leaf volatile oil and extracts of *Olea europaea L.*cv. Chetoui from Northern Tunisia. Journal of Food & Nutritional Disorders, 4(3); 1-5.

Brereton, R.G. 1997. Multilevel Multifactor Designs for Multivariate Calibration. Analyst., 122, 1521–1529.

Brereton, R.G. 2003.Chemometrics :Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley & Sons, Ltd.,489p., Chichester,West Sussex PO19 8SQ, England.

Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F. and Nucci, R. 2002. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: Antioxidant properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 50, 4934-4940.

Briante, R., Patumi, M., Febbraio, F. and Nucc,i R. 2004. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic beta-glycosidase. J. of Biotechnology. 111(1); 67-77.

Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., D'Agostino, M., Maiuolo, J., Oliverio, M. and Russo, D. 2011. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. Food Chemistry, 127(4); 1609-1614.

Campeol, E., Flamini, G., Chericoni , S. and Catalano, S. 2001. Volatile compounds from three cultivars of *Olea europaea* from Italy. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 49, 5409-5411.

Campeol, E., Flamini, G., Cioni, P. L. and Morelli, I. 2003. Volatile fractions from three cultivars of *Olea europaea* L. collected in two different seasons. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 51, 1994-1999.

Campeol, E., Flamini, G., Cıoni, P. L., Morelli, I., D'andrea, F. and Cremonini, R. 2004. 1,5-Anhydroxylitol from leaves of *Olea europaea*. Carbohydrate Research, 339, 2731-2732.

Capasso, F., Simone, F. and Senatore, F. 1982. Traditional phytotherapy in the Agri Villey, Lucania, Southern Italy. Journal of Ethnopharmacology, 6, 243-250.

Carle, G. C. 1972. Determination of chromatographic resolution for peaks of vast concentration differences. Analytical Chemistry, 44, 1905-1906.

Cela, R., Martínez, J.A., González-Barreiro, C. and Lores, M. 2003. Multi-objective optimisation using evolutionary algorithms: its application to HPLC separations. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 69, 137-156.

Cherif, S., Rahal, N., Haouala, M., Hızaoui, B., Dargouth, F., Gueddiche, M., Kallel, Z.,

Balansard, G. and Boukef, K. 1996. Essai clinique d'un extrait titre de feuılles d'oliver dans le traitement de l'hypertension arterielle essentielle. J. Pharm. Belg., 51(2); 69-71.

Davis, P. H. 1978. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.6, Edinburg University Press, s.: 145.

Deb, K. 2004. Multi-Objective Optimization Using Evolutionary Algorithms. John-Wiley and Sons, 497 p., New York.

Del Boccio, P., Di Deo, A., De Curtis, A., Celli, N., Iacoviello, L. and Rotilio, D. 2003. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. Journal of Chromatography B, 785 (2003); 47–56

Del Rio, J. A., Baidez, A. G., Botia, J. M. and Ortuno, A. 2003. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *phytophthora sp*. Food Chemistry, 83, 75-78.

Delgado-Pertinez, M., Gomez-Cabrera A. and Garrido, A. 2000. Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*) digestibility and chemical composition and *Olea europaea* studies. Anim Feed Sci Technol, 87(3-4); 187-201.

Di Donna, L., Mazzotti, F., Naccarato, A., Salerno, R., Tagarelli, A., Taverna, D. and Sindona, G. 2010. Secondary metabolites of Olea europaea leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis. Food Chemistry, 121(2);492-496.

Dichio, B., Xiloyannis, C., Sofo, A. and Montanaro, G. 2006. Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering, Tree Physiology, 26 (2); 179-185.

Dill, K.A. 1987. The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography. J. Phys. Chem., 91 (7);1980–1988.

Dolan, J. W. 2002. Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 965, 195-205.

Duarte, R.M.B.O. and Duarte, A.C. 2010. A new chromatographic response function for use in size-exclusion chromatography optimization strategies: Application to complex organic mixtures. J. of Chromatography A, 1217(48); 7556-7563.

Duarte, R. M., Matos, J. T. and Duarte, A. C. 2012. A new chromatographic response function for assessing the separation quality in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. J Chromatography A, 1225, 121-131.

Efentakis, P., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Papachristodoulou, A., Dagres, N., Skaltsounis, A. L. and Andreadou, I. 2015. Effects of the olive tree leaf constituents on myocardial oxidative damage and atherosclerosis. Planta Med., 81(8); 648-654.

El, S. N. and Karakaya, S. 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. Nutrition Reviews, 67(11); 632-638.

Erbay, Z. and İçier, F. 2010. The importance and potential uses of olive leaves. Food Reviews International, 26(4); 319-334.

Ettre, L.S. 1993. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). International Union of Pure and Applied Chemistry, 65(4); 819-872.

Farag, R. S., El-Baroty, G. S. and Basuny, A., M. 2003. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (*cvs. Picual* and *Kronakii*), on the stability of sunflower oil. Int. Journal of Food Science and Technology, 38, 81-87.

Fasoula, S., Zisi, C., Nikitas, P. and Pappa-Louisi, A. 2013. Retention prediction and separation optimization of ionizable analytes in reversed-phase liquid chromatography by organic modifier gradients in different eluent pHs. J Chromatogr A, 1305, 131-138.

Fasoula, S., Zisi, C., H. Gika, Pappa-Louisi A. and Nikitas, P. 2015. Retention prediction and separation optimization under multilinear gradient elution in LC with Microsoft Excel macros. J. Chromatogr A, 1395,109-115.

Fehri, B., Mrad, S., Aiache, J. and Lamaison, J. 1995 . Effects of *Olea europaea* L. extract on the rat isolated *ıleum* and *trachea*. Phytotherapy Research, 9, 435-439.

Ficarra, P., Ficarra, R., Pasquale, A., Monforte, M. T. and Calabro, M. L. 1991. HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. II. Farmaco, 46(6); 803-815.

Floch, L. F., Tena, M. T., Rios, A. and Valcercal, M. 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. Talanta 46, 1123-1130.

Fu, S., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menendez, J. A., Menendez-Gutierrez,

M. P., Micol, V. and Fernandez-Gutierrez, A. 2010. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. Anal Bioanal Chem, 397(2); 643-654.

Furia, E., Nardi, M., Sindona, G. 2010. Standard potential and acidic constants of oleuropein. Journal of Chemical & Engineering Data, 55(8); 2824-2828.

Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N. and Bisignano, G. 2002. In-vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. International Journal of Antimicrobial Agents, 20, 293-296.

Gariboldi, P., Jommi, G. and Verotta, L. 1986. Secoiridoids from *Olea europaea*. Phytochemistry, 25(4); 865-869.

Gavin, H.P. 2013. The Levenberg-Marquardt method for nonlinear least squares curve-fitting problems. Department of Civil and Environmental Engineering, Duke University. Technical Sheet.

Gentile, L., Uccella, N. A. 2014. Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. var. Coratina) by LC-MS. Food Research Int., 55, 128-136.

Goga-Remont, S., Heinisch, S. and Rocca, J.L. 2000. Use of optimization software to determine rugged analysis conditions in high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 868, 13-29.

Goulas, V., Papoti, V. , Exarchou, V., Tsimidou, M. Z. and Gerothanassis, I. P. 2010. Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts. J. Agric. Food Chem., 58, 3303-3308.

Gökçe, B. ve Taşgetiren, S. 2009. Kalite İçin Deney Tasarımı. Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi, 6 (1);71-83.

Göktaş, A., İşçi, Ö., Atmaca, S.P. ve Çankaya, M.N. 2012. Zaman Skalasında Box-Cox Regresyon Yöntemi. Dokuz Eylül Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi, 27(1);57-70.

Gritti, F., Felinger, A. and Guiochon, G. 2003. Overloaded gradient elution chromatography on heterogeneous adsorbents in reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1017, 45-61.

Guinda, A., Albi, T., Perez-Camıno, M. and Lanzon, A. 2004. Supplementation of oils

with oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea*). European Journal of Lipid Science and Technology, 106, 22-26.

Gutierrez, V. R., Puerta, R. and Catala, A. 2001. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. Molecular and Cellular Biochemistry, 217, 35-41.

Güngör, M. 2008. Klinik Biyokimyada Ölçüm Belirsizliği. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul.

Hamdi, H. K. and Castellon, R. 2005. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton distruptor. Biochemical and Biophysical Research Communications, 334, 769-778.

Han, J., Talorete, T. P., Yamada, P. and Isoda, H. 2009. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. Cytotechnology (Special Issue JAACT), 59(1); 45-53.

Hashemi, P., Raeisi, F., Ghiasvand, A. R. and Rahimi, A. 2010. Reversed-phase disper sive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for pre concentration and HPLC determination of oleuropein. Talanta, 80(5); 1926-1931.

Hashmi, M.A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U. and Perveen, S. 2015. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Olea europaea*(Olive). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 1-29. Article ID 541591.

Haloui, E., Marzouk, Z., Marzouk, B., Bouftira, I., Bouraoui, A. and Fenina, N. 2010. Pharmacological activities and chemical composition of the *Olea europaea* L. leaf essential oils from Tunisia. Journal of Food, Agriculture & Environment. 8 (2); 204-208.

İmer, O. 2014. Kodeinin HPLC Tayini ve Optimizasyon Sürecinin Yapay Sinir Ağları Modellenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Jancic-Stojanovic, B., Rakic, T., Kostic, N., Vemic, A., Malenovic, A., Ivanovic, D. and Medenica, M. 2011. Advancement in optimization tactic achieved by newly developed chromatographic response function: application to LC separation of raloxifene and its impurities. Talanta, 85(3);1453-1460.

Japón-Luján, R., Luque-Rodriguez, J. M. and Luque de Castro, M. D. 2006a. Dynamic

ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Chromatography A, 1108, 76-82.

Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J.M. and Luque de Castro, M.D. 2006b. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Anal. Bioanal. Chem., 385(4); 753–759.

Japón-Luján, R. and Luque de Castro, M.D. 2006c. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. J. Chromatography A, 1136, 185–191.

Japón-Luján, R., Capote, P.F., Marinas, A. and Luque de Castro, D.M. 2008. Liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring for optimal selection of transitions to evaluate nutraceuticals from olive-tree materials. Rapid Commun. Mass Spectrometry, 22, 855–864.

Jaroniec, M. and Martire, D.E. 1986. A general model of liquid-solid chromatography with mixed mobile phases involving concurrent adsorption and partition effects. J. Chromatography A. 351, 1-16.

Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki, A., Isoda, H. and Sayadi, S. 2008. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. J Agric Food Chem., 56(8); 2630-2636.

Jemai, H., El Feki, A. and Sayadi, S. 2009. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. J. Agric Food Chem., 57(19); 8798-804.

Kamel, K. and Hadjmohammadi, M. R. 2008. Application of Multilinear Gradient Elution for Optimization of Separation of Chlorophenols Using Derringer's Desirability Function. Chromatographia, 67, 169-172.

Karioti, A., Chatzopoulou, A., Bilia, A.R., Liakopoulos, G., Stavrianakou, S. and Skaltsa, H. 2006. Novel secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency. Biosci. Biotechnol.Biochem., 70, 1898–1903.

Kaufmann, P. 1995. Multivariate optimization strategy for liquid chromatography. II.

Exploring and finding optimal conditions in the search area of the multidimensional solvent space. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 27, 105-114.

Kendall, M., Batterham, M., Callahan, D. L., Jardine, D., Prenzler, P. D., Robards, K. and Ryan, D. 2012. Randomized controlled study of the urinary excretion of biophenols following acute and chronic intake of olive leaf supplements. Food Chemistry, 130 (3); 651-659.

Khan, Md.Y., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A. and Kumar, V. 2007. *Olea europaea*: A Phyto-Pharmacological Review. Pharmacognosy Reviews, 1(1) ; 112-116.

Khayyal, M. T., El-Ghazaly, M. A., Abdallah, D. M., Nassar, N. N., Okpanyi, S. N. and Kreuter, M. 2002. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. Arzneim.Forsch./Drug Res., 52(11); 797-802.

Khuri, A.I. and Cornell, M. 1996. Response Surfaces, Marcel Dekker, Inc. 510 p., New-York.

Köksoy, O. and Hocaoğlu, G. 2005. Multi objective optimization solutions to the Taguchi's problem. G.U. Journal of Science, 18(4); 613-626.

Krafft, O. and Schaefer, M. 1992. D-optimal designs for a multivariate regression model. Journal of Multivariate Analysis,4 2, 130-140.

Kromidas, S. 2006. HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Kuwajima, H., Uemura, T., Takaishi, K., Inoue, K., and Inouye, H. 1988. A secoiridoid glucoside from *Olea europaea*. Phytochemistry., 27, 1757-1759.

Lee-Huang, S., Zhang, L., Lin Huang, P., Chang, Y. and Huang, P. L. 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. Biochemical and Biophysical Research Communications, 307, 1029-1037.

Lee, J. W. and Row, K. H. 2008. Prediction of the Gradient Retention Times of Purine Compounds in Reversed Phase HPLC. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 31(16); 2401-2416.

Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., Kalidas, S. and Kim, Y. C. 2009. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive

leaves and their antioxidant activities. Bioresource Technology, 100(23); 6107-6113.

Lee, O.H. and. Lee, B.Y. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. Bioresour. Technol. 101(10);3751- 3754

Martin-Garcia, A.I. and Molina-Alcaide, E. 2008. Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea var. europaea*) leaves for ruminants. Anim Feed Sci Technol.; 142(3-4); 317-329.

Mason, T.J. and Lorimer, J.P. 2002. Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing, Wiley-VCH Weeinheim, 303p.

Matos, J.T.V., Duarte, R. M.O. and Duarte, A.C. 2012. A generalization of a chromatographic response function for application in non-target one- and two-dimensional chromatography of complex samples. J Chromatography A, 1263, 141-150.

Meirinhos, J., Silva, B. M., Valentao, P., Seabra, R. M., Pereira, J. A., Dias, A. and Ferreres, F. 2005. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. Nat Prod Res. 19(2); 189-195.

Meyer, V. 2004. Practical High Performance Liquid Chromatography.John Wiley & Sons, Ltd.

Micol, V., Caturla, N., Perez-Fons, L., Mas, V., Perez, L. and Estepa, A. 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against *viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus* (VHSV). Antiviral Research, 66, 129-136.

Miettinen, K. 2002. Nonlinear Multiobjective Optimization. Kluwer Academic Publishers, 297 p., USA.

Mohagheghi, F., Bigdeli, M. R., Rasoulian, B., Hashemi, P. and Pour, M. R. 2011. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. Phytomedicine, 18(2-3), 170-175.

Montgomery, D. C. 2001. Design and Analysis of Experiments. 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc.Arizona.

Morris, V.M., Hughes, J.G. and Marriott, P.J. 1996. Examination of a new chrom.

function, based on an exponential resolution term, for use in optimization strategies: application to capillary gas chromatography separation of phenols. J. of Chromatogr. A 755, 235-243.

Mosele, J., Macià, A. and Motilva, M.J. 2015. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A Review. Molecules, 20(9); 17429-17468.

Mulet, A., Cárcel, J. A., Sanjuán, N. and Bon, J. 2003. New Food Drying Technologies - Use of Ultrasound. Food Science and Tech.International, 9(3); 215-221.

Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 2002. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 2nd Ed., John Wiley and Sons, 793 p., New York.

Nikitas, P. and Pappa-Louisi, A. 2005. Expressions of the fundamental equation of gradient elution and a numerical solution of these equations under any gradient profile. Anal. Chem., 77, 5670–5677.

Nikitas, P. and Pappa-Louisi, A. 2009a. New approach to linear gradient elution used for optimisation in reversed-phase liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,1(32); 1527–1576.

Nikitas, P. and Pappa-Louisi, A. 2009b. Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. J Chromatogr A, 1216(10); 1737-1755.

Nikita,s P., Pappa-Louisi, A., Agrafiotou, P. and Mansour, A. 2011. Multilinear gradient elution optimization in reversed-phase liquid chromatography based on logarithmic retention models: application to separation of a set of purines, pyrimidines and nucleosides. J Chromatogr A, 1218(33); 5658-5663.

Nikitas, P., Pappa-Louisi, A. and Zisi, C. 2012. pH-gradient reversed-phase liquid chromatography of ionogenic analytes revisited. Anal. Chem, 84(15), 6611-6618.

Nishibe, S., Han, Y., Noguchi, Y., Ueda, H., Yamazaki, M., Mizutani, K., Kambara, T. and Kishida, N. 2001. The inhibitory effects of the compounds from olive leaf on tumor nucrosis factor production and on β-hexosaminidase release, Natural Medicines, 55; 205-208.

Occhiuto, F., Circosta, C. and Gregorio, A. 1990. *Olea europaea* L. and oleuropein:

Effects on excito-conduction and on monophasic action potential in anaesthetized dogs. Phytotheraphy Research, 4(4);140-143.

Omar, S.H. 2010a. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. Sci Pharm.,78(2); 133-154.

Omar, S.H. 2010b. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. Saudi Pharm J, 18(3); 111-121.

Öztunca, F.H., Saraçoğlu, İ. and Harput, Ü. Ş. 2011. Comperative HPLC determination of iridoid contents in *Veronica Cuneıfolia subsp*., *Cuneifolia* and *V. Cymbalaria*. Turk J. Pharm. Sci., 8(1); 63-70.

Paiva-Martins, F. and Gordon, M. H. 2001. Isolation and characterization of the antioxi dant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl- 4-hexenoate from Olive (*Olea europaea*) leaves. J. of Agr. and Food Chemistry., 49, 4214-4219.

Pappa-Louisi A., Nikitas P., Agrafiotou P. 2006. Column equilibration effects in gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. J Chromatogr A, 1127(1-2); 97-107.

Pappa-Louisi A., Nikitas P., Zisi C., Papachristos K. 2008. Combined effect of tempera ture and organic modifier concentration on the retention under single mode gradient con ditions in reversed-phase HPLC. J. Sep Sci., 31, 2953-2961.

Pasandideh S.H.R., Niaki, S.T.A. 2006. Optimizing Multi-Response Statistical Problems Using a Genetic Algorithm. Scientica Iranica, 13(1);50-59.

Pereira, A.P., I.C.R.F. Ferreira, F. Marcelino, F. Valentao, P.B. Andrade, R. Seabra, L. Este-vinho, A. Bento and J.A. Pereira. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea L*. Cv. Cobrançosa) Leaves. Molecules. 12(5);1153-1162.

Petkovska, R., Cornett, C. and Dimitrovska, A. 2008. Development and validation of rapid resolution RP-HPLC method for simultaneous determination of Atorvastatin and related compounds by use of Chemometrics. Analytical Letters, 41(6); 992-1009.

Pieroni, A., Heimler, D., Pieters, L., Van Poel, B. and Vlietınck, A. J. 1996. In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves. Pharmazie, 51(10); 765-768.

Poudyal, H., Campbell, F. and, Brown, L. 2010. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic and metabolic changes in high carbohydrate, high fat-fed rats. J Nutr. 140(5); 946-53.

Proestos, C., Sereli, D. and Komaitis, M. 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. Food Chemistry. 95(1); 44-52.

Quirantes-Piné, R., Lozano-Sánchez, J., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2013. HPLC-ESI-QTOF-MS as a Powerful Analytical Tool for Characterising Phenolic Compounds in Olive-leaf Extracts. Phytochem. Anal., 24, 213–223.

Rakiç, T., Jovanovic, M., Dumiç, A., Pekiç, M., Ribiç, S. and Stojanoviç, B.J. 2013. Robust optimization of psychotropic drug mixture separation in hydrophilic interaction Liquid Chromatography. Acta Chim. Slov., 60(2); 411-415.

Rambla-Alegre, M., Marco-Peiró, S., Peris-Vicente, J., Beltrán-Martinavarro, B., Collado-Sanchez, M. A., Carda-Broch, S. And Esteve-Romero, J. 2011. Analytical determination of hydroxytyrosol in olive extract samples by micellar liquid chromatography. Food Chemistry, *129*(2); 614-618.

Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D. and Di Fonzo, V. 2006. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). J Agric Food Chem., 54(2); 434-440.

Rauwald, H. W., Brehm, O. and Odenthal, K. P. 1994. Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. Phytotherapy Research, 8, 135-140.

Riberio, R. A., Melo, M. R., Barros, F., Gomes, C. and Trolin, G. 1986. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of Sao Paulo. Journal of Ethnopharmacology, 15, 261-269.

Roybyrne, P.P., Bystritsky, A., Russo, J., Craske, M.G., Sherbourne, C.D. and Stein, M.B. 2005. Use of herbal medicine in primary care patients with mood and anxiety disorders. Psychosomatics, 46, 117–122

Ruiz-Gutierrez, V., Muriana, F. J. G., Maestro, R. and Graciani, E. 1995. Oleuropein on lipid and fatty acid composition of rat heart. Nutrition Research, 15(1);37-51.

Ryan, D. and Robards, K. 1998. Critical Review. Phenolic compounds in olives. The Analyst, 123(5); 31R-44R.

Salah, M.B., Abdelmelek, H. and Abderraba, M. 2012. Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. Medicinal Chemistry, 2(5); 107-111.

Samet, I., Han J., Jlaiel, L., Sayadi, S. and Isoda, H. 2014. Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. Oxid Med. and Cell Longevity.2014, 1-16.

Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraouri, F., Boukef, K., Balansard, G.2001.Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 618-621.

Seçme, M. 2014. Oleuropeinin SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında çeşitli hücresel yolaklardaki etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G. and Morozzi, G. 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. Journal of Chromatography A. 1054, 113-127.

Shahidi, F. 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. Nahrung. 44,158–63.

Sifaoui, I., Mecha, E., Silva, A., Chammem, N., Mejri, M., Abderabba, M. and Bronze, M. R. 2015. Optimized extraction of antioxidants from olive leaves using augmented simplex centroid design. Analytical Letters. 49(9); 1323-1333.

Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V. and Boas, L. V. 2006. Phenolic compounds and anti-oxidant activity of *Olea europaea L*. fruits and leaves. Food Science and Technology International, 12(5); 385-395.

Singh, I., Mok, M., Christense, M., Turner, A.H. and Hawley, J.A. 2008. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. Nutrition Metabolism&Cardiovascular Diseases. 18,127-132

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., Simonic, M. and Knez, Z. 2005.

Phenols, proantho-cyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry, 89, 191-198.

Snyder, L.R. and Dolan, J.W. 1996. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. Journal of Chromatography A, 721, 3-14.

Snyder, L.R. and Dolan, J.W. 2007. High Performance Gradient Elution, The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model, John Wiley & Sons, Inc. Publication. Hoboken, New Jersey.

Snyder, L. R., Kirkland, J.J. and Glajch, J.L. 1997. Practical HPLC Method Development. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. Publication. Hoboken, New Jersey.

Somova, L. I., Shode, F. O., Ramnanan, P. and Nadar, A. 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from O*lea europaea*, subspecies *africana* leaves. Journal of Ethno-Pharmacology, 84, 299-305.

Somova, L. I., Shode, F. O. and Mipando, M. 2004. Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. Phytomedicine, 11, 121-129.

Stamatopoulos, K., Katsoyannos, E., Chatzilazarou, A. and Konteles, S.J. 2012. Improvement of oleuropein extractability by optimising steam blanching process as pre-treatment of olive leaf extraction via response surface methodology. Food Chem, 133(2); 344-351.

Stojanovic, B.J., Rakic, T., Kostic, N., Vemic, A., Malenovic, A., Ivanovic, D. and Medenica, M. 2011. Advancement in optimization tactic achieved by newly developed chromatographic response function: application to LC separation of raloxifene and its impurities. Talanta, 85(3); 1453-1460.

Stupans, I., Stretch, G. and Hayball, P. 2000. Olive oil phenols inhibit human hepatic microsomal activity. Journal of Nutrition, 130, 2367-2370.

Stupans, I., Murray, M., Kirlich, A., Tuck, K. L. and Hayball, P. J. 2001. Inactivation of cytochrome P450 by the food-derived complex phenol oleuropein. Food and Chemical Toxicology, 39, 1119-1124.

Sudjana, A.N., D'Orazio, C.,Ryan, V.,Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V. and Hammer ,K.A. 2009. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. Int. Journal of Antimicrobial Agents, 33 (5); 461-463.

Şahin, S. 2011. Zeytin Ağacı Yapraklarından Süperkritik-CO_2 ile Ekstrakt Eldesi ve Bileşimindeki Oleuropein Miktarının İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi.

Şahin, S. and Bilgin, M. 2012. Study on oleuropein extraction from olive tree (*Olea europaea*) leaves by means of SFE: Comparison of water and ethanol as co-solvent. Separation Science and Technology, 47, 2391–2398.

Şahin, S. and Samlı, R. 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. Ultrason. Sonochem., 20, 595–602.

Şayakdokuyan, A. 2006. Endüstriyel Deneylerde Çok Cevaplı Süreç Optimizasyonu. Niğde (Ömer Halisdemir) Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, 55 s., Niğde.

Taamalli, A., Arráez-Román, D., Ibañez, E., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2012a. Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS^2. J. Agric. Food Chem., 60, 791–798.

Taamalli, A.; Arráez-Román, D.; Barrajón-Catalán, E.; Ruiz-Torres, V.; Pérez-Sánchez, A.,Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M. and Segura-Carretero, A. 2012b. Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. Food Chem. Toxicol., 50, 1817–1825.

Tabera, J., Guinda, A., Ruiz-Rodrigez, A., Senorans, F.J., Ibanez, E., Albi,T. and Reglero, G. 2004. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. J. Agric. Food Chem., 52, 4774-4779.

Taga, Y., Aslan, D., Güner, G. ve Kutay, F. Z. 2006. Tıbbi Laboratuarlarda Standar. ve Kalite Yöntemi; Türk Biyokiya Derneği, Ankara.

Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., León L., de la Rosa, R., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2014. Determination of phenolic compounds of "Sikitita" olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. comparison with its

parents “Arbequina” and “Picual” olive leaves. LWT—Food Sci. Technol., 58, 28–34.

Tan, H.W., Tuck, K.L., Stupans, I. and Hayball, P. J. 2003. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography B, 785, 187–191.

Tanker, Mekin, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:67, Fitokimyasal Analizler, Tanım, Miktar Tayini ve İzolasyon.

Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S.ve Akkaya, Z. 2009. Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksi dan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu. GIDA, 34 (3); 175-182.

Tsarbopoulos, A., Gikas, E., Papadopoulos, N., Aligiannis, N., Kafatos, A. 2003. imultaneous determination of oleuropein and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 785, 157–164.

Tutour, B.L. and Guedon, D. 1992. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. Phytochemistry, 31(4); 1173-1178.

Tuzlacı, E. 2006. Şifa Niyetine-Türkiye’nin Bitkisel Halk İlaçları-Alfa Basım Yayım Dağıtım Ltd. Şti. İstanbul. p:59

Türkşen, Ö. 2011. Çok yanıtlı yüzey problemlerinin çözümüne bulanık ve sezgisel yaklaşım. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Türkşen, Ö. and Ertunç S. 2015. Optimization of saponification process in multi-response framework by using desirability function approach. SAÜ Fen Bil Dergisi 19(2); 141-149.

Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8, 303–313.

Visioli, F., Bellomo, G. and Galli, C. 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochemical and Biophysical Research Communications, 247, 60-64.

Visioli, F., Poli, A., Galli, C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Medicinal Research Reviews, 22(1); 65-75.

Xie, P.-jun., Huang, L.-xin., Zhang, C.-hong., You, F., Wang, C.-zhang. and Zhou, H.

2015.Reduced-Pressure Boiling Extraction of Oleuropein Coupled with Ultrasonication from Olive Leaves (*Olea europaea* L.). Advances in Materials Science and Engineering, 2015, 1-8.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N. and Skaltsounis, A.L. 2012. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. J. Supercrit. Fluids, 67, 89–93.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N. and Skaltsounis, A.L. 2014. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. Sep.Purif. Technol., 122, 323–330.

Yateem, H., Afaneh, I. and Al-Rimawi, F. 2014. Optimum Conditions for Oleuropein Extraction from Olive Leaves. Int. Journal of Applied Science and Technology, 4(5); 153-157.

Yıldız, G.ve Uylaşer, V. 2011. Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. Journal of Agricultural Faculty of Uludag University, 25(1); 131-142.

Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E.G., Pike, L.M. and Patil, B.S. 2005. Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(6); 2009-2014.

Yuan, J.J.,Wang, C.Z.,Ye, J.Z.,Tao, R. and Zhang, Y.S. 2015. Enzymatic hydrolysis of oleuropein from *Olea europea* (Olive) leaf extract and antioxidant activities. Molecules, 20(2); 2903-2921.

Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. and Benjelloun, W. 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Moracco. Journal of Ethnopharmacology, 58, 45-54.

Zun-Qiu, W., Gui-Zhou, Y., Qing-Ping, Z., You-Jun, J., Kai-Yu, T., Hua-Ping, C., Ze-Shen, Y. and Qian-Ming, H. 2015. Purification, dynamic changes and ntioxidant activities of oleuropein in olive (*Olea Europaea L.*) leaves. Journal of Food Biochemistry, 39, 566–574.

EKLER

EK1 **MeOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (GAE), toplam fenol (OLE), oleuropein miktarı (HPLC), toplam antioksidan aktivite cevap faktörleri için, t testi sonuçları**

EK2 **EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (GAE), toplam fenol (OLE), oleuropein miktarı (HPLC), toplam antioksidan aktivite cevap faktörleri için, t testi sonuçları**

EK1

Ek1-a MeOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (GAE) cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Data Set-B
Column A	Data Set-A

Paired t test

P value	0.0005
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.834 df=11
Number of pairs	12

How big is the difference?

Mean of differences	1.208
SD of differences	0.866
SEM of differences	0.25
95% confidence interval	0.6581 to 1.759
R squared (partial eta squared)	0.6799

How effective was the pairing?

Correlation coefficient (r)	0.9702
P value (one tailed)	<0.0001
P value summary	****
Was the pairing significantly effective?	Yes

Ek1-b MeOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (OLE) cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Treated
Column A	Control

Paired t test

P value	0.0004
P value summary	***

Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	**t=4.954** df=11
Number of pairs	12

How big is the difference?

Mean of differences	0.525
SD of differences	0.3671
SEM of differences	0.106
95% confidence interval	0.2917 to 0.7583
R squared (partial eta squared)	0.6905

How effective was the pairing?

Correlation coefficient (r)	0.9557
P value (one tailed)	<0.0001
P value summary	****
Was the pairing significantly effective?	Yes

Ek1-c MeOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, oleuropein miktarı (HPLC) cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Treated
Column A	Control

Paired t test

P value	0.5981
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	**No**
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	**t=0.5427** df=11
Number of pairs	12

How big is the difference?

Mean of differences	0.1075
SD of differences	0.6861
SEM of differences	0.1981
95% confidence interval	-0.3285 to 0.5435
R squared (partial eta squared)	0.02608

How effective was the pairing?

Correlation coefficient (r)	0.8013

P value (one tailed)	0.0009
P value summary	***
Was the pairing significantly effective?	Yes

Ek1-d MeOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam antioksidan aktivite cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Treated
Column A	Control
Paired t test	
P value	0.0378
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df **t=2.36** df=11	
Number of pairs	12
How big is the difference?	
Mean of differences	-0.4625
SD of differences	0.679
SEM of differences	0.196
95% confidence interval	-0.8939 to -0.03109
R squared (partial eta squared)	0.336
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0.8555
P value (one tailed)	0.0002
P value summary	***
Was the pairing significantly effective?	Yes

EK 2

Ek2-a EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (GAE) cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Treated
Column A	Control

Paired t test		
P value	0.0759	
P value summary	ns	
Significantly different (P < 0.05)?		No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	**t=1.98** df=10	
Number of pairs	11	
How big is the difference?		
Mean of differences	1.712	
SD of differences	2.868	
SEM of differences	0.8647	
95% confidence interval	-0.2148 to 3.638	
R squared (partial eta squared)	0.2816	
How effective was the pairing?		
Correlation coefficient (r)	0.7968	
P value (one tailed)	0.0017	
P value summary	**	
Was the pairing significantly effective?		Yes

Ek2-b EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam fenol (OLE) cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Treated
Column A	Control

Paired t test	
P value	0.0823
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	
Two-tailed	
t, df	**t=1.931** df=10
Number of pairs	11
How big is the difference?	
Mean of differences	0.8455
SD of differences	1.452
SEM of differences	0.4379
95% confidence interval	-0.1302 to 1.821
R squared (partial eta squared)	0.2716
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0.7675
P value (one tailed)	0.0029
P value summary	**
Was the pairing significantly effective?	Yes

Ek2-c EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, oleuropein miktarı (HPLC) cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Treated
Column A	Control

Paired t test	
P value	0.0388
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.377 df=10
Number of pairs	11
How big is the difference?	
Mean of differences	0.8236
SD of differences	1.149

SEM of differences	0.3466	
95% confidence interval	0.05143 to 1.596	
R squared (partial eta squared)		0.3609
How effective was the pairing?		
Correlation coefficient (r)	0.8313	
P value (one tailed)	0.0008	
P value summary	***	
Was the pairing significantly effective?		Yes

Ek2-d EtOH/H_2O ekstraksiyonunda ultrasonik banyo ile ses ötesi dalga etkisi verilmesi durumunda, toplam antioksidan aktivite cevap faktörü için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesinde, t testi verileri

Column B	Treated
Column A	Control

Paired t test		
P value	0.0378	
P value summary	*	
Significantly different (P < 0.05)?		Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	**t=2.36** df=11	
Number of pairs	12	
How big is the difference?		
Mean of differences	-0.735	
SD of differences	1.079	
SEM of differences	0.3115	
95% confidence interval	-1.421 to -0.0494	
R squared (partial eta squared)		0.3361
How effective was the pairing?		
Correlation coefficient (r)	0.8419	
P value (one tailed)	0.0003	
P value summary	***	
Was the pairing significantly effective?		Yes

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nilüfer VURAL

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 30.11.1971

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Cumhuriyet Lisesi (1985-1988)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (1989-1993)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (1995-1998)

Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (2011-2017)

İş Deneyimi

1.PROTEK YAPI İŞLERİ FABRİKASI; 1993-1994 Polikeramik Malzeme Üretimi

2.DOLUNAY DIŞ TİC.A.Ş.;1994-1995 Kalite Kontrol Cihazları

3.MONTWELL DIŞ.TİC.ŞTİ. ; 1995 -1996 Ürün Sorumlusu.

4.GENOTEK/TÜRKİYE-GENOMED;1996-1997 Biyokimya Departmanı Bölge Sorumlusu

5.ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİLİM TEKNOLOJİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ (BİTAUM);

1997-2006 HPLC,GC,GC-MS, Ultrasantrifüj, Termal Analiz Ünitesi, Ünite Sorumlusu

2006 –2009 Enstrümental Analiz Birimi (EAB) Sorumlusu

2009-2010 EAB ve YEBİM (Yer Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi) Uzman

6.ANKARA ÜNİVERSİTESİ MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ KİMYA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ; 2010-Halen çalışıyor, Uzman

Uluslararası Dergilerdeki Yayınlar

Göze, İ., **Vural, N**. and Ercan, N. 2016. Characterization of Essential oil and Antioxidant Activities of Some Species of *Salvia* in Turkey. Natural Volatiles&Essent.Oils (NVEO), 3(4); 1-7.

Okcu, G., Ayhan, K., Altuntas E.G., **Vural, N.** and Poyrazoglu, E.S. 2016. Determination of phenolic acid decarboxylase produced by lactic acid bacteria isolated from shalgam (şalgam) juice using green analytical chemistry method. LWT-Food Science and Technology 66, 615-621.

Bozoglu, M.D., Ertunc, S., Akay, B., Bursali, N., **Vural, N.**, Hapoglu, H. and Demirci, Y. 2015. The effect of temperature, pH and SO_2 on ethanol concentration and sugar consumption rate (SCR) in apple wine process. J. Chem. Soc. Pak 37(03); 431-439.

Giwa, S.O., Pekel, L.C., **Vural, N**. and Hapoglu, H. 2013. Optimization of turbidity removal from petrochemical wastewater by electrocoagulation using response surface methodology. International Journal of Advanced Scientific and Technica, 3(1);443-454.

Zengin, H., **Vural, N.** and Çelik, K.V. 2013. Comparison of Changes in Fatty Acid Composition of Starved and Fed Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*) Larvae. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13, 397-405.

Sezgin-Bayindir, Z., Onay-Besikci, A.,**Vural, N.** and Yüksel, N. 2013. Niosomes encapsulating paclitaxel for oral bioavailability enhancement: preparation, characterization, pharmacokinetics and biodistribution. Journal of Microencapsulation, 30 (8); 796-804.

Çavuldak, Ö.A., Anlı, R.E.,**Vural, N.** 2013. Phenolic composition and antioxidant capacity of some red wines from Turkey, International Journal of Food Science and Nutrition Engineering, 3(3);40-47.

Atas, A.D., Goze, I., Alim, A., Cetinus, S.A., Durmus, N.,**Vural, N**. and Cakmak, O. 2012. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antispasmodic activities of the essential oil *of Juniperus excelsa* subsp. *Excelsa* , JEOBP, 15 (3);476 – 483.

Anlı, R. E.,**Vural, N.** and Bayram, M. 2011. Removal of Ochratoxin A (OTA) from naturally contaminated wines during the vinification process. J. Inst. Brew., 117(3); 456–461.

Atas, A.D., Goze, İ., Alim, A., Cetinus, S.A., **Vural, N.**, Goze, H.M. and Korkoca, H. 2011. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial activities of the essential oil of *Salvia hypargeia* Fisch. & Mey. JEOBP ,14 (3); 289 – 296.

Ünlü, M., Ergene, E., Unlü, G.V., Zeytinoğlu, H.S. and **Vural, N.** 2010. Composition, antimicro bial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnomomum zeylanicum Blume (Lauraceae).* Food and Chemical Toxicology, 48 ,3274-3280.

Goze, I., Alim, A., Cetinus, S.A., Cetin, A., Durmuş, N., Atas, A.D. and **Vural, N.** 2010. *In vitro* antimicrobial,Antioxidant and Antispasmodic activities and the composition of the Essential Oil of *Origanum acutidens (Hand.-Mazz.)* Ietswaart. Journal of Medicinal Food,13(3) ; 1-5.

Alim, A., Goze, İ., Cetin, A., Atas, A.D., **Vural, N.** and Donmez, E. 2009.Antimicrobial activity of the essential oil of *Cyclotrichium niveum (Boiss.)Manden.Et Scheng* African Journal of Microbiology Research, 3(8); 422-425.

Alim, A., Goze, İ., Cetin, A., Atas, A.D., Cetinus, S.A. and **Vural, N.** 2009. Chemical composi tion and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil *Nepeta nuda L Sub sp. Albiflora (Boiss.) gams.* African J. of Micr. Research 3(8); 463-467.

Ünlü, M., Vardar-Ünlü, G., **Vural, N.**, Dönmez, E. and Özbaş, Z.Y. 2009. Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra spicata L.* from Turkey. Natural Product Research, 23(6);572- 579.

Anlı, R.E. and **Vural, N.** 2009. Antioxidant Phenolic Substances of Turkish Red Wines from Different Wine Regions. Molecules, 14(1); 289-297.

Özhan, D., Anlı, R.E., **Vural, N.** and Bayram, M. 2009. Determination of Chlorophenols in cork and wine by using HS-SPME and GC-ECD Detection. J.Inst.Brew.,115(1);71-77.

Goze, İ., Alim, A., Cetinus, S.A., Durmuş, N., **Vural, N.** and Göze, H.M. 2009.Chemical composition and antioxidant,antimicrobial,antispasmodic activities of the essential oil of *Thymus Fallax* Fisch. Mey. Journal of Medicinal Plants Research 3(3); 174-178.

Anlı, R. E.,**Vural, N.** and Kızılet, E. 2008. An Alternative Method for the determination of some of the antioxidant phenolics in var. Turkish red wines. J. Inst. Brew. 114(3);239-245.

Ünlü, M.,Vardar-Ünlü, G.,**Vural, N.**, Dönmez, E. and Çakmak, O. 2008.Composition and Antimicrobial activity of *juniperus excelsa* Essential Oil. Chemistry of Natural Compounds, 44(1); 129-131.

Anlı, R. E.,**Vural, N.** and Gucer, Y. 2007. Determination of the Principal Volatile Compounds of Turkish Raki. J. Inst. Brew. 113(3); 302–309.

Anlı,, R.E.,**Vural, N.**,Vural, İ.H. and Gucer, Y. 2007. Application of Solid-Phase Micro-Extraction (SPME) for Determining Residues of Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-Methyl in Wine with Gas Chromatography (GC). J. Inst. Brew., 113(2);213–218.

Cetinus, S.A., Goze, İ., Saraç, B. and **Vural, N.** 2007. Scavenging effects and antispasmodic activity of the essential oil of *Cyclotrichium niveum*. Fitoterapia ,78(2); 129-133.

Çetingüç, A., Ölmez, S., **Vural, N.** 2007. HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. Dental Materials, 23 (3); 302-307.

Ünlü, G.V.,Ünlü, M.,Dönmez, E. and **Vural, N**. 2007. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum minutiflorum O Schwarz& PH Davis.* J.Sci.Food Agric. 87, 255-259.

Çetingüç, A., Ölmez, S., **Vural, N.** 2006. HEMA diffusion from dentin bonding agents through various dentin thicknesses in primary molars. Am. J. Dent.,19(4);231-235.

Anlı, R. E.,**Vural, N.**, Demiray, S., Özkan, M. 2006.Trans-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish Red Wines with HPLC. J. of Wine Research, 17(2);.117-125.

Anlı, R. E.,**Vural, N.**, Demiray, S., Behic, M. 2006. Biogenic Amine Content of Beers Consumed in Turkey and Influence of Storage Conditions on Biogenic Amine Formation. *Journal of Institue of Brewing*, 112(3);267-274.

Anlı, R. E., Çabuk, B., **Vural, N**., Başpınar, E. 2005. *Ochratoxin A in Turkish Wines*.J. Food Biochem., 29; 611-623.

Kömürcüoğlu, E., Ölmez, S., **Vural, N.** 2005. Evaluation of residual monomer elimination methods in three different fissure sealants *in vitro.* J. of Oral Rehabilitation, 32,116-121.

Anlı, R.E., **Vural, N**., Yılmaz, S..,Vural, İ.H. 2004.The determination of biogenic amines in Turkish red wines. Journal of Food Composition and Analysis, 17, 53-62.

Durlu-Özkaya, F., Ayhan, K., **Vural, N**. 2001. Biogenic amines produced by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products. Meat Science, 58(2);163-166.

Ulusal Dergilerdeki Yayınlar

Göze, İ., Alim, A., Ercan, N. and **Vural, N**. 2016. In vitro antimicrobial and antioxidant activities and chemical composition of essential oils of the leaf and flower of *Origanum minutiflorum O. Schwarz et. PH. Davis.* Cumhuriyet Üniv. Sağ. Bil. Enst. Dergisi, 1(2);17-23.

Cavuldak, Ö.A, **Vural, N.** and Anlı, R.E. 2016. Ultrasound assisted extraction of plant-derived phenolic compounds. GIDA-Journal of Food 41 (1); 53-60.

Zengin,H., Akpınar, M.A.ve **Vural, N**. 2003. *Oncorhynchus mykiss* Walbaum,1792'in gelişimi sırasında yağ asit kompozisyonunda meydana gelen değişimler'Süleyman Demirel Üniversitesi Eğridir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 2(10); 64-71.

Kitap

Artık N., Anlı E., Konar N., **Vural N**. 2016. Gıdalarda Bulunan Fenolik Bileşikler, SİDAS.

Diğer Akademik Faaliyetler

- Bir tanesi devam etmekte olan altı adet TÜBİTAK projesi, yedi adet BAP projesi, bir DPT projesi, bir KOSGEB projesi olmak üzere 15 projede araştırmacı olarak görev almıştır.
- Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde on poster, üç sözel sunum yapmıştır.