

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KENEVİR (*Cannabis sativa*) BİTKİSİNDE BULUNAN MAJÖR
KANNABİNOİDLERİN TANIMLANMASI VE EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİNİN OPTİMİZASYONU**

Mariem BOUALİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KENEVİR (*Cannabis sativa*) BİTKİSİNDE BULUNAN MAJÖR
KANNABİNOİDLERİN TANIMLANMASI VE EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİNİN OPTİMİZASYONU**

Mariem BOUALİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

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

**KENEVİR (*Cannabis sativa*) BİTKİSİNDE BULUNAN MAJÖR
KANNABİNOİDLERİN TANIMLANMASI VE EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİNİN OPTİMİZASYONU**

Mariem BOUALİ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez TÜBİTAK tarafından 219Z312 no'lu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2021

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

**KENEVİR (*Cannabis sativa*) BİTKİSİNDE BULUNAN MAJÖR
KANNABİNOİDLERİN TANIMLANMASI VE EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİNİN OPTİMİZASYONU**

Mariem BOUALİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 14/07/2021 tarihinde jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ (Danışman)

Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Prof. Dr. Taner AKAR

ÖZET

KENEVİR (*Cannabis sativa*) BİTKİSİNDE BULUNAN MAJÖR KANNABİNOİDLERİN TANIMLANMASI VE EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN OPTİMİZASYONU

Mariem BOUALİ

Yüksek Lisans, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Fatih Cengiz

Temmuz 2021; 90 sayfa

Son zamanlarda Türkiye'de endüstriyel olarak kullanımı yasal izinlerle düzenlenen kenevir bitkisi *Cannabaceae* familyasına ait olan ve içermiş oldukları kannabinoidler, terpenler ve fenolik bileşikler gibi sekonder metabolitler nedeni ile özellikle ilaç endüstrisinin gözdesi konumuna gelen önemli bir bitkisel materyaldir. Bu sekonder metabolitlerin özellikle antiepileptik ve antikanserojenik etkilerinin yanında kanser vakalarında ağrının giderilmesinde ciddi etkileri oldukları çok sayıda bilimsel araştırmaya konu olmuştur. Bu çalışmada, kenevir bitkisinde bulunan majör kannabinoidlerin (kannabidivarin, kannabidiolik asit, kannabigerolik asit, kannabigerol, kannabidiol, delta 9 tetrahidrokanabinol, delta 8 tetrahidrokanabinol kannabikromen ve tetrahidrokannabinolik asit) miktarsal açıdan yüksek performans sıvı kromatografisi cihazında analiz edilebilmesine yönelik yöntemin bazı parametreler açısından doğrulanması ve kontrollü şartlar altında yetiştirilen kenevir bitkisinde bulunan majör kannabinoidlerin ekstraksiyonu konusunda farklı yöntemlerin uygulanarak optimize edilmesi amaçlanmıştır. Ekstraksiyon çalışmaları kapsamında dinamik maserasyon, ultrason destekli ekstraksiyon, zeytinyağı ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu olmak üzere dört farklı ekstraksiyon tekniği denenmiş ve her bir yöntem Yanıt Yüzey Yöntemi deneme tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; araştırma kapsamındaki tüm kannabinoidlerin 0,10-250,00 mg/L aralığında doğrusal olarak ($r^2=1,00$) tanımlanabildiği, kannabinoid tespit sınırlarının 0,07-0,26 mg/L arasında değiştiği ve tekrarlanabilirlik değerinin $<5,50\%$ olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, bitkilerden kannabinoidlerin ekstrakte edilebilmesi için kullanılan tüm yöntemlere ait en uygun değerler tespit edilmiş ve sonuçlar çizelge ve grafikler halinde sunulmuştur. Tez çalışması kapsamında üretilen verilerin son zamanlarda popüler hale gelen ve özellikle tarım, eczacılık, gıda ve kimya sektörlerinde kullanım alanı giderek artan kannabinoidlerin bitkisel örneklerdeki düzeylerinin ve en uygun ekstraksiyon koşullarının belirlenmesine yönelik akademik ve endüstriyel düzeydeki çalışmalara katkılar sağlaması beklenmektedir.

ANAHTAR KELİMELE: Kenevir, Ekstraksiyon, HPLC, Kannabinoid, Doğrulama.

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Prof. Dr. Taner AKAR

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND OPTIMIZATION OF EXTRACTION METHODS OF MAJOR CANNABINOIDS IN CANNABIS (*Cannabis sativa*)

Mariem BOUALI

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih Cengiz

July 2021; 90 pages

Cannabis plant belongs to the family of the *Cannabinaceae*, and it has recently been regulated by legal permissions for industrial and medical use in Turkey. It is an important herbal material that has become a favorite of the pharmaceutical industry, owing to the secondary metabolites it contains, such as cannabinoids, terpenes, and phenolic compounds. Many scientific investigations have shown that the aforementioned secondary metabolites have significant benefits, particularly in the alleviation of antiepileptic, anticarcinogenic, and cancer pains. The purpose of this research is to validate some parameters of the method high performance liquid chromatography for quantitative analysis of the major cannabinoids (cannabidivarin, cannabidiolic acid, cannabigerolic acid, cannabigerol, cannabidiol, delta 9 tetrahydrocannabinol, delta 8 tetrahydrocannabinol cannabidivarin, cannabidiolic acid) found in cannabis plant and optimization of the extraction of major cannabinoids in cannabis plant grown under controlled conditions by applying different methods. Using the Response Surface Method trial design, four distinct extraction procedures, namely dynamic maceration, ultrasonic aided extraction, olive oil extraction, and supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids, were tried inside the scope of the extraction studies. According to the results, all cannabinoids within the scope of the research can be characterized linearly ($r^2=1,00$) in the range of 0,10-250,00 mg/L, the cannabinoid detection limits range between 0,07-0,26 mg/L, and the reproducibility value is 5,50 percent. The best values for all methods adopted to extract cannabinoids from the plant were calculated and presented in tables and graphics. The results hopefully help to academic and industry research to determine cannabinoid levels in herbal samples and the best conditions of extraction currently in use, particularly in agriculture, pharmaceutical sector, food industry and chemistry.

KEYWORDS: Cannabinoid, Cannabis, Extraction, HPLC, Validation.

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Prof. Dr. Taner AKAR

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmamın planlanmasında ve her aşamasında her türlü bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve sabırla desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün akademik kadrosunda yer alan bütün saygı değer hocalarıma ve deneysel çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan, teorik ve pratik bilgilerini benimle paylaşan arkadaşlarım özellikle Ümit BABACAN'a ayrıca Mustafa HAMZA MAWLOOD, Enes GÜLMEZ ve laboratuvarımızdaki diğer bütün değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana Türkiye'de Yüksek Lisans eğitimimi gerçekleştirme fırsatı veren, maddi desteklerinin yanında her zaman yanımda olan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığına (YTB)'na ve tez çalışmalarımı yürütebilmem için maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca yüksek lisans boyunca bana koşulsuz maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, hep yanımda olan arkadaşlarıma ve özellikle Edris NASERİ'ye ayrıca teşekkür ederim.

Bugüne kadar edindiğim eğitim ve öğretim hayatım boyunca her konuda maddi ve manevi destek sağlayan, beni cesaretlendiren, beni bugünlere getiren, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli aileme ve özellikle annem Salwa, babam Lotfi, ablam Asma, kardeşim Wiem ve bütün kardeşlerime sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kenevir Bitkisi ve Genel Özellikleri.....	1
1.2. Kenevir Bitkisinde Bulunan Kannabinoidler	5
1.2.1. Kannabidiol (CBD)	7
1.2.2. Delta-9-tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC)	8
1.2.3. Delta-8-tetrahidrokannabinol (Δ^8 -THC)	9
1.2.4. Kannabinol (CBN)	10
1.2.5. Kannabikromen (CBCR).....	11
1.2.6. Kannabigerol (CBG)	12
1.2.7. Kannabidivarin (CBDV)	13
1.3. Kannabinoidlerin Ekstraksiyon Yöntemleri.....	13
1.3.1. Dinamik maserasyon (DM).....	14
1.3.2. Ultrason destekli ekstraksiyon tekniği (UAE)	14
1.3.3. Zeytinyağı ekstraksiyon tekniği	15
1.3.4. Süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu tekniği (SFE).....	15
1.4. Kannabinoidlerin Tanımlama Yöntemleri	16
1.4.1. HPLC	16
1.5. Yöntem Geliştirme Çalışmaları.....	18
1.5.1. Doğruluk	19
1.5.2. Kesinlik	20
1.5.3. Seçicilik.....	21
1.5.4. Tespit sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ).....	21
1.5.5. Doğrusallık.....	22
1.5.6. Sağlamlık	22

2.	KAYNAK TARAMASI	23
3.	MATERYAL VE METOT	29
3.1.	Kullanılan Bitki Materyali	29
3.2.	Kullanılan Materyaller	30
3.3.	Deneylede Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.4.	Örneklerin Hazırlanması	33
3.5.	Örneklerin Dekarboksile Edilmesi	33
3.6.	Örneklerden Majör Kannabinoidlerin Ekstrakte Edilmesi.....	35
3.6.1.	Dinamik maserasyon.....	35
3.6.2.	Ultrason destekli ekstraksiyon tekniği	37
3.6.3.	Zeytinyağı ekstraksiyon tekniği	41
3.6.4.	Süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu tekniği	43
3.7.	Örneklerindeki Majör Kannabinoid Düzeylerinin Belirlenmesi.....	44
3.8.	Yöntem Doğrulama Çalışmaları	45
3.8.1.	Doğruluk	45
3.8.2.	Kesinlik	45
3.8.3.	Seçicilik.....	46
3.8.4.	Tespit sınırı ve ölçüm sınırı (LOD ve LOQ).....	46
3.8.5.	Doğrusallık	46
3.8.6.	Sağlamlık	46
3.9.	İstatistiksel Değerlendirme.....	46
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1.	HPLC Parametrelerinin Optimizasyonu	47
4.2.	Dekarboksilasyon Koşullarının Optimizasyonu	51
4.3.	Kannabinoid Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	53
4.3.1.	Dinamik maserasyon tekniği.....	53
4.3.2.	Ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) tekniği	59
4.3.3.	Zeytinyağı ekstraksiyon tekniği.....	61
4.3.4.	Süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu (SFE) tekniği.....	62
5.	SONUÇLAR.....	65
6.	KAYNAKLAR	67
	ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kenevir’da bulunan majör kannabinoidlerin tanımlanmasına yönelik HPLC yöntem geliştirilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

14/07/2021

Mariem BOUALİ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	: mikrolitre
dk	: dakika
g	: gram
Kg	: kilogram
L	: litre
M	: molar
mg	: miligram
mL	: mililitre
mM	: milimolar
n	: örnek sayısı
$^{\circ}\text{C}$	: santigrat
rpm	: dakikadaki devir sayısı
sn	: saniye
X	: ilgilenilen örnek
$\bar{x}$	: örneğe ait verilerin ortalaması

Kısaltmalar

%RSD	: yüzde bağıl standart sapma
r^2	: regresyon katsayısı
ACN	: asetonitril
<i>Cannabis spp</i>	: <i>Cannabis</i> türleri
CBCR	: kannabikromen
CBD	: kannabidiol

CBDV	: kannabidivarin
CBG	: kannabigerol
CBN	: kannabinol
CH ₃ COOH	: asetik asit
CHCl ₃	: chloroform
ddH ₂ O	: ultra saf su
DM	: dinamik maserasyon
EtOH	: etanol
GC	: gaz kromatografisi
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İs	: izomerizasyon
LC	: likit kromatografisi
LOD	: tespit sınırı
LOQ	: ölçüm sınırı
MAE	: mikrodalga destekli ekstraksiyon
MeOH	: metanol
MS	: kütle spektrometrisi
Ox	: oksidasyon
R	: korelasyon katsayısı
SD	: standart sapma
SFE	: süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyon tekniği
Sig	: signifikant değeri
UAE	: ultrason destekli ekstraksiyon
Δ	: ısıtma
Δ8-THC	: delta-8-tetrahidrokannabinol
Δ9-THC	: delta-9-tetrahidrokannabinol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kenevir bitkisinin endüstriyel açıdan önemli böümleri ve kullanım alanları...	1
Şekil 1.2. Kenevir bitkisinin morfolojisi	2
Şekil 1.3. Proje kapsamında yetiştirilen Kenevir bitkilerinin görünüşü	3
Şekil 1.4. Türkiye’de izin verilen kenevir ekim alanları	4
Şekil 1.5. Dekarboksilasyon reaksiyon şeması	6
Şekil 1.6. Kenevirde bulunan ana kannabinoidlerin kimyasal yapıları	6
Şekil 1.7. SFE sisteminin akış şeması.....	15
Şekil 1.8. HPLC cihazı şematik gösterimi	17
Şekil 1.9. Kromatogram örneği.....	18
Şekil 2.1. Kenevir bitkisinin çiçek kısımlarındaki biyoaktif bileşiklere ait kromatografik analiz sonuçları.....	23
Şekil 2.2. Kenevir bitkisinde kannabinoidlerin bulunduğu kısımları	23
Şekil 2.3. Kenevir numunelerinin çiçek kısımlarında psikoaktif olmayan aktif maddelerin ekstrakte ve analiz edilmesinden bazı aşmalar.....	24
Şekil 2.4. Kenevir etanolik özütlerinin GC - FID analizi yoluyla elde edilen kromatogramları.....	24
Şekil 2.5. HPLC-DAD yöntemi kullanılarak kenevir bitkisinde bulunan Δ^9 -THC, THCA, CBD, CBDA ve CBN molekülerin kromatogramı.....	25
Şekil 2.6. Kenevirden kannabinoidlerin UAE tekniği ile ekstraksiyonunun RSM ile optimize edilmesi	26
Şekil 2.7. Kannabinoidlere ait pikler ve çıkış süreleri	26
Şekil 2.8. Kenevir örneklerinde kannabinoidlerin LC- DAD-MS/MS yöntemiyle analiz edilmesini gösterir grafik	27
Şekil 2.9. Zeytinyağı ve etil alkol ekstraktlarında terpen ve kannabinoid konsantrasyonunun yarı kantitatif analizi	27
Şekil 2.10. Standart kannabinoid karışımının temsili kromatogramı	28
Şekil 3.1. Denemeler kapsamında kullanılan kenevir tohumları	29
Şekil 3.2. Kenevir tohumları kullanılarak üretilen fideler	29

Şekil 3.3. Sera koşullarında yetiştirilen kenevir bitkileri.....	30
Şekil 3.4. Kenevir bitkisinden numune alma işlemleri ve alınan kısımları	30
Şekil 3.5. Laboratuvara ulaştırılan kenevir numunelerinin örnek hazırlama aşamaları .	33
Şekil 3.6. Numunelere uygulanan dekarboksilasyon işlemlerine ait bir görsel	34
Şekil 3.7. DM tekniğinin farklı aşamalarına yönelik görseller.....	37
Şekil 3.8. Ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilen UAE için işlem aşamaları.....	39
Şekil 3.9. Ultrasonik prob kullanılarak gerçekleştirilen UAE için işlem aşamaları	41
Şekil 3.10. Zeytinyağı ekstraksiyon tekniğinin işlemleri.....	43
Şekil 3.11. SFE cihazı ve numunenin ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt.	44
Şekil 4.1. Kannabinoidlere ait kalibrasyon grafikleri	48
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kannabinoid içeren standartlara ait kromatogramlar	50
Şekil 4.3. Kenevir bitkisi örneklerinden elde edilen bazı HPLC kromatogramları	50
Şekil 4.4. Dekarboksilasyon işlemi sonucunda numunelerdeki CBD ve CBDA değişimine ait yanıt yüzey grafikleri.....	52
Şekil 4.5. Kenevir bitkisi örneğin dekarboksilasyon öncesi ve sonrası kannabinoid değişimi (n=10)	52
Şekil 4.6. Etanol çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri.....	53
Şekil 4.7. Aseton çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri	54
Şekil 4.8. n-hekzan çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri	54
Şekil 4.9. Asetonitril çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri	55
Şekil 4.10. Metanol çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri	55
Şekil 4.11. Ekstrakte edilebilen CBD konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri	56
Şekil 4.12. Ekstrakte edilebilen CBDA konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri	57

Şekil 4.13. Ekstrakte edilebilen CBG konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri	57
Şekil 4.14. Ekstrakte edilebilen CBGA konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri	57
Şekil 4.15. Ekstrakte edilebilen CBN konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri	58
Şekil 4.16. Ekstrakte edilebilen Δ^9 -THC konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri	58
Şekil 4.17. Ekstrakte edilebilen CBDV konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri	58
Şekil 4.18. Ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafiği.....	60
Şekil 4.19. Ultrasonik prob ekstraksiyonun koşullarının 3-D yanıt yüzey planı	61
Şekil 4.20. Zeytinyağı ekstraksiyonun koşullarının 3-D yanıt yüzey planı	62
Şekil 4.21. SFE çalışması sonucu elde edilen ve incelenen hammadde, ekstrakt ve atık maddelerde kannabinoid dağılımını gösteren grafik	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. CBD'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	7
Çizelge 1.2. Δ9-THC'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	8
Çizelge 1.3. Δ8-THC'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	10
Çizelge 1.4. CBN'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	10
Çizelge 1.9. Analit konsantrasyonuna bağlı olarak olması gereken geri kazanım oranları ve tekrarlanabilirlik kesinliği %RSD.....	21
Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan kenevir bitkisinin genotiplerine ait bazı özellikler	29
Çizelge 3.2. Deneylerde kullanılan materyaller.....	31
Çizelge 3.3. Denemeler kapsamında kullanılan alet ve ekipmanlar	31
Çizelge 3.4. Tez kapsamında kullanılan kannabinoid analitik standartları	32
Çizelge 3.5. Dekarboksilasyon işlemine ait deneme planı	34
Çizelge 3.6. DM tekniğine yönelik istatistiksel deneme planı	35
Çizelge 3.7. Ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilen UAE için deneme planı	38
Çizelge 3.8. Ultrasonik prob kullanılarak gerçekleştirilen UAE için deneme planı.....	39
Çizelge 3.9. Zeytinyağı ekstraksiyonu için deneme planı	42
Çizelge 3.10. SFE çalışmaları deneme planlaması	44
Çizelge 3.11. HPLC cihazı analitik koşulları.....	45
Çizelge 4.1. Kannabinoidlere ait bazı yöntem doğrulama bulguları	49
Çizelge 4.2. Yanıt yüzey yöntemine göre belirlenen en uygun dekarboksilasyon çalışma koşulları.....	52
Çizelge 4.3. Farklı çözücüler kullanılarak maximum CBD ekstraksiyonu için en uygun şartlar.....	56
Çizelge 4.4. Ultrasonik banyo kullanılarak maximum kannabinoid ekstraksiyonu için şartlar.....	60
Çizelge 4.5. Ultrasonik prob ekstraksiyon teknikte maximum CBD verimi için şartlar	61
Çizelge 4.6. Zeytinyağı ekstraksiyon teknikte maximum CBD verimi için şartlar	62
Çizelge 4.7. Uygulanan SFE koşulları.....	63

Çizelge 4.8. SFE'un sonucu kannabinoid profilindeki değişim	63
--	----

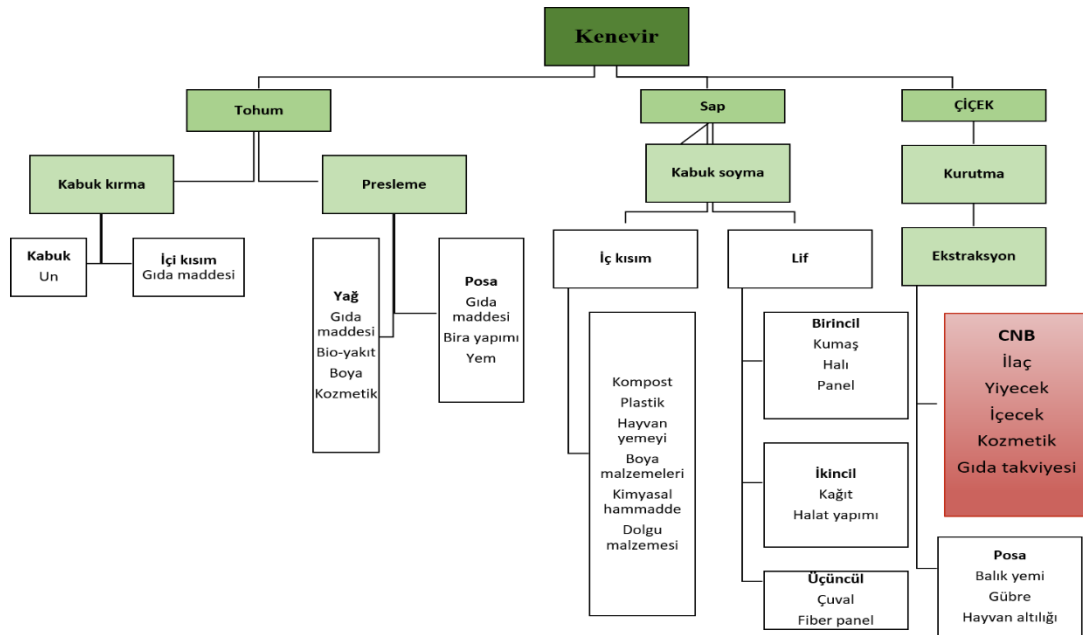


1. GİRİŞ

1.1. Kenevir Bitkisi ve Genel Özellikleri

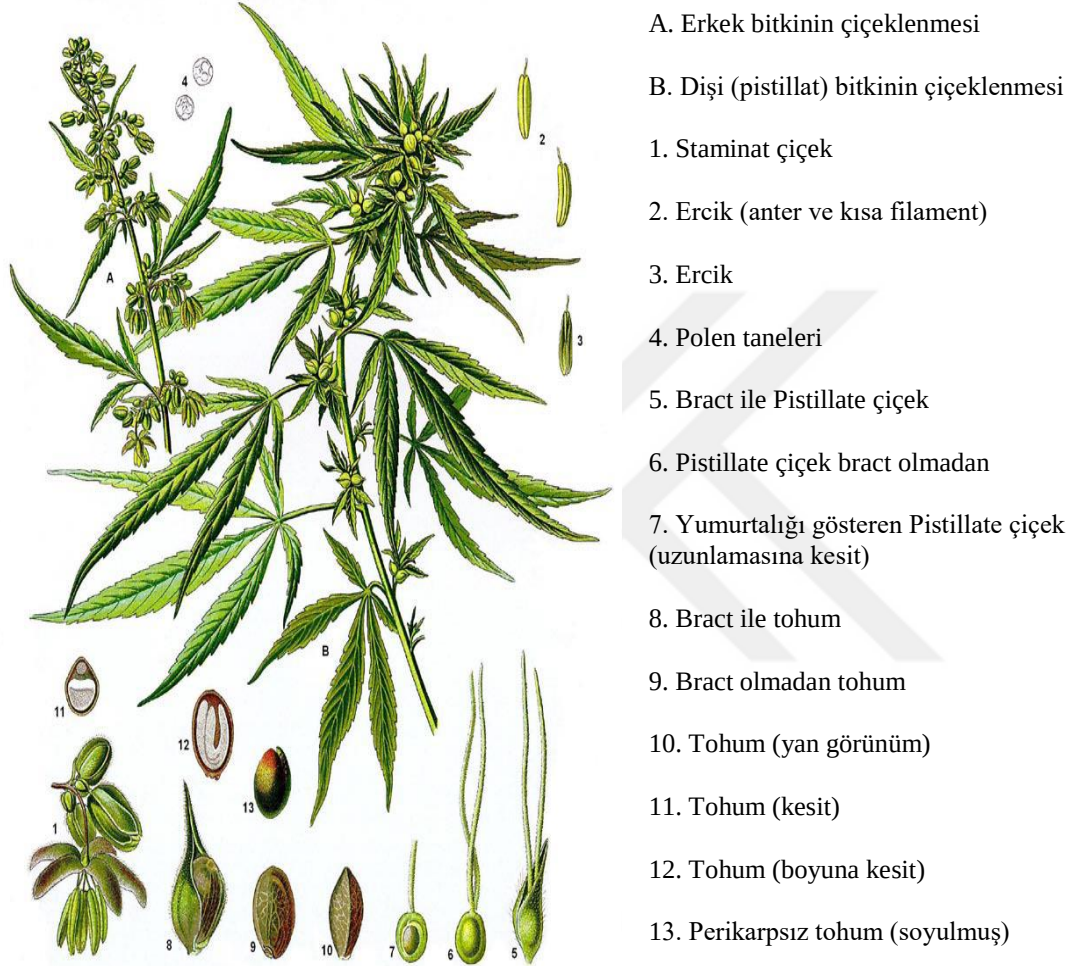
Yaklaşık olarak 5000 yıldır yetiştirildiği bilinen kenevir bitkisinin anavatanı Orta Kuzeydoğu Asya olarak kayıtlara geçmektedir. Ülkemizde yörelere göre kendir, çetene, kendirik ve kınnap çeşitli isimlerle anılan (Şahin, G. vd. 2019) bu bitki içeriğindeki lifler sayesinde; ip, kumaş, kağıt üretiminde ve ayrıca tekstil, kozmetik, biyoteknoloji, ilaç ve gıda endüstrilerinde kullanılmakta olup, içeriğinde bulunan yararlı maddelerin yanı sıra uyuşturucu niteliğine sahip bazı maddeleri de içermesi nedeni ile toplumumuzda en tartışmalı bitkilerden birisi olarak kabul edilmektedir (Attard, Bainier vd. 2018; Cai, Yu vd. 2019). Dünya çapında çok sayıda hasta tarafından kanser ve AIDS'ten multipl skleroz ve migrene kadar pekçok hastalığın semptomlarını iyileştirmek için kullanıldığı bildirilmektedir (Haze Kamp 2007; Teräsvalli 2020). Bununla birlikte bileşiminde bulunan kannabinoidler glokom ve şizofreni gibi rahatsızlıkların tedavisinde ve özellikle antiepileptik, antikanserojenik ve kanser ağrıları gibi kemoterapi sırasında meydana gelen komplikasyonların giderilmesinde de kullanıldığı pek çok bilimsel çalışmaya konu olmuştur (Guzman 2003; Alexander 2016).

Cannabis, *Cannabaceae* familyasına ait bir cins olarak bilinmektedir. Evrimsel olarak *Cannabis*, yüksek lif oranı içeren *Cannabis sativa* L., psikoaktif bileşikleri yüksek oranda içeren *Cannabis Indica* Lam. ve ara özelliklere sahip olan *Canabis ruderalis* Janisch olmak üzere üç ana türe ayrılmış bulunmaktadır. (Brighenti, Pellati vd. 2017; Teräsvalli 2020). Bu türler arasında, düşük seviyelerde psikoaktif bileşen ve yüksek seviyelerde lif, tohum ve kannabidiol (CBD) üretebilme potansiyeline sahip olan *Cannabis sativa*, yetiştirilme kolaylığı, hastalık direnci ve verim gibi etmenlerle üzerinde sıkça durulan önemli bir bitki türüdür (Hartsel, Eades vd. 2016). Şekil 1.1’de bu bitkinin endüstriyel açıdan önemli bölümleri ve kullanım alanları sunulmaktadır.



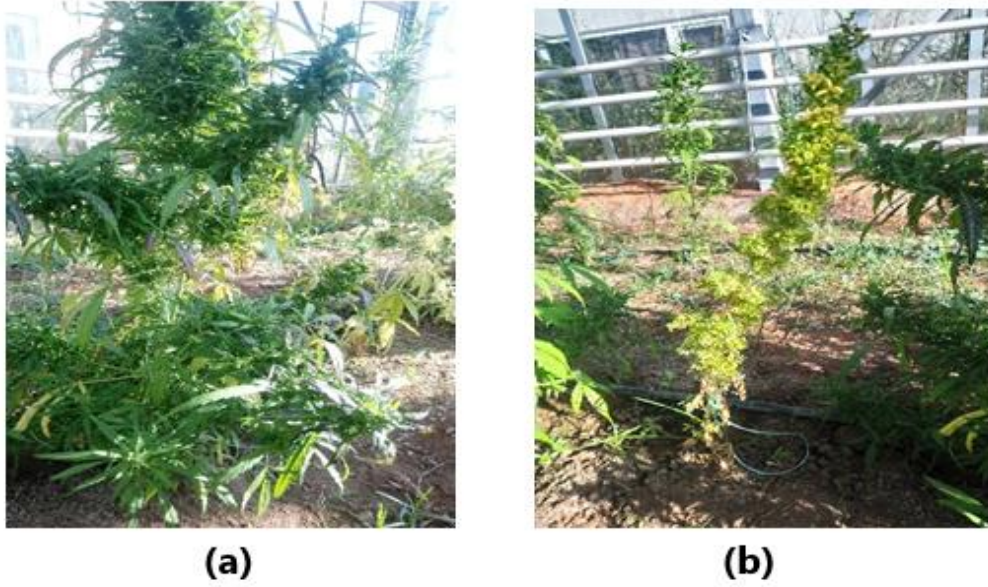
Şekil 1.1. Kenevir bitkisinin endüstriyel açıdan önemli bölümleri ve kullanım alanları (BAŞER ve BOZOĞLU 2020)

Kenevir $2n:20$ kromozoma sahip olup tek yıllık, genellikle çift evcikli (erkek ve dişinin genellikle ayrı bir bitki) çiçek açan bir bitkidir. Dişi bireylerde çiçek salkımları sık demetler halinde ve yeşil görünümlü olup, çevresel şartlara daha dayanıklıdır. Erkek bitkilerde ise çiçek salkımları seyrek, sarımsı, yeşilimsiye görünümlü ve dişilere göre daha uzun boylu ancak daha az dayanıklıdır (Tettey 2009). Şekil 1.2.'de Kenevir bitkisinin morfolojik özellikleri sunulmaktadır.



Şekil 1.2. Kenevir bitkisinin morfolojisi (Tettey 2009)

Kenevir bitkisinin gövde kısımları dik olup ekim yönteminin yanı sıra çevresel ve kalıtsal faktörlere bağlı olarak 0,20 ila 6 m arasında değişebilmektedir. Kenevir, iyi derecede su tutma kapasitesine sahip olup alkali killi ve tınlı topraklarda en iyi bir şekilde yetişebilmektedir (Tettey 2009).



Şekil 1.3. Proje kapsamında yetiştirilen Kenevir bitkilerinin görünüşü **a)** Dişi Kenevir bitkisi; **b)** Erkek Kenevir bitkisi

Kenevirin içeriğinde terpenoidler, şekerler, alkaloidler, stilbenoidler, kinonlar ve kannabinoidleri barındırmaktadır. Bugüne kadar bileşiminde yaklaşık 120’den fazla kannabinoid olmak üzere 565 kimyasal bileşik tanımlanmıştır (Chandra, Lata vd. 2017). Kenevir bünyesinde bulunan ana kannabinoidler konsantrasyon değerlerine bağlı olarak beş kemotipik nitelikte tanımlanmaktadır:

- Kemotip I, tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC) tipi kannabinoidlerin yüksek olduğu uyuşturucu sınıfına dahil olan bitkilerden oluşur.
- Kemotip II, uyuşturucu madde içeren ve belirli miktarlarda lif barındıran bitkileri içerir.
- Kemotip III, çok yüksek miktarlarda lif içeriği ve psikoaktif olmayan molekülleri içerirken psikoaktif olarak tanımlanan bileşikleri düşük miktarlarda bulunduran bitkilerdir.
- Kemotip IV, sadece kannabinoid olarak kannabigerolik asit (CBGA) içeren bitkileri ifade eder.
- Kemotip V, neredeyse hiç kannabinoid içermeyen ve lif oranı yüksek olan bitkilerden oluşur (Pellati, Borgonetti vd. 2018).

Yukarıda belirtilen kemotipik sınıflandırmaya ilave olarak Kenevir türleri bileşimlerindeki kannabinoidlerden CBD, kannabinol (CBN) ve Δ^9 -THC’ün oranına göre de sınıflandırılarak medikal ya da endüstriyel kullanıma sunulmaktadır. Bu amaçla, uygun şartlarda üretilen türlerin uç kısımlarından örnekler alınarak uygun ortamlarda belirlenen sıcaklık ve nem oranına göre kurutulduktan sonra Δ^9 -THC, CBD ve CBN yönünden analize alınmaktadır (Tetty 2009; Pellati, Borgonetti vd. 2018). Elde edilen sonuçlara göre, kenevir bitkisi aşağıda belirtildiği şekliyle iki gruba sınıflandırılmaktadır:

- Psikoaktif veya tıbbi türü: Psikoaktif $\Delta 9$ -THC açısından zengin, " $(\Delta 9\text{-THC} + \text{CBN}) / [\text{CBD}]$ " oranı > 1 . Tıbbi veya uyuşturucu amaçlı kullanılır.
- Lif türü veya endüstriyel kenevir: CBD veya ilgili bileşikler açısından zengin ve neredeyse $\Delta 9$ -THC içermeyen " $(\Delta 9\text{-THC} + \text{CBN}) / [\text{CBD}]$ " nin oranı < 1 ". Tohumları ve lifleri için yetiştirilirler, genellikle tekstil veya gıda amaçlı kullanılmaktadır (Tettey 2009; Pellati, Borgonetti vd. 2018).

Kenevir bitkisi çeşitli alanlarda kullanılmasına rağmen en yaygın kullanım alanının uyuşturucu üretimi olduğu bildirilmiştir. Türkiye’de ise en yaygın kullanılan uyuşturucu türü esrardır. Bu nedenle kenevir ekimi birçok ülkede kanunlar ile sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (BAŞER ve BOZOĞLU 2020).

Avrupa ülkelerinin çoğunda, kenevir bitkisini yetiştirmek için mevcut yasal üst sınır %0,20 oranında $\Delta 9$ -THC ve Amerika’da ise %0,30 oranında $\Delta 9$ -THC olarak kabul edilmektedir (Teräsvalli 2020). Türkiye’de ise kenevir ekimi tamamen devlet kontrolü altındadır. 2313 sayılı “uyuşturucu maddelerinin murakabesi hakkındaki kanunun” 3. maddesinde “Münhasıran esrar yapmak için kenevir ekilmesi ve her ne şekilde olursa olsun esrarın ihzar, ithal, ihraç ve satışı yasaktır” şeklinde belirtildiği üzere esrar elde etmek amacıyla kenevir ekimi kesinlikle yasaklanmış olup aynı kanunun 23. maddesinde ise her ne amaçla olursa olsun kenevir ekiminin Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının iznine bağlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca 29 Eylül 2016 tarihli ve 29842 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan “Kenevir Yetiştiriciliği ve Kontrolü Hakkında Yönetmelik” yürürlükte olup bu yönetmelikte kenevir üretimine izin verilen 19 il Şekil 4’te gösterilmiştir (BAŞER ve BOZOĞLU 2020).



Şekil 1.4. Türkiye’de izin verilen kenevir ekim alanları (BAŞER ve BOZOĞLU 2020)

İlgili yönetmelik hükümlerine göre, yukarıda belirtilen illerde faaliyet gösteren çiftçiler kenevir bitkisinden lif, tohum, sap ve benzeri amaçlara yönelik yetiştiricilik için Tarım İl veya İlçe Müdürlükleri’ne gerekli evraklarla başvuru yapabilmekte ve incelemeler neticesinde kendilerine bir ekim dönemi izin verilebilmektedir. Bununla birlikte bilimsel araştırmaya yönelik kenevir yetiştiriciliği yapmak isteyen aratırmacılar ise yetiştiricilik yapacakları ilin en büyük mülki idare amirliğine gerekli belgelerle müracat etmekte ve uygun bulunmalarına müteakip kendilerine üç yıl müsaade edilebilmektedir.

1.2. Kenevir Bitkisinde Bulunan Kannabinoidler

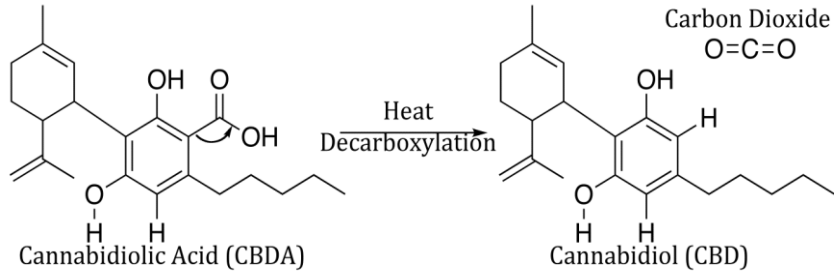
Kenevir diğer bütün bitkilerde olduğu gibi içeriğinde; terpenler, fenolik bileşikler, alkaloidler gibi moleküllerin yanı sıra sadece kenevire özgü olan kannabinoidleri içermektedir. Belirtilen kannabinoidlerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olduğunun tespit edilmesinin ardından tüm dünyada akademik ve endüstriyel çalışmaların odağı haline geldiği gibi ülkemizde de bu bitkiye olan büyük bir ilgi uyanmış ve akabinde bu konuda bir takım yasal düzenlemeler yapılarak bilimsel araştırmalar yapmak üzere bu bitkinin kullanımının önü açılmıştır.

Kenevir bitkisinde psikoaktif ve non-psikoaktif olmak üzere 100'den fazla kannabinoid tanımlanmaktadır. Bu aktif maddeler tipik olarak C21 ya da C22 iskeleti üzerinde kurulan bileşikler grubuna dahil olarak tanımlanır ve karboksilik asitleri, analogları ve transformasyon ürünleri dahil olmak üzere sadece kenevirde bulunmaktadır (Pellati, Borgonetti vd. 2018).

Kannabinoidler meroterpenoid sınıfına dahil olup kısaca bir alkil resorsinolün (benzen-1,3-diol) bir monoterpen ünitesi ile alkilasyonu sonucu ve özellikle de bitkinin dişi çiçek salkımlarında daha bol olan trikomal tarafından üretilmektedirler (Andre, Hausman vd. 2016; Pellati, Borgonetti vd. 2018). Bitkide 100'ün üzerinde kannabinoid tanımlanmasına rağmen konsantrasyon ve önem açısından ön plana çıkanları Δ^9 -THC, CBD, CBN, kannabikromen (CBCR), kannabigerol (CBG), kannabidiolik asit (CBDA), kannabidivarin (CBDV) ve tetrahidrokanabivarin (THCV)'dir (Hazekamp 2007; Pisanti, Malfitano vd. 2017).

Özellikle medikal kullanım için önemli olan nötr kannabinoidler (Δ^9 -THC, CBD, CBG, CBN ve CBCR gibi), kenevir bitkisinde doğal olarak sentezlenememekte olup bitkide bu kannabinoidlerin asidik formları (THCA, CBDA, CBGA, CBNA ve CBCRA) sentezlenebilmektedir. Kannabinoid asitler içerisinde bulunan karboksil grubu çok sabit değildir ve ısı veya ışığın etkisi altında CO_2 'e dönüşerek ortamdan uzaklaşır ve dekarboksilasyon olarak tanımlanan kimyasal bir reaksiyona uğrayarak ilgili nötr kannabinoidlerin oluşumuna yol açmaktadır. (De Backer, Debrus vd. 2009).

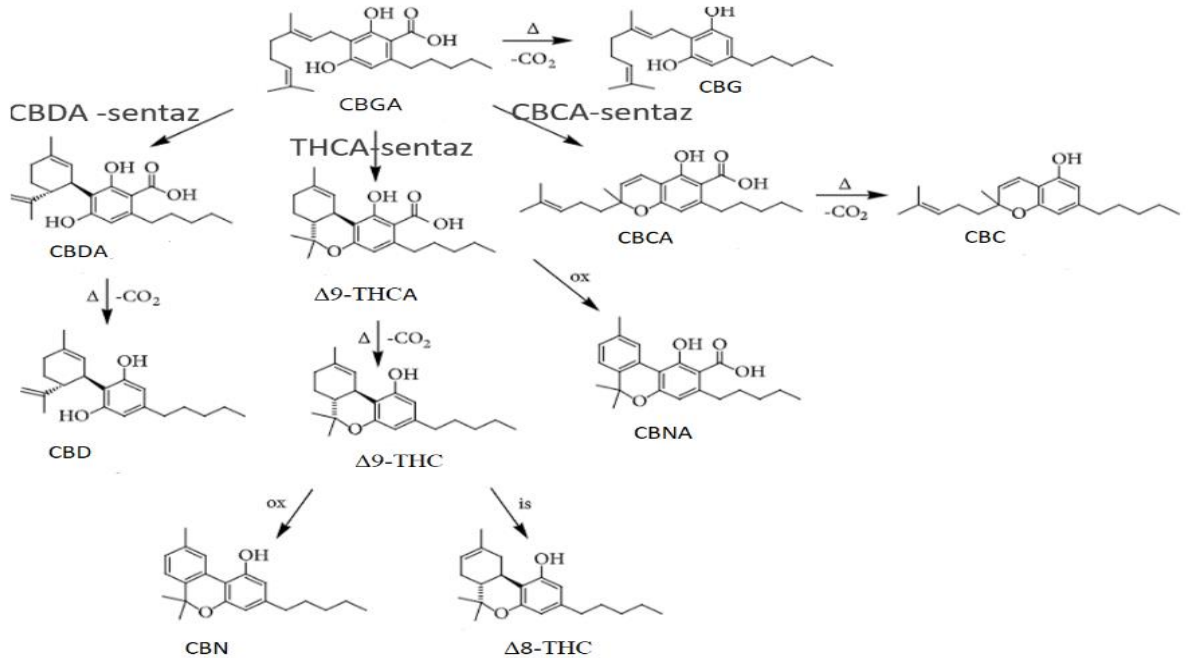
Dekarboksilasyon reaksiyonu, bir karbon zincirinden bir karbon atomunun uzaklaştırılması suretiyle meydana gelmektedir. Kenevir bitkisinde bulunan asidik formlardaki kannabinoidlerin bu reaksiyon yardımıyla daha faydalı nötr kannabinoidlere dönüştürülmesi gerekmektedir (Perrotin-Brunel 2011). Kannabinoidlere ait asit formlarının dekarboksilasyonu için birkaç yöntem bildirilmekle birlikte en basit ve uygulanabilir mekanizma numunenin ısıtılmasıdır. Diğer dekarboksilasyon işlemlerinde ise bir takım toksik çözücüler gerektirmekte olup ekonomiklik ve toksisite açısından dezavantajlara sahiptir. Dekarboksilasyon reaksiyon şeması Şekil 1.5'te sunulmaktadır (Kotra, Lewis vd.. 2018).



Şekil 1.5. Dekarboksilasyon reaksiyon şeması

Ekstraksiyon ve dekarboksilasyon, etilen glükol, izopropanol veya benzer çözücülerin bir kombinasyonu ile tek bir adımda yapılabilir. Ayrıca, ısıtma veya kimyasal çözücüler kullanılarak ekstraksiyondan önce bitkiye bir dekarboksilasyon işlemi uygulanabilir veya ekstraksiyondan sonra elde edilen ekstrakta dekarboksilasyon gerçekleştirilebilmektedir (Kotra, Lewis vd. 2018).

Yapılan deneylerde, $\Delta 9$ -THC 'ün öncü bileşiği olan tetrahidrokannabinolik asidin (THCA) aslında kannabigerolik asitten (CBGA) THCA-sentaz enzimi tarafından, oksidosiklizasyon yoluyla oluştuğuna dair kanıtlar sunulmaktadır. CBGA, CBDA-sentaz, CBCRA-sentaz ve THCA-sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla sırasıyla CBDA, kannabikromenik asit (CBCRA) ve THCA meydana gelmektedir (Taura, Morimoto vd. 1996; Fellermeier, Eisenreich vd. 2001; Raharjo, Chang vd. 2004). CBN THCA'nin bir bozulma ürünüdür ve THCA'nin oksidasyon yoluyla oluştuğu bilinmektedir (Brighenti, Pellati vd. 2017).



Şekil 1.6. Kenevirde bulunan ana kannabinoidlerin kimyasal yapıları (Pellati, Borgonetti vd. 2018)

Yukarıda verilen bilgiler ışığında akademik ve endüstriyel anlamda ön plana çıkan kannabinoidler ve temel özellikleri aşağıda başlıklar altında sunulmaktadır:

1.2.1. Kannabidiol (CBD)

Farmasötik açıdan incelendiğinde CBD, kenevirde bulunan en değerli bileşik konumundadır ve ayrıca endüstriyel olarak üretilen kenevirde da baskın olarak bulunan kannabinoiddir. CBD anti-enflamatuar, analjezik, antioksidan, antimikrobiyal, nöroprotektif (nöron korunması) ve antikonvülsan (epilepsi nöbetleri, nöropatik ağrı, bipolar bozukluk gibi durumlar) özellikler sergilemektedir (Appendino, Chianese vd. 2011; Thomas and Elsohly 2015). CBD'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.1.'de sunulmaktadır.

Çizelge 1.1. CBD'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (ChemicalBook 2019; PubChem 2019)

Molekül formülü	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
Kimyasal isimleri	Cannabidiol, (-)-Cannabidiol, (-)-trans-Cannabidiol, CBD
Molekül ağırlığı	314,46 g/mol
CAS No	13956-29-1
Erime noktası	62-63 °C
Kaynama noktası	187-190 °C
Depolama sıcaklığı	2-8 °C
Yoğunluk	1,04
Refraktif indeks değeri	1,54

CBD CB1 ve CB2 reseptörlerine kayda değer bir afiniteyle bağlamaması nedeni ile Δ9-THC'ün aksine psikoaktif bir etki meydana getirmemektedir (Carcieri, Tomasello vd. 2018). Psikoaktif etkinliğinin bulunmamasından dolayı CBD; multipl skleroz, artrit, şizofreni ve kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda ayrıca otoimmün, inflammatuar ve nörodejeneratif hastalıklarda olumlu farmakolojik etkiler gösteren ve güvenle kullanılabilen en önemli bileşiklerden biridir. Özellikle epilepsi hastalığının tedavisinde sentetik kimyasallara karşı alternatif bir etken madde olarak gündeme gelmektedir (Pellati vd. 2018; Namdar vd. 2018).

CBD'ün yan etkileri konusunda yapılan çalışmalarda kan basıncı, nabız, vücut sıcaklığı, gastrointestinal geçiş, psikomotor ve bilişsel bozukluklara yol açmadığı bununla birlikte hiçbir organda his kaybı (katalepsi) etkisi göstermediği bildirilmektedir (EIHA 2017). Çeşitli çalışmalara göre CBD insanlarda yüksek dozlarda ve uzun süreler boyunca iyi düzeyde tolere edilebildiği ve bu nedenle güvenli bir madde olduğu sonucuna varılmaktadır (Machado Bergamaschi, Helena Costa Queiroz vd. 2011).

Öte yandan, diğer antioksidanlar gibi CBD'ün in vitro ve in vivo çalışmalarında, ilaç metabolizması, sitotoksisite ve azalmış reseptör aktivasyonu ile olası etkileşimleri ortaya çıkarılmıştır. Bu bilgiler ışığında özellikle CBD klinik uygulamalarda kullanıldığında insanların CBD'ü dikkatli bir şekilde kullanmalarının gerektiği sonucuna varılmaktadır (Machado Bergamaschi, Helena Costa Queiroz vd. 2011).

CBD'ün bitkide oluşması CBDA ile ilişkilendirilmektedir. CBGA molekülünden CBDA-sentaz ile meydana gelen CBDA kenevir bitkisinde majör olarak karşımızda çıkan kannabinoidlerinden birisidir. Bu molekülün belirli sıcaklık (105°C'den daha yüksek) ve ışığa maruz kalması durumunda CBD'ye dönüştüğü bildirilmiştir (Cardenia, Toschi vd. 2018).

Bitkide CBD'ün prekürsörü konumunda olan CBDA'nin mide bulantısını engellediği ve antimikrobiyal özelliklerinin (Brighenti, Pellati vd. 2017) yanı sıra, hayvan modellerinde anksiyolitik (kaygı ve korku giderici), antiinflamatuvar ve antihiperalezik (Ağrıya aşırı duyarlı olma) etkilerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Anderson, Low vd. 2019). Çocukluk çağında hiperaktivite nedeniyle aşırı hareketli olan çocukların sakinleştirilmesinde geleneksel yöntemlerle elde edilen kenevir bitkisinin yağı halen kullanılmaktadır. Buradan yola çıkılarak elde edilen bu yağın içeriğinde fitokannabinoidlerin olması ve özellikle CBDA'nin bu yağın içinde majör olarak bulunmasından dolayı bilimsel verilerle desteklenmemesine rağmen potansiyel antisedatif ve antiepileptik etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (Suraev, Lintzeris vd. 2018).

1.2.2. Delta-9-tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC)

Δ^9 -THC, algı ve duyu durumunda değişiklikler yapan, öfori ve rahatlama duygularına neden olan, psikoaktif etkisi yanında, analjezik (akut ve kronik sendromlarda ağrı kontrolü sağlayan), anti-enflamatuvar, iştah açıcı ve anti-emetik (kusma sinir merkezlerini etkileyen) özelliklere sahip; aynı zamanda çok düşük dozlarda bilişsel bozukluklardan koruyan bir kannabinoiddir (Aizpurua-Olaizola, Omar vd. 2014). Δ^9 -THC'ün sahip olduğu temel fiziko-kimyasal nitelikler Çizelge 1.2.'de sunulmaktadır.

Çizelge 1.2. Δ^9 -THC'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (ChemicalBook 2019; PubChem 2019)

Molekül formülü	$C_{21}H_{30}O_2$
Kimyasal isimleri	Dronabinol, TETRAHYDROCANNABINOL, Marinol, delta9-Tetrahydrocannabinol, delta9-THC, THC
Molekül ağırlığı	314,50 g/mol
CAS No	1972-08-3
Erime noktası	<25 °C
Kaynama noktası	200 °C

Çizelge 1.2'nin devamı

Depolama sıcaklığı	2-8 °C
Yoğunluk	1,05
Refraktif indeks değeri	1,54

$\Delta 9$ -THC memelilerin beyin ve bağışıklık hücrelerinde bulunan kannabinoid reseptörleri olan CB1 ve CB2 aracılığıyla çeşitli terapötik aktivitelere neden olmakta ve ayrıca CB1 reseptörüyle bağlanan $\Delta 9$ -THC psikoaktif etkilerin meydana gelmesine yol açmaktadır (Taura, Sirikantaramas vd. 2007; Carcieri, Tomasello vd. 2018).

$\Delta 9$ -THC'ün kronik tüketimi, bilişsel eksiklikler, kaygı, paranoya, kronik psikoz ve bağımlılık gibi ciddi yan etkilerle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca $\Delta 9$ -THC bilişsel olarak, insanın zaman aralıkları ile uzaysal mesafeleri, hafızayı ve uyanıklığı ayırt etme yeteneğini altüst ederek zihinsel çalışma performansını bozmaktadır. Psikişik düzeylerde $\Delta 9$ -THC, bağlantısız düşünceler, panik reaksiyonlar, algıda rahatsız edici değişiklikler, sanrılar ve halüsinasyon deneyimleri gibi hoş olmayan reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bununla birlikte, $\Delta 9$ -THC'ün uzun süreli kullanımına yönelik ruh ve biliş üzerindeki uzun vadeli etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır (Carlini 2004).

Kenevir bitkisinde THCA CBGA'den THCA-sentaz enzimi tarafından katalizli bir reaksiyonla sentezlenmektedir. Sıcaklık ve UV ışığı gibi fiziksel koşullara maruz bırakılan THCA molekülü dekarboksilasyona uğrayarak $\Delta 9$ -THC'e dönüşebilir (Cardenia, Toschi vd. 2018).

THCA'nın medikal olarak tümör nekroz faktörü alfanın (TNF-a) seviyelerini azalttığı ve bu etkiye dolaylı yünden bağlı olarak antiinflamatuvar, antikonvülzan ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Suraev, Lintzeris vd. 2018; Anderson, Low vd. 2019).

1.2.3. Delta-8-tetrahidrokannabinol ($\Delta 8$ -THC)

$\Delta 8$ -THC, $\Delta 9$ -THC'den izomerizasyon tepkimesiyle elde edilmektedir (De Backer, Debrus vd. 2009). Kenevirde $\Delta 8$ -THC az miktarlarda bulunduğu bilinmekte olup çocuklardaki psikoaktif etkisinin $\Delta 9$ -THC'e göre daha düşük seviyede olduğu bilinmektedir. Ancak $\Delta 9$ -THC'ün göstermiş olduğu uyuşturucu etkisinin $\Delta 8$ -THC'de de görüldüğü belirlenmiştir (Ashton 2001). $\Delta 8$ -THC'ün temel düzeyde bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.3'te sunulmaktadır.

Çizelge 1.3. Δ^8 -THC'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (ChemicalBook 2019; PubChem 2019)

Molekül formülü	$C_{21}H_{30}O_2$
Kimyasal isimleri	Δ^8 -THC (CRM); (-)-delta(sup8)-trans-tetrahydrocannabinol; (-)-trans-delta(sup8)-tetrahydrocannabinol; delta-8-tetrahydrocannabinol
Molekül ağırlığı	314,46 g/mol
CAS No	5957-75-5
Erime noktası	-----
Kaynama noktası	200 °C
Depolama sıcaklığı	-20 °C
Yoğunluk	1,05
Refraktif indeks değeri	1,54

1.2.4. Kannabinol (CBN)

CBN, kenevir bitkisinde Δ^9 -THC'ün oksidasyonunun sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu kannabinoid kenevirin fizyolojik olarak inaktif bir bileşeni olup immünosüpresif ve antiinflamatuvar aktivitelere sahiptir (Izzo, Borrelli vd. 2009). CBN'ün sahip olduğu bazı fiziksel ve kimyasal nitelikler Çizelge 1.4'te sunulmaktadır

Çizelge 1.4. CBN'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (ChemicalBook 2019; PubChem 2019)

Molekül formülü	$C_{21}H_{26}O_2$
Kimyasal isimleri	Cannabinol, Cannabinolo, Cannabinolum, CBN.
Molekül ağırlığı	310,43 g/mol
CAS No	521-35-7
Erime noktası	76-77°C
Kaynama noktası	185 °C
Depolama sıcaklığı	2-8 °C

Çizelge 1.4'ün devamı

Yoğunluk	1,08
Refraktif indeks değeri	1,49

1.2.5. Kannabikromen (CBCR)

CBCR genel olarak $\Delta 9$ -THC, CBD ve CBG ile birlikte kenevirin dört ana bileşeninden birisi olarak kabul edilir. Kenevirdeki CBCR konsantrasyonu aslında diğer "majör" fitokannabinoidlerden çok daha düşüktür. Kuru ağırlık bazında ortalama %0,20-0,30'ü aralığındadır. Bazı çalışmalarda "medikal" tip Kenevirde tespit edilen CBCR'in CBD'den daha yüksek düzeyde olduğu, "endüstriyel " tipi Kenevirde ise CBD'ün CBCR'ye göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Turner, Elsohly vd. 1980; Pollastro, Caprioglio vd. 2018).

CBCR'ün antibakteriyel ve anti-fungal aktivite açısından diğer önemli kannabinoidlere göre daha yüksek etkiye sahip olduğu rapor edilmektedir (Pollastro, Caprioglio vd. 2018). Ayrıca bu kannabinoidin analjezik özelliklere sahip olduğu ve $\Delta 9$ -THC'ün analjezik etkilerini güçlendirdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte heksabarbital (sakinleştirici, uyku verici ve anestezi etkili ilaç) kaynaklı hipnozün süresini uzattığı da belirlenmiştir. CBCR tek başına bradikardiyi (kalbin yavaş atması) indüklemese de $\Delta 9$ -THC'ün neden olduğu bradikardiyi güçlendirmekte olup, CBCR ve $\Delta 9$ -THC kombinasyonunun güçlü anti-enflamatuvar etkilere yol açtığı bildirilmiştir (DeLong, Wolf vd. 2010). CBCR'in fiziksel ve kimyasal bazı nitelikleri Çizelge 1.5'te sunulmaktadır.

Çizelge 1.5. CBCR'in bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (ChemicalBook 2019; PubChem 2019)

Molekül formülü	$C_{21}H_{30}O_2$
Kimyasal isimleri	CANNABICHROMENE, Cannabichrome, Pentylcannabichromene
Molekül ağırlığı	314,50 g/mol
CAS No	26638-43-7
Erime noktası	62-63 °C
Kaynama noktası	344,8±25 °C
Depolama sıcaklığı	0-6°C
Yoğunluk	1,44
Refraktif indeks değeri	----

1.2.6. Kannabigerol (CBG)

CBG, kenevirde bulunan non-psikoaktif bir fitokannabinoid olup bir resorsinol (benzen-1,3-diol) ürünü olarak bilinmektedir. İnsan vücuduna faydaları arasında; iştah artırıcılık, analjezik, anti-enflamatuar, antibakteriyel, nöroprotektif, antitümöral, anti-proliferatif, antioksidan ve reseptör agonisti (Agonist hücre reseptörlerine bağlanarak hücrede bir tepki oluşturan bileşiklerdir) gibi etkiler sayılabilmektedir (Degtyarenko, De Matos vd. 2007; Russo and Marcu 2017). Ayrıca CBG'ün sedef hastalığı ve glokom tedavisi için potansiyel etken madde olabileceği gösterilmiştir (Rock, Goodwin vd. 2011). CBG'ün sahip olduğu bir takım fiziko-kimyasal özellikler Çizelge 1.6'da sunulmaktadır.

Çizelge 1.6. CBG'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (ChemicalBook 2019; PubChem 2019)

Molekül formülü	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
Kimyasal isimleri	Cannabigerol, CBG
Molekül ağırlığı	316,50 g/mol
CAS No	25654-31-3
Erime noktası	49-50 °C
Kaynama noktası	470,40±40,00°C
Depolama sıcaklığı	-20°C
Yoğunluk	0,98±0,06 g/cm ³
Refraktif indeks değeri	----

CBG'ün bitkide bulunan asit formu CBGA'tır. Bu madde kenevir bitkisinde tüm karboksilatlanmış formda sentezlenen cannabinoidler için biyosentetik yolun başlangıç noktası konumunda olup THCA, CBDA ve CBCRA'nın doğrudan öncüsüdür (De Backer, Debrus vd. 2009).

1.2.7. Kannabidivarin (CBDV)

Kenevir bitkisinde tespit edilen $\Delta 9$ -THC veya CBD'ün fizyolojik aktivitesini modüle edebilen 100'den fazla kannabinoidten birisi olan CBDV psikoaktif olmayan bir kannabinoiddir.

CBDV asidik koşullar altında delta 9-tetrahidrokannabivarin ($\Delta 9$ -THCV)'e izomerleşir ve bitkide $\Delta 9$ -THCV'nin biyosentetik öncüsüdür. Yapılan son çalışmalar CBDV'in anti-enflamatuar etkisini ve kemik iliğinde bulunan hareketsiz mezenkimal kök hücrelerinin uyararak kemik oluşumunu ve kırık iyileşmesi üzerindeki yararlı etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır (Deiana, Watanabe vd. 2012). CBDV'in sahip olduğu bir takım fiziko-kimyasal özellikler Çizelge 1.7'de sunulmaktadır.

Çizelge 1.7. CBDV'nin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (ChemicalBook 2019; PubChem 2019)

Molekül formülü	$C_{19}H_{26}O_2$
Kimyasal isimleri	Cannabidivarin, Cannabidivarol, CBDV
Molekül ağırlığı	286,41 g/mol
CAS No	24274-48-4
Erime noktası	----
Kaynama noktası	$439,40 \pm 45$ °C
Depolama sıcaklığı	-70 °C
Yoğunluk	$1,04 \pm 0,06$ g/cm ³
Refraktif indeks değeri	----

1.3. Kannabinoidlerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Kannabinoidler kenevir bitkisinin çiçek, yaprak gövde ve tohum gibi farklı kısımlarında değişik konsantrasyonlarda bulunmakta olup farklı yöntemler kullanılarak bitkisel materyallerden ekstrakte edilebilmektedir (Pellati, Borgonetti vd. 2018).

Herhangi bir tıbbi bitki örneğinden aktif maddelerin elde edilmesi konusundaki ilk aşama ekstraksiyondur ve bu işlem üretilecek maddenin tür ve konsantrasyonu üzerinde doğrudan ve kritik bir etkiye sahiptir. Teknolojide meydana gelen ilerlemeler sayesinde detaylı, hızlı, ekonomik, uygulanabilir ve güvenilir ekstraksiyon yöntemleri ile birlikte kromatografi ve spektrometrik analiz yöntemleri gelişmiş ve böylelikle biyoaktif bileşiklerin elde edilebilmesi daha kolay hale gelmiştir. Ancak gerek ekstraksiyon gerekse analiz aşamasında uygulanan bu parametreler bitkinin genetik yapısına ve çevresel etkilere direkt olarak bağlıdır (Azmir, Zaidul vd. 2013).

Kenevir bitkisinden yapılacak olan ekstraksiyon işleminde yüksek kannabinoid verimi elde etmek için ekstraksiyon tekniğinin optimizasyonu en önemli adım olarak kabul edilmektedir. Bunu belirlerken istatistiksel verilerden yararlanarak uygun çözücü, çözücü oranı, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi gibi koşulların belirlenmesi önemlidir. Çözücü seçimi genellikle bitki materyalindeki aktif maddelerin polaritesinden etkilenir, bu durumda kannabinoidlerin polar yapısı nedeniyle metanol (MeOH) ve etanol (EtOH) gibi alkoller ve daha az polar çözücüler asetona, MeOH / CHCl₃ ve hekzan gibi uygun olan çözücüler tercih edilmektedir (Brighenti, Pellati vd. 2017; Baranauskaite, Marksas vd. 2020).

Bu kapsamda kenevir bitkisinde bulunan majör kannabinoidleri ekstrakte edilmek için kullanılan teknikler ve temel bazı özellikleri aşağıda başlıklar halinde sunulmaktadır.

1.3.1. Dinamik maserasyon (DM)

DM geleneksel bir ekstraksiyon tekniği olup uygun polaritede bir çözücü kullanılarak çalkalama ya da karıştırma şeklinde uygulanmaktadır. Çalkalama örneğinin yüzey alanındaki difüzyonu artırarak ekstraksiyonu kolaylaştırmaktadır. Bu teknik genellikle uçucu yağlar ve biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde yaygın kullanılan herhangi bir özel ekipman gerektirmemesi nedeniyle ekonomik bir yöntemdir. Ancak uzun süre ve yüksek miktarda çözücü kullanılması ve bu çözücülerin pahalı olmalarının yanında toksik ve çevresel etkileri yöntemin dezavantajlı tarafıdır (Azmir, Zaidul vd. 2013). Yöntemin uygulanmasında genel olarak farklı polaritelere sahip etanol, metanol, hekzan, asetona, asetonitril, diklorometan, su, etil asetat gibi çözücüler laboratuvar ortamında manyetik karıştırıcı, rotator ve vorteks gibi ekipmanlarla endüstriyel olarak ise sanayi tipi karıştırıcılar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Brighenti, Pellati vd. 2017; Baranauskaite, Marksas vd. 2020).

1.3.2. Ultrason destekli ekstraksiyon tekniği (UAE)

Ultrason, insan işitme düzeyinin duyulabilir üst sınırından daha yüksek frekanslara sahip ses dalgaları olarak tanımlanmaktadır. UAE, ekstraksiyonu hızlandırmak ve elde edilecek aktif madde düzeylerinin verimliliğini artırmak için ses dalgalarının kullanıldığı bir yöntemdir. Bu sayede ekstraksiyon süresi, enerji ve çözücü kullanımı geleneksel yöntemlere göre düşük seviyelere indirilebilmektedir. UAE, bitkilerden biyoaktif bileşiklerin elde etmek için verimli bir ekstraksiyon tekniği olarak kullanılmaktadır (Tadeo, Sánchez-Brunete vd. 2010).

Genellikle bu yöntemde, örneğin 20 kHz - 100 MHz arasındaki frekanslarda akustik titreşimler uygulanır. UAE mekanizması hücre duvarının tahrip olması ve difüzyon ile hücre içeriğinin çözücüye maruz kalması olmak üzere iki ana fiziksel işlemi içermektedir. Ses dalgası sıkıştırma ve genişleme oluşturarak ortamdan geçer. Bu süreç kavitasyon olarak adlandırılır. Bu durum kabarcık üretimi, büyümesi ve çökmesi şeklinde ifade edilir. Böylece ultrason enerjisi hücre duvarını parçalar ve bitki matrisinden organik ve inorganik bileşiklerin çözücüye geçişini kolaylaştırır (Azmir, Zaidul vd. 2013).

Etkili ve verimli ekstraksiyon elde etmek için numunenin nem içeriği, öğütme derecesi, partikül boyutu ve çözücü önemli faktörlerdir. Ek olarak, sonikasyonun sıcaklığı, basıncı, frekansı ve süresi, UAE için belirleyici faktörlerdir (Büyüktuncel 2012).

1.3.3. Zeytinyağı ekstraksiyon tekniği

Zeytinyağı doğal bir ekstraksiyon çözücüsü olmakla birlikte ekonomik, non-toksik olması ve uygulama için çok özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmaması nedenleriyle özellikle kenevir bitkisinden kannabinoidlerin ekstrakt edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Romano ve Hazekamp 2013).

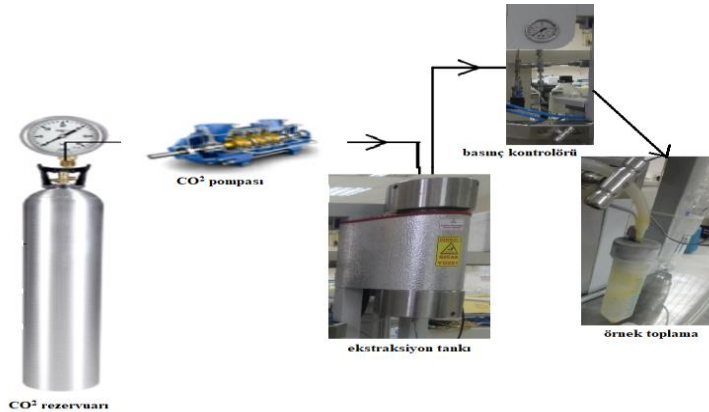
Zeytinyağı ekstraksiyon tekniği kullanılarak kenevir bitkisinden kannabinoidlerin elde edilmesinde bitkinin çiçek, yaprak ve dallarından kurutularak hazırlanan materyal farklı oranlarda zeytinyağı içerisine eklenmektedir. Daha sonra yağlı çözelti, asit formda bulunan kannabinoidlerin dekarboksilasyonunu gerçekleştirmek için 100 °C'nin üzerinde bir su banyosuna yerleştirilmekte ve belirli sürelerde bekletilerek filtre edilmektedir. Materyalde bulunan kannabinoidler bu şekilde zeytinyağı fazına geçmekte ve ilgili faz gerek direk olarak gerekse bir takım ayrıştırma işlemlerine tabii tutularak kullanılmaktadır (Deidda, Avohou vd. 2019).

1.3.4. Süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu tekniği (SFE)

SFE yönteminde genellikle yüksek basınç altında sıvılaştırılan CO₂ kullanılmaktadır. Sıvılaştırılan CO₂ bitki materyalinin sitoplazmasından çözebileceği bileşikler almakta ve böylelikle geleneksel çözücü ekstraksiyonuna göre daha temiz özümler elde edilmesini sağlamaktadır.

Temel bir SFE sistemi aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır.

- Bir mobil faz rezervuarı, genellikle yüksek basınçta depolanmış bir CO₂ tüpü veya tankı
- CO₂ gazını basınçlandırmak için bir pompa,
- Ekstraksiyon tankını içeren ısıtmalı bir bölüm,
- Tuzak sistemi ve tank içindeki yüksek basıncı korumak için bir kontrolör.



Şekil 1.7. SFE sisteminin akış şeması

SFE sisteminde CO₂, azot oksit, etan, propan, n-pentan, amonyak, floroform, sülfür hekzaflorür ve su dahil çok çeşitli çözücüler kullanılmaktadır. Karbondioksit, süper kritik koşullara kolayca ulaşabildiği ve diğer sıvılara göre açık avantajlara (örneğin düşük toksisite, yanıcılık ve maliyet ve yüksek saflık) sahip olduğu için şu anda en çok tercih edilen çözücüdür. Bu avantajlı yönlerine rağmen, bu tekniğin yüksek kurulum maliyeti sistemin kullanımını sınırlamaktadır (Zougagh, Valcárcel vd. 2004).

1.4. Kannabinoidlerin Tanımlama Yöntemleri

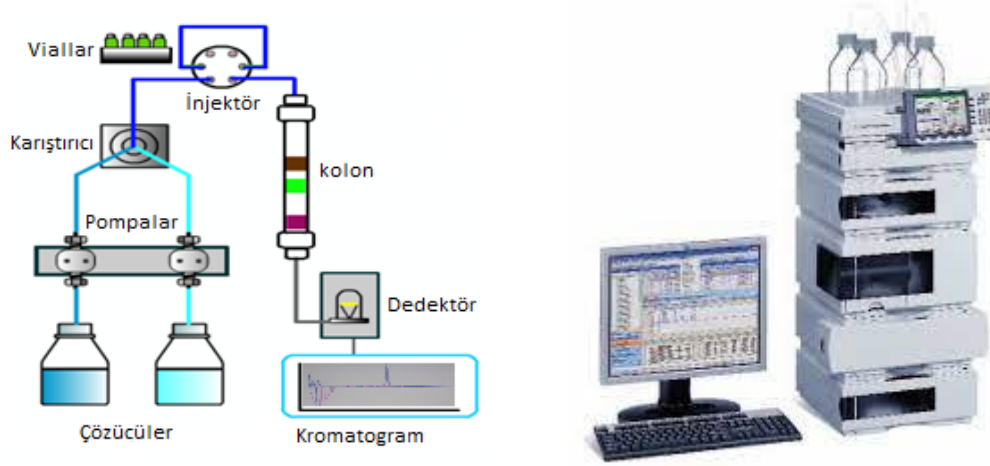
Kenevir bitkisinde bulunan majör kannabinoidlerin tür ve düzeylerini tespit edebilmek için çeşitli yöntemler kullanılmakta olup bu yöntemlerin başlıcaları yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve bu kromatografik enstrümanlara entegre edilen kütle spektrometresi (MS) tekniğidir.

Tanımlamada en yaygın kullanılan teknik olan HPLC kannabinoidlerin izolasyonu sırasında ısıtma uygulanmadığından dolayı asidik ve nötr kannabinoidler arasında ayırım yapılmasına izin vermekte ve kenevir örneklerinde orijinal kannabinoid kompozisyonunu değerlendirmek için uygun bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte diğer bir önemli yöntem olan GC tekniğinde ise enjeksiyon portundaki yüksek sıcaklık nedeni ile sisteme uygulanan kannabinoidler dekarboksile olabilmekte ve bu nedenle asidik ve nötr kannabinoidlerin arasındaki farklılıkların tanımlanması güçleşmektedir. GC sisteminin bu dezavantajına rağmen, belirtilen yöntem kenevir bitkilerinde ve biyolojik numunelerde bulunan kannabinoidlerin analizinde hızlı ve yüksek doğruluk sağlamaktadır (Citti, Ciccarella vd. 2016; Zivovinic, Alder vd. 2018; Deidda, Avohou vd. 2019).

Kannabinoidlerin kromatografik yöntemlerle tanımlanmasında ultraviyole (UV) veya diyot dizi dedektörü (DAD)'ne sahip HPLC sistemi veya alev iyonlaşma dedektörü (FID)'ne sahip GC sistemi kullanılmakla birlikte belirtilen kromatografik sistemlerin entegre edildiği MS yöntemleri de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MS yöntemleri kannabinoidlerin çıkış zamanı ve UV spektrum gibi tanımlama kriterlerine ilave olarak moleküler fragmentasyonun belirlenmesi suretiyle daha kesin bir tanımlama imkanı sunmaktadır. Sonuç olarak, DAD ve UV dedektörlü bir HPLC sistemi yüksek miktarda kannabinoid içeren bitki materyallerinin analizi için uygun olmakla birlikte MS sistemine göre daha düşük hassasiyete ve seçiciliğe sahiptir. Ancak MS sistemi ile karşılaştırıldığında daha ekonomik olması nedeniyle kannabinoid analizlerinde çoğu laboratuvar da yaygın olarak kullanılmaktadır (Citti, Ciccarella vd. 2016; Zivovinic, Alder vd. 2018; Deidda, Avohou vd. 2019).

1.4.1. HPLC

Kromatografi terimi, bir hareketli faz ve bir sabit faz arasında analitlerin adsorpsiyonuna dayanan teknikleri kapsamaktadır. Bunlar genellikle sabit ve hareketli fazların karakterine, sabit fazın şekli ve moleküllerin ayrılma güçlerine göre sınıflandırılırlar (Sun 2008).



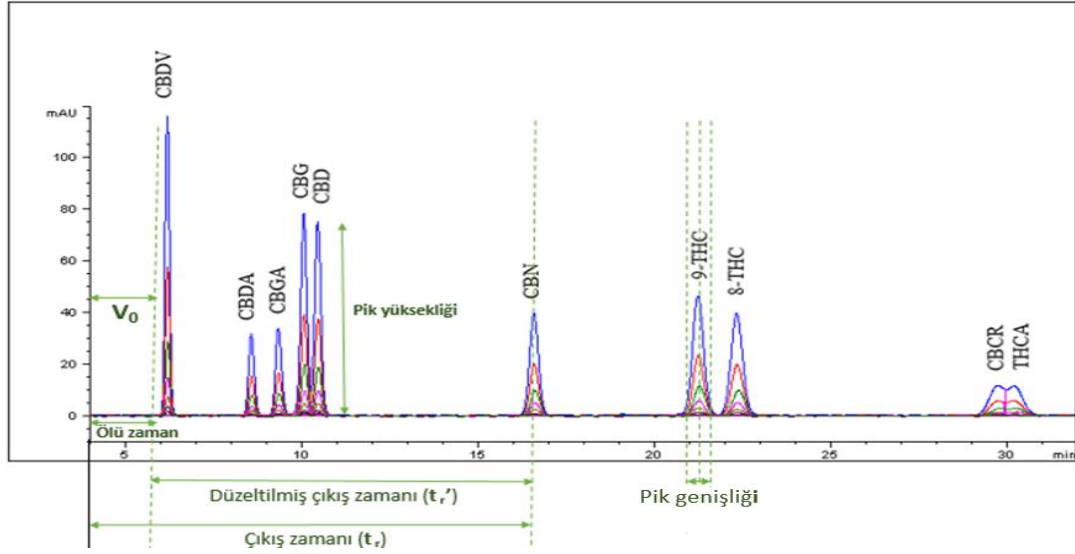
Şekil 1.8. HPLC cihazı şematik gösterimi

HPLC tekniği karışımlardaki bileşenlerin ayrıştırılmasında, nitelik ve niceliklerinin belirlenmesinde kullanılan bir analiz tekniğidir. Bu teknikte yüksek basınçla çıkabilen bir pompa yardımıyla sistemde bir sıvı faz (mobil faz) akışı sağlanmakta ve bu sıvı faz içine enjekte edilen analitler kromatografik kolona taşınmaktadır. Kolona ulaşan analitler, kolon dolgu maddesi ile çeşitli şekillerde etkileşerek farklı zamanlarda detektöre ulaşırlar. Sistemde kullanılan kolon katı bir adsorban maddeyle doludur ve bu sayede kromatografik ayrım gerçekleşmektedir. Sıvı kromatografik kolonların çoğu 5 ila 25 cm boyundadır. Analitik kolonların iç çapı genellikle 3-5 mm olup en tipik parçacık boyutu 3 veya 5 μm 'dir (Skoog, Holler vd. 2017).

Mobil faz, sisteme bir çözücü içerisinde uygulanan bileşikler kolonun içindeki adsorbana taşır. Sabit faz olarak adlandırılan bu adsorban, normalde içinden mobil fazın sürekli olarak aktığı sabit destektir. Mobil ve sabit fazlarda bileşiklerin akışındaki varyasyon, adsorban madde üzerinde veya içinde bileşiklerin belirli sürelerde tutulmasına neden olur. Bir bileşiğin sabit ve mobil faz arasındaki dağılım katsayısının büyüklüğü, bileşiğin kolondaki tutulum süresini bir diğer ifade ile çıkış zamanını belirler (Sun 2008).

Sisteme enjekte edilen bileşiklerin tür ve konsantrasyon profilinin bir kaydı olan kromatogram, kromatografik bir yöntemle elde edilen bilgileri sunan bir görseldir. Kromatogram (Şekil 1.7), kolonun sonunda her bir bileşiğin konsantrasyonundaki değişimi zamanın bir fonksiyonu (veya mobil fazın hacmi) olarak tespit eden bir dedektör tarafından üretilen sinyallerle oluşturulmaktadır. Kromatogramda izlenmiş bileşiklerin çıkış zamanları ve ayrıca her bir bileşiğin konsantrasyonuna bağlı olarak pikler bulunmakta ve bu pikler bileşik hakkında ayrıntılı bilgiler sunmaktadır (Sun 2008).

Çıkış zamanı veya tutulma süresi (t_r), bir maddenin kromatografik kolon boyunca hareket etmesi için geçen süredir. Farklı moleküller, kolondan geçerken sabit fazda farklı miktarlarda zaman harcarlar, ancak hepsi hareketli fazda aynı miktarda zaman geçirirler. Bu süre, kolon ölü zamanı veya bekleme süresi (t_0) olarak adlandırılır. Çıkış zamanı ile ölü zaman arasındaki fark olarak ölçülen düzeltilmiş çıkış zamanı (t_r'): $t_r' = t_r - t_0$, moleküllerin tanımlanması hakkında daha kesin bilgiler sunmaktadır (Sun 2008).



Şekil 1.9. Kromatogram örneği

HPLC temel olarak ilaç, gıda, kozmetik, biyokimya ve çevresel örnekler gibi verimli, güvenilir ve hassas analitik yöntemlere ihtiyaç duyulan birçok farklı alanda da uygulama alanları bulan önemli bir analitik tekniktir (Sun 2008).

1.5. Yöntem Geliştirme Çalışmaları

Yöntem geliştirme çalışmaları genellikle validasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilmektedir. Validasyon, analitik sistemin amacına uygunluğunu gösterme sürecidir. ISO 17025 standardına göre metod validasyonunun tanımı şu şekilde yapılmıştır: "Bir metod veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilip belgelendirilmesidir" (TS EN ISO, 2012a). Yöntemin doğrulanması olarak da ifade edilen validasyonun aşağıda belirtilen durumlarda yapılması gerekmektedir.

- Analiz için yeni bir yöntem geliştirildiğinde,
- Laboratuvarında bir yöntem ilk kez kullanıldığında,
- Kullanılan yöntemde değişiklik yapıldığında,
- Farklı bir kişi veya farklı bir cihaz kullanıldığında,
- İki yöntem karşılaştırıldığında,
- Uzun süredir kullanılmayan bir yöntemin tekrar kullanılması durumunda,
- Kalite kontrol testleri sonunda veya kullanılan yöntemde bir değişiklik yapıldığında, metodun valide edilmesi gereklidir (Kalra 2011).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında validasyon çalışmaları temel olarak belirli bir test tarafından kullanılan analitik tekniğin amaçlanan kullanıma uygun olmasını sağlamak için gerçekleştirilmektedir. Metod validasyon sonuçları, analitik sonuçların geçerliliğini, doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek için kullanılmakta olup herhangi bir başarılı analitik tekniğin önemli bir bileşeni konumundadır. (Kalra 2011). Şekil 1.8'de

kullanılacak prosedürün türüne göre hangi validasyon kriterlerinin yapılmasının gerektiğini göstermektedir (Taverniers, De Loose vd. 2004).

Çizelge 1.8. Metotlara göre validasyon parametreleri (Taverniers, De Loose vd. 2004)

Parametre	METOT TİPİ			
	Tanımlama	Safılık		Tayin
		Limit	Miktar	
Gerçeklik	-	-	+	+
Kesinlik	-	-	+	+
Spesifik	+	+	+	+
Tespit sınırı (LOD)	-	+	-	-
Tayin sınırı (LOQ)	-	-	+	-
Doğrusal/Ölçüm Aralığı	-	-	+	+
Doğrusalık	-	-	+	+
Sağlamlık	+	+	+	+

1.5.1. Doğruluk

Cihaz, ekipman, işlem veya ölçüm sisteminin kullanıldığı laboratuvar koşullarında belirlenen amaca uygunluğun kontrol edilerek doğrulanmasıdır. Bu çerçevede analitik sürecin değerlendirilmesi, geri kazanım analizi ile yapılabilmektedir. Doğruluk çalışması bir analitin bir numuneden ne kadar iyi ekstrakte edilebileceğinin ve analitik bir ekipman kullanılarak analiz edilebileceğinin bir ölçüsüdür. Geri kazanım çalışmalarından elde edilecek sonuçlar örneğin yapı ve bileşimine, örnek hazırlama tekniğine ve analitin örnekteki konsantrasyonu gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak değişim göstermektedir (Taverniers, De Loose vd. 2004).

Geri kazanım değerini tespit etmek için aşağıda belirtilen üç farklı yöntem kullanılmaktadır:

- Bilinen konsantrasyondaki bir örneğin analiz edilmesi ve ölçülen değer ile gerçek değer (referans standartları) karşılaştırılması yapılır. Hesaplamada kullanılan formül (1.1)'de gösterilmiştir:

$$R_m = C_{obs} / C_{CRM} \quad (1.1)$$

C_{obs} : Bulunan konsantrasyon değeri, C_{CRM} : Referansın konsantrasyon değeri

- Önceden kullanılan alternatif metodun sonuçlarıyla yeni bir metottan elde edilen analiz sonuçlarının karşılaştırılması yapılır. Hesaplama kullanılan formül (1.2)'de gösterilmiştir

$$R_m = C_{met}/C_{ref} \quad (1.2)$$

C_{met} : Metotla bulunan miktar, C_{ref} : Referans metotla bulunan miktar

- Örnek matrisine bilinen miktarda analitin eklenerek yapılır. Hesaplama kullanılan formül (1.3)'te gösterilmiştir:

$$R_m = (C_{obs} - C_{smp})/C_{spike} \quad (1.3)$$

C_{smp} : Örneğin konsantrasyon değeri, C_{spike} : Eklenmiş konsantrasyon değeri (Taverniers, De Loose vd. 2004).

1.5.2. Kesinlik

Ortalama değerle ilgili ölçüm sonuçlarının dağılımını gösterir ve aynı koşullar altında yapılan bireysel ölçüm sonuçlarının yakınlığının bir göstergesidir. Kesinlik değerini belirlenmek için tekrarlanabilirlik standart sapma s_r , üretilebilirlik standart sapması s_R ve ara kesinlik s_{zi} değerleri hesaplanmaktadır (Ellison ve Williams 2012).

- Tekrarlanabilirlik s_r , tek bir teknisyen, ekipman veya süreç kullanılarak laboratuvarında kısa bir süre boyunca bulunan değişkenliği ifade eder. s_r bir laboratuvar içinde veya laboratuvarlar arası bir analizle hesaplanabilir. Standart sapmayı ölçüm sonucundan bağımsız ve birimsiz olarak raporlamak için bağıl standart sapma (%RSD) formül (1.4)'ten yararlanılarak hesaplanmaktadır (Taverniers, De Loose vd. 2004).

$$\%RSD = (SD/\bar{x}) * 100 \quad (1.4)$$

SD : Örneğe ait verilerin standart sapma, $\bar{x}$: Örneğe ait verilerin ortalaması

- Spesifik bir prosedür için laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik standart sapması s_R , ayrı laboratuvarlar aynı numuneyi analiz ettiğinde elde edilen heterojenliği gösterir. Tekrar üretilebilirlik; farklı teknisyen, farklı cihaz veya farklı laboratuvar veya farklı günlerde elde edilen sonuçların %RSD olarak hesaplanmasıdır (Taverniers, De Loose vd. 2004).

Geri kazanım ve RSD değerleri analitin konsantrasyonuna bağlı olarak değerlendirilmektedir. Çizelge 1.10'da analitin konsantrasyonuna göre geri kazanım ve %RSD oranların aralığı verilmiştir.

Çizelge 1.5. Analit konsantrasyonuna bağlı olarak olması gereken geri kazanım oranları ve tekrarlanabilirlik kesinliği %RSD (Taverniers, De Loose vd. 2004)

Analit (%)	Analit/Numune Oranı	Birim	Geri kazanım oranı (%)	%RSD
100	1	1000 g/kg	98-102	1,3
10	10^{-1}	100 g/kg	98-102	2,8
1	10^{-2}	10 g/kg	97-103	2,7
0,1	10^{-3}	1 g/kg	95-105	3,7
0,01	10^{-4}	100 mg/kg	90-107	5,3
0,001	10^{-5}	10 mg/kg	80-110	7,3
0,0001	10^{-6}	1 mg/kg	80-110	11
0,00001	10^{-7}	100 µg/kg	80-110	15
0,000001	10^{-8}	10 µg/kg	60-115	21

1.5.3. Seçicilik

Seçicilik bir sistemin söz konusu analite ne kadar iyi tepki verdiğini ifade eder. Tipik olarak seçicilik deneyleri, potansiyel girişim hem boş enjeksiyon hem de analit ilave edilmiş örneklerin enjeksiyonların sonuçları karıştırarak potansiyel girişim etkilerinin incelenmesi suretiyle gerçekleştirilmektedir. Amaç, analiz edilen analitin matrisin yanında doğru bir şekilde ölçülüp ölçülemeyeceğinin belirlenmesidir (Ellison ve Williams 2012).

1.5.4. Tespit sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ)

Analitik bir yöntemle doğru bir şekilde ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu LOD olarak bilinir. Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak LOD'nın oranı, hesaplanan standart sapmasının (SD) veya kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 3 katı LOD değeri olarak ifade edilir.

LOQ, bir analitik yöntem ile raporlanabilir düzeyde tespit edebilecek en düşük değerdir; ölçüm limitinin LOD analizi sonucunun 2,5 ila 3 katı veya çok düşük analit konsantrasyonuna sahip boş numunenin SD değerinin 10 katı olarak ifade edilmektedir (Taverniers, De Loose vd. 2004; Kalra 2011).

1.5.5. Doğrusallık

Doğrusallık, çeşitli konsantrasyonlarda ölçüm yapmak için kullanılan yöntemin önemli bir özelliğidir. Saf standartlara ve gerçekçi örneklerle yanıtın doğrusallığı belirlenebilir. Doğrusallık genellikle ölçülmez ancak incelenerek veya doğrusal olmayan için anlamlılık testleri kullanılarak kontrol edilir. Önemli doğrusal olmama durumu, genellikle doğrusal olmayan kalibrasyon işlevlerinin kullanılmasıyla düzeltilir veya daha dar bir çalışma aralığı seçilerek ortadan kaldırılabilmektedir (Ellison ve Williams 2012).

Doğrusallık hesaplaması için bir kalibrasyon grafiği oluşturulmalıdır. Kalibrasyon grafiği oluşturmanın en iyi yolu, numune cihazda verildikten sonra üretilen analitik sinyalin grafiğin orta noktası civarında bir yerde görünmesinin sağlanmasıdır. Hazırlanacak standartların konsantrasyon aralığı en az altı olmalı ve her standart birim için en az üç kez sisteme uygulanması gerekmektedir. Çalışma sonucunda standartların konsantrasyonuna karşı cihazdan elde edilen sonuçlarıyla deneysel kalibrasyon grafiği çizilir, grafikten elde edilen eğrinin korelasyon katsayısı (R^2) belirlenir. Ortalama değeri aşağıda gösterilen formül (1.5) ile belirlenmiştir. Standart sapmayı hesaplamak için formül (1.6) kullanılmaktadır (Kalra 2011).

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n \quad (1.5) \quad SD = \sqrt{\sum (\bar{x} - x) / (n-1)} \quad (1.6)$$

$\bar{x}$: Örneğe ait verilerin ortalaması, x : İlgilenilen örnek, n : Örnek sayısı

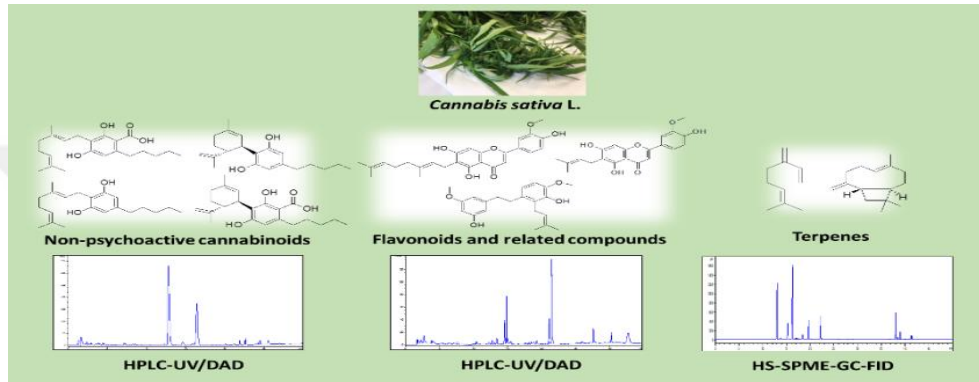
SD: Örneğe ait verilerin standart sapması

1.5.6. Sağlamlık

Birçok yöntem geliştirme veya doğrulama protokolü, belirli parametrelere duyarlılığın doğrudan araştırılmasını gerektirir. Metodun ölçüm sonuçları üzerine kalitatif ve kantitatif olarak etkisi olacak sapmalar karşısındaki performansı değerlendirilmesi için tipik olarak bir veya daha fazla parametre değişikliğinin etkisinin gözlemlendiği bir ön "sağlamlık ölçüsü" kullanılır. Etki önemliyse (sağlamlık testinin doğruluğunun aksine), etkinin ölçeğini belirlemek için daha detaylı bir analiz yapılır ve buna göre izin verilebilir bir çalışma süresi belirlenir. Sonuç olarak sağlamlık testlerinden elde edilen veriler, temel parametrelerin etkisi hakkında fikir verebilmektedir (Ellison ve Williams 2012).

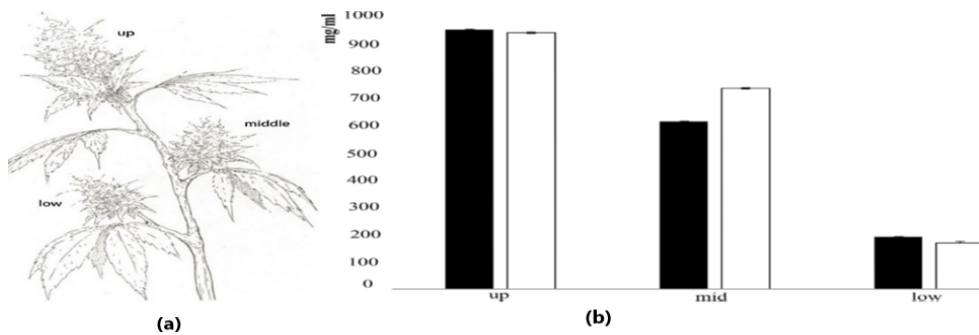
2. KAYNAK TARAMASI

Kenevir bitkisinin çiçek kısımlarındaki biyoaktif bileşiklerin kromatografik yöntemlerle izlenilmesi konulu yapılan çalışmada UV / DAD, ESI-MS ve MS² dedektörleri kullanılarak bitkideki kannabinoidlerin tanımlanması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. CBDA ve CBD, analiz edilen kenevir örneklerinde en yüksek düzeyde bulunan kannabinoidler olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada CBD'ün 1,9-8,6 mg/g ve CBDA'nın ise 3,7-36,4 mg/g düzeylerinde değiştikleri belirlenmiştir. Çalışmada önerilen yöntemin kenevir bitkisinde bulunan majör kannabinoidlerin kapsamlı kimyasal analizleri için uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Pellati, Brighenti vd. 2018).



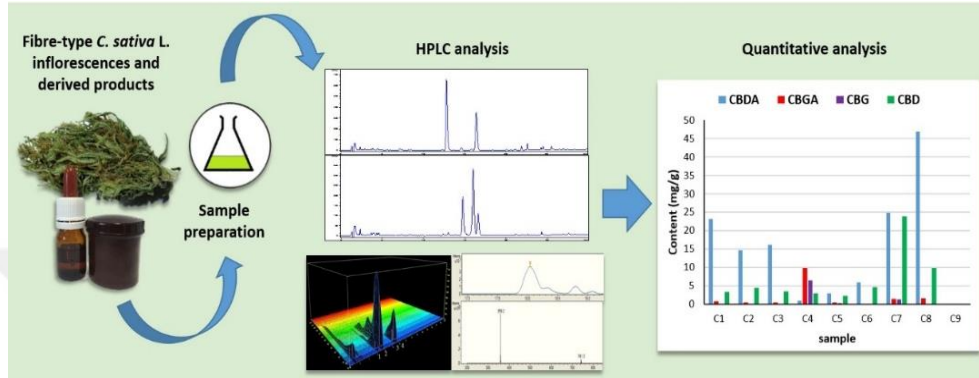
Şekil 2.1. Kenevir bitkisinin çiçek kısımlarındaki biyoaktif bileşiklere ait kromatografik analiz sonuçları (Pellati, Brighenti vd. 2018)

Bitkinin farklı kısımlarında bulunan çiçeklerindeki kannabinoid düzeyleri ve en uygun ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi konusunda yapılan diğer bir çalışmada ise, en yüksek kannabinoid miktarlarının yüksekten düşüğe doğru üst, orta ve alt kısımlarında yoğunlaştığı bildirilmektedir. İlgili çalışmada ayrıca CBD ekstraksiyonu konusunda en uygun çözücünün hekzan olduğu ve numunelerde 0,15 mg/mL düzeyinde CBD tespit edildiği vurgulanmaktadır (Namdar, Mazuz vd. 2018).



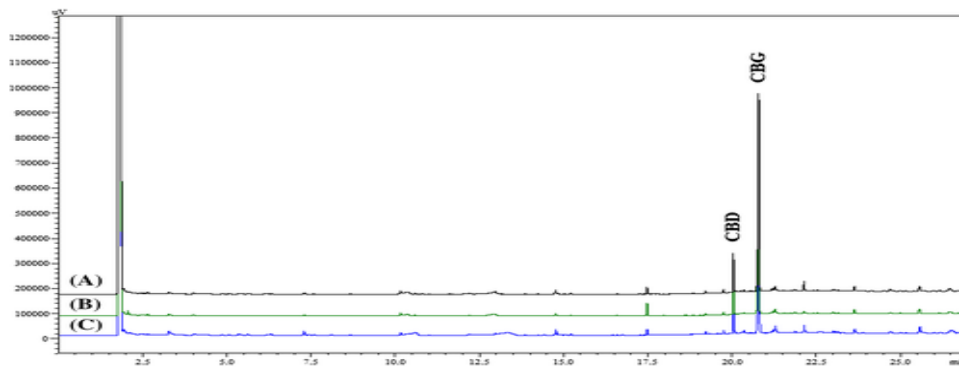
Şekil 2.2. Kenevir bitkisinde kannabinoidlerin bulunduğu kısımları **a)** Kenevir bitkisindeki çiçek salkımlarının pozisyonları; **b)** Farklı ayırma yöntemleriyle saptanan toplam kannabinoid miktarı (beyaz sütunlar: HPLC; siyah sütunlar: GC – MS analiz sonuçlarını göstermektedir) (Namdar, Mazuz vd. 2018)

Farklı ekstraksiyon metodolojilerinin endüstriyel tip kenevir numunelerinin çiçek kısımlarındaki psikoaktif olmayan aktif maddelerin ekstrakte edilmesindeki etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada DM, UAE, mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ve SFE'un yöntemleri denenmiş ve elde edilen bulgulara göre, CBD'un ekstraksiyon verimliliği üzerine en etkili çözücünün etanol, ekstraksiyon yönteminin ise mikrodalga ekstraksiyon yöntemi olduğu bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca numunelerdeki ekstrakte edilebilen CBD miktarlarının 2,5-3,5 mg/g düzeylerinde olduğu rapor edilmiştir (Brighenti, Pellati vd. 2017).



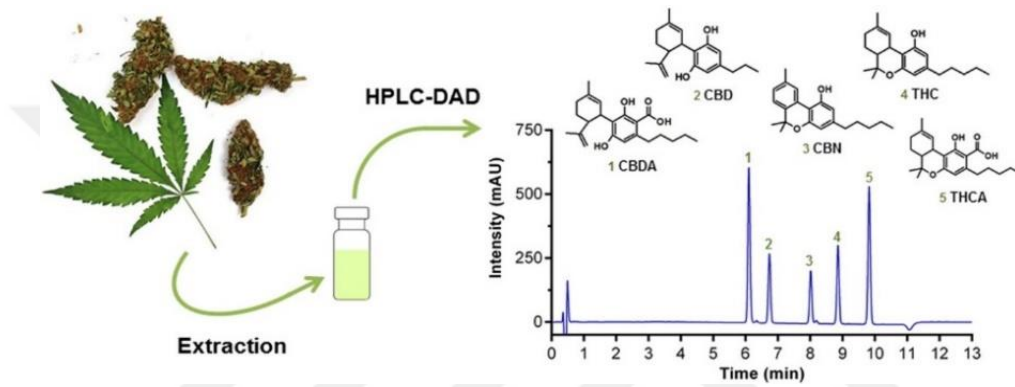
Şekil 2.3. Kenevir numunelerinin çiçek kısımlarında psikoaktif olmayan aktif maddelerin ekstrakte ve analiz edilmesinden bazı aşamalar (Brighenti, Pellati vd. 2017)

2019'da Baranauskaite ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; CBD ve CBG'de yüksek bir geri kazanım elde etmek için DM, UAE ve geri akış ısısı ekstraksiyonu (RHE) yöntemleri karşılaştırmışlardır. Çalışmada daha az zaman, enerji ve maliyet gerektirmesi nedeni ile UAE yönteminin en uygun bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Belirtilen çalışmada optimize edilen ekstraksiyon yöntemine ait parametrelerin; çözücü olarak etanol, materyal / çözücü oranı 1:10 ve ekstraksiyon süresi ortam sıcaklığında 10 dakika olarak belirlenmiştir (Baranauskaite, Marksas vd. 2020).



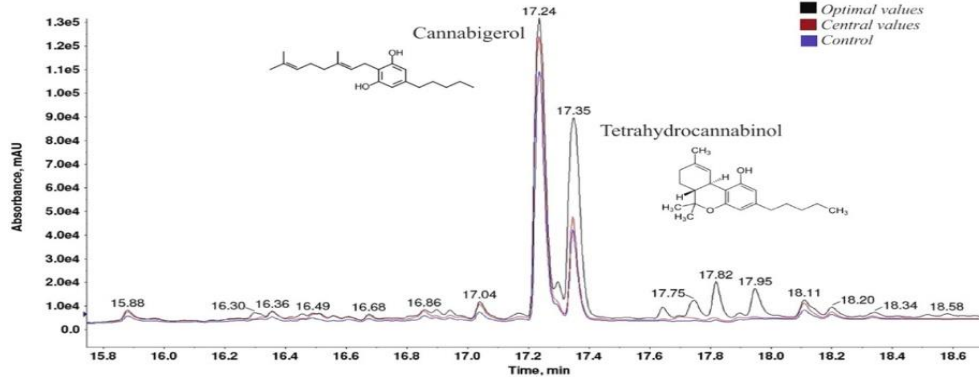
Şekil 2.4. Kenevir etanolik özütlerinin GC - FID analizi yoluyla elde edilen kromatogramları (A - DM), (B- UAE) ve (C - RHE) (Baranauskaite, Marksas vd. 2020)

Hädener, König ve ark. tarafından Δ^9 -THC, THCA, CBD, CBDA ve CBN dahil olmak üzere lif ve medikal tip kenevir türlerinde bulunan ana nötr ve asidik kannabinoidlerin kantitatif analizi için basit ve hassas bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada bitki materyali kurutulularak homojenize edilmiş ve çözücü olarak metanol / hekzan karışımı kullanılmıştır. Analitler, yüzde 0,1 formik asit içeren su / asetonitril kullanılarak gradyanlı elüsyon ile C8 kolonunda kromatografik olarak ayrılarak 210 nm olarak ayarlanan DAD dedektöründe tespit edilmiştir. Yöntemin doğru, seçici, hassas, güvenilir ve kesin olduğu doğrulanmıştır. Lif türü kenevir bitkisinde nötr kannabinoidlerin %0,04 - %4, asit kannabinoidlerin ise %0,4 - %20 arasında değişen doğrusal aralığa sahip olduğu belirtilmiştir. Medikal türü kenevir bitkisinin örneklerinde ise sırasıyla %0,13 ile %13,33 ve %1,33 ile %66,66 doğrusal aralıklar tespit edilmiştir (Hädener, König vd. 2019).



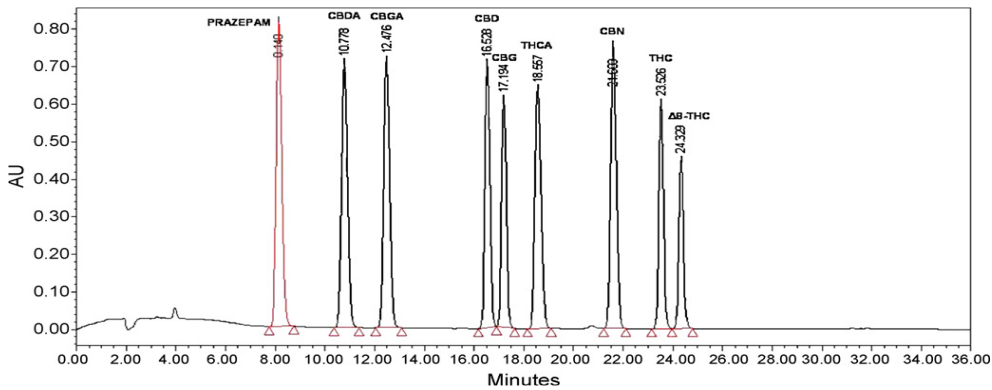
Şekil 2.5. HPLC-DAD yöntemi kullanılarak kenevir bitkisinde bulunan Δ^9 -THC, THCA, CBD, CBDA ve CBN molekülerin kromatogramı (Hädener, König vd. 2019)

Agarwal ve ark 2018'de kenevirden en yüksek CBD ve CBG verimini elde etmek için UAE yöntemi kullanarak Δ^9 -THC / CBD < 1 düzeyinde kannabinoid içeren lif tipi kenevir bitkisinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunu optimize etmişlerdir. Kannabinoid bileşiklerinin CBG ve Δ^9 -THC miktarlarının belirlenmesi ve karşılaştırmalı değerlendirmesi, HPLC-DAD-MS / MS tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesi için Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılmış ve bu metodolojide yanıtların tahmin edilen değerleri ile modeli doğrulamak için deneysel değerlerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada %10,86 verimle en uygun UAE koşulları: zaman : 15 dakika, güç : 130 W ve çözücü %80 metanol olarak belirlenmiştir (Agarwal, Máthé vd. 2018).



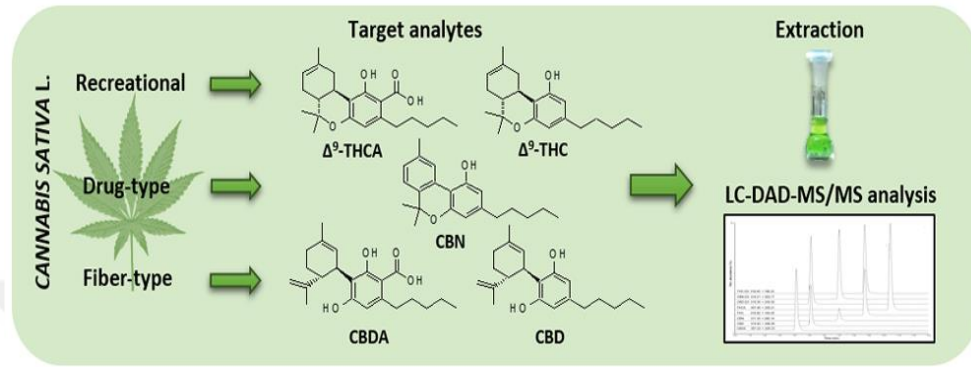
Şekil 2.6. Kenevirden kannabinoidlerin UAE tekniği ile ekstraksiyonunun RSM ile optimize edilmesi (Agarwal, Máthé vd. 2018)

De Backer, Debrus ve diğerleri tarafından, kromatografik yeni bir metodoloji geliştirmek üzere kenevir bitkisi materyalinde bulunan başlıca nötr ve asidik kannabinoidlerin ((CBD), (CBDA), (CBG), (CBGA) ve (CBN)) tanımlanması için basit ve doğru bir HPLC / DAD yöntemi oluşturmuştur. Çalışmada bileşimde bulunan Δ^8 -THC ise sadece niteliksel olarak tanımlanmıştır. Yöntemin optimize edilmesi için, 45 farklı HPLC deney kombinasyonu belirlenmiş ve bu kombinasyonlarda yonteme ait bazı faktörler optimize edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, ilgili faktörlerin en uygun değerleri gradyanın başlangıcındaki metanol yüzdesi %40, mobil faz pH değeri 6,3, %95 metanole ulaşmak için gradyan süresi 20 dakika ve elüentin pH değeri 5,19 olarak tespit edilmiştir. Çalışma neticesinde ilgili yöntem kullanılarak bitkisel materyalde bulunan sekiz ana kannabinoid 36 dakikalık bir HPLC analiz süresi ile birbirinden sağlıklı bir şekilde ayrılarak analiz edilebilmişlerdir (De Backer, Debrus vd. 2009).



Şekil 2.7. Kannabinoidlere ait pikler ve çıkış süreleri (internal standart olarak prazepam kullanılmıştır) (De Backer, Debrus vd. 2009)

Protti, Brighenti ve ark. tarafından önerilen metodolojide ise, kenevir bitkisi örneklerinde hem psikoaktif hem de psikoaktif olmayan kannabinoid seviyelerini ölçmek için çok kütle spektrometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada bir elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı, çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda üçlü dört kutuplu bir kütle analizörü ve ayrıca bir DAD dedektörü kullanılmıştır. Elde edilen bulgulara göre yöntemin kesinlik değeri tüm analitler için RSD <%6,0 ve doğruluk değeri tüm aktif maddeler için >%92,1 olarak tespit edilmiştir (Protti, Brighenti vd. 2019).



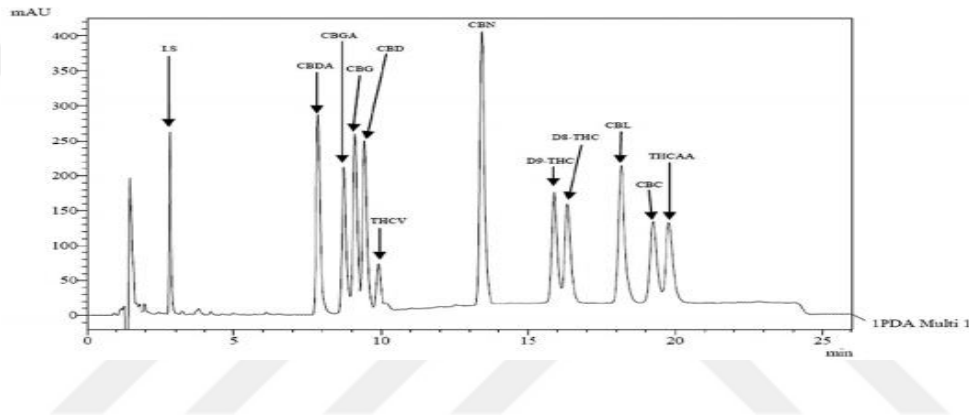
Şekil 2.8. Kenevir örneklerinde kannabinoidlerin LC- DAD-MS/MS yöntemiyle analiz edilmesini gösterir grafik (Protti, Brighenti vd. 2019)

2016'da Citti, Ciccarella ve ark. tarafından, kenevir bitkisinde bulunan ana kannabinoidlerin (CBD-A, CBD, CBN, Δ9-THC ve THC-A) kalitatif ve kantitatif tespiti için basit ve hızlı bir HPLC-UV yöntemi geliştirilmiştir. Analitlerin tanımlanmasını ve saflığını belirlemek için ise yüksek çözünürlüklü bir kütle spektrometresi (HPLC-ESI-QTOF) cihazı kullanılmıştır. Bununla birlikte zeytinyağı, etil alkol ve süper kritik CO₂, ekstraksiyon yöntemleri denenmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Zeytinyağı kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon etil alkol ile karşılaştırıldığında toplam CBD'ün ekstraksiyon oranı (CBD-A ve CBD miktarı olarak tanımlanır) zeytinyağı ekstraksiyonunda daha yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca kenevir bitkisi bazlı zeytinyağı ekstraktlerinin, kannabinoid konsantrasyonlarını etil alkolle yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlere göre daha uzun süre koruduğu gösterilmiştir (Citti, Ciccarella vd. 2016).



Şekil 2.9. Zeytinyağı ve etil alkol ekstraktlarında terpen ve kannabinoid konsantrasyonunun yarı kantitatif analizi (Citti, Ciccarella vd. 2016)

Mississippi Üniversitesi araştırmacıları üç ayrı kenevir türünde on bir farklı kannabinoidi (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBG, CBCR, CBD, CBDA, CBL, CBN, THCV, THCA ve CBGA) tanımlamak için standart bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada kannabinoidleri birbirinden ayırt etmek için bir Luna C18 HPLC kolonu (150*4,60 mm i.d., 3 μ m partikül boyutu) kullanılmıştır. HPLC analizinde gradyan elüsyon programı oluşturmak için mobil faz, (A): su içinde yüzde 0,1 (v / v) formik asit ve (B): asetonitril içinde yüzde 0,1 (v / v) formik asit kullanılmıştır. Kannabinoidleri tanımlamak için dedektör dalga boyu 220 nm olarak ayarlanmış ve kannabinoidlerin UV spektrumları 210 ila 400 nm arasında toplanmıştır. Birim analiz için HPLC toplam çalışma süresi 22,2 dakika olarak uygulanmıştır. Yöntem kesin, hızlı ve güvenilir olarak nitelendirilmiş ve geliştirilen yöntemin kenevir numunelerindeki kannabinoid düzeylerinin belirlenmesinde standart bir yöntem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Gul, Gul vd. 2015).



Şekil 2.10. Standart kannabinoid karışımının temsili kromatogramı (Gul, Gul vd. 2015)

Sunulan bu tez çalışmasında kontrollü şartlar altında yetiştirilen kenevir bitkisinde bulunan majör kannabinoidlerin farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilmesi ve HPLC cihazında analiz edilebilmesine yönelik yöntem parametrelerinin en uygun hale getirilmesi amaçlanmıştır. Belirtilen amaca ulaşılabilmesi için çalışmalarda kullanılacak materyal ve kimyasal maddelerin temin edilmesi, kenevir bitkisi tohumlarının kontrollü şartlar altında ekimlerinin gerçekleştirilmesi, belirli bir olgunluğa ulaşan kenevir bitkisinin numunelerinden örnek alınması ve ön hazırlık işlemleri, numunelere farklı ekstraksiyon işlemlerinin uygulanması ve her bir parametreye yönelik en uygun değerlerin belirlenmesi çalışmaları yürütülmüştür.

3. MATERYAL VE METOT

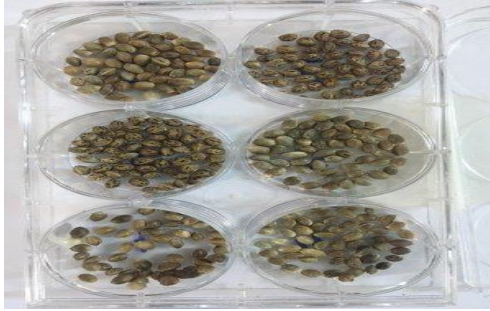
3.1. Kullanılan Bitki Materyali

Denemeler sırasında kullanılan kenevir bitkisinin Ferimon çeşidi T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. İlgili genotipe ait bazı özellikler Çizelge 3.1'de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan kenevir bitkisinin genotiplerine ait bazı özellikler

Genotip	Yetiştirme süresi (gün)	Tane verimi (kg/da)	Bitki boyu (cm)	Tohum yağ oranı (%)	1000 tane ağırlığı (g)	Saptaki lif içeriği (%)	Biyokütle verimi (kg/da)	CBD içeriği (%)	Δ^9 -THC içeriği (%)
Ferimon	125	80-100	200-250	30-32	16-18	30-35	600-800	1-1,5	<0,12

Tez çalışmaları kapsamında temin edilen tohumların kontrollü şartlardaki ekimleri Antalya ili, Konyaaltı ilçesi, Pınarbaşı Mahallesi, Dumlupınar Bulvarı'nda bulunan Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, akıllı seralarının 100 m²'lik bir bölümünde gerçekleştirilmiştir. İklim koşulları kontrol altında tutulan bu sera 24 saat kamera ile kayıt altına alınabilme imkanına sahiptir.



Şekil 3.1. Denemeler kapsamında kullanılan kenevir tohumları



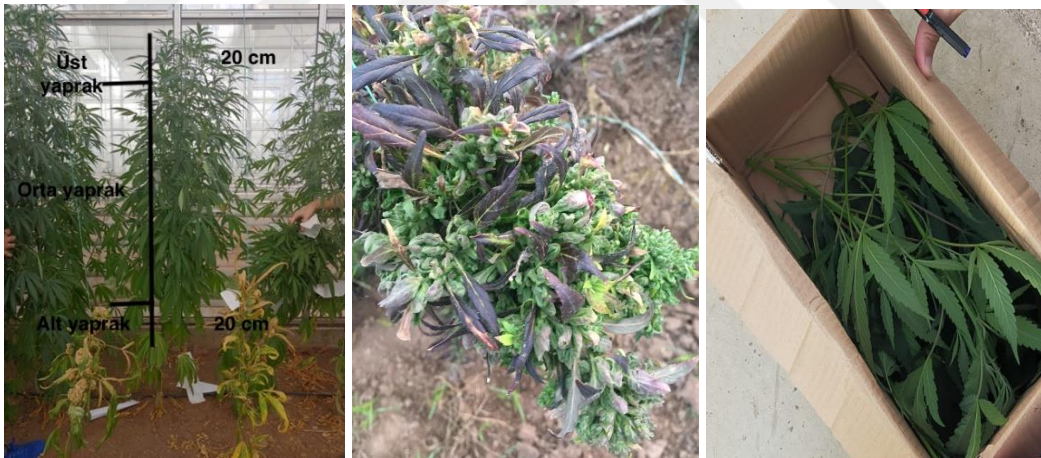
Şekil 3.2. Kenevir tohumları kullanılarak üretilen fideler



Şekil 3.3. Sera koşullarında yetiştirilen kenevir bitkileri

İlgili ekimler konusunda yasal başvurular 29 Eylül 2016 tarih ve 29842 sayılı Resmî Gazete’de yayınlanan “Kenevir yetiştiriciliği ve kontrolü hakkında yönetmelik” hükümlerine göre yapılmıştır ve T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Antalya İl Müdürlüğü tarafından 23.07.2019 tarih ve 32168 sayı numarası ile verilen izin belgesi düzenlenmiştir.

Uygun şartlarda yetiştirilen kenevir bitkisinin örnekleri toplama olgunluğuna ulaştığında üst 20 cm kısmındaki yapraklar ve çiçekler hasat edilmiş ve etiketlenmiş karton paketlere konularak kurutmaya bırakılmıştır.



Şekil 3.4. Kenevir bitkisinden numune alma işlemleri ve alınan kısımları

3.2. Kullanılan Materyaller

Tez çalışmasında kullanılan materyaller Çizelge 3.2’de, kullanılan alet ve ekipmanlar Çizelge 3.3’te verilmiştir. Ayrıca ekstraksiyon deneylerinde, çözeltileri hazırlamada ve kromatografik analizler sırasında kullanılan bütün kimyasallar (etanol, metanol, diklorometan, aseton, hekzan, asetonitril, asetik asit) analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma (Saint Louis, MO, ABD) isimli firmalardan temin edilmiştir.

Çizelge 3.2. Deneylerde kullanılan materyaller

Materyal
Karbondiyoksit CO ₂
0,45 µm PTFE şırınga ucu filtre
Kağıt filtre
10 ml'lik şırınga
Mikropipet
Mikropipet uçları
HPLC vialleri
40 ml'lik cam şişeler
50 ml'lik beherler
50 ml'lik santrifüj tüpleri
Zeytinyağı

Çizelge 3.3. Denemeler kapsamında kullanılan alet ve ekipmanlar

Materyal	Marka, Model, Şehir, Ülke
HPLC cihazı	Agilent, 1200 Infinity, Santa Clara, ABD
Ultrasaf su sistemi	MES, MP Minipure, BASIC M UP, Ankara, Türkiye
Ultrasonik banyo	ISOLAB, 621.06.003, Eschau, Almanya
Ultrasonik prob	SONICS VIBRA, CELL VCX 750, Newtown, ABD
Hassas terazi	Ohaus Pioneer, PX224/E, Nänikon, İsviçre
Laboratuvar tipi öğütücü	IKA, MF10 Basic, Staufen, Almanya
Etüv	Memmert, INE 500, Schwabach, Almanya
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	MTOPS, MS300HS, Güney Kore
Su banyosu	Mikrotest, DT107, Ankara, Türkiye
Süperkritik akışkan CO ₂ ekstraktörü	SUPEREX, F500 CO ₂ EKSTRAKTÖR, Konya, Türkiye

Çizelge 3.3'ün devamı

Soğutmalı çalkalamalı inkübatör	Mikrotest, MCS-55, Ankara, Türkiye
İzomantle (Heating mantle)	ISOLAB, 608.13.500, Eschau, Almanya

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması➤ **Belirli oranlarda hazırlanan karışımların enjeksiyonu (mix standart):**

Kenevir bitkisinde buluna kannabinoidlerin tanımlanmasında ve ekstraksiyon işlemlerinde analitik standart olarak kullanılan malzemeler ve malzemelerin çeşitli özellikleri Çizelge 3.4'te sunulmaktadır.

Çizelge 3.4. Tez kapsamında kullanılan kannabinoid analitik standartları

Marka/Bileşen	Kısaltma	Safılık oranı (%)	Konsantrasyon (µg/mL)
<i>Cerillant (T-005)</i>			
Δ9-Tetrahydrocannabinol	Δ9-THC		1000
<i>Cerillant (C-045)</i>			
Cannabidiol	CBD		1000
<i>CAYMAN Chemical (21305)</i>			
Δ8-Tetrahydrocannabinol	Δ8-THC	96,80±0,56	249,3±2,2
Δ9-Tetrahydrocannabinol	Δ9-THC	96,55±0,56	249,8±2,2
Tetrahydrocannabinolic Acid	THCA	96,77±0,56	249,9±2,2
Cannabinol	CBN	96,32±0,56	251,4±2,2
Cannabidiol	CBD	99,42±0,56	250,2±2,2
Cannabidiolic Acid	CBDA	99,45±0,56	250,0±2,2
(±)-Cannabichromene	CBCR	94,75±0,57	249,6±2,2
Cannabidivarin	CBDV	99,20±0,56	250,1±2,2
Cannabigerol	CBG	99,65±0,56	249,5±2,2
Cannabigerolic Acid	CBGA	97,31±0,56	250,1±2,2

➤ Standartların hazırlanması:

Çözelti içerisindeki istenilen mg/L'a göre hesaplanarak tartılan kannabinoidin saf standartı ya da karışık kannabinoid standartı gerekli MeOH içerisinde VORTEX cihazla karıştırarak çözündürüldü.

➤ Mobil faz hazırlanması:

- Mobil faz A %0,1 (v/v) asetik asit içeren asetonitril: 1 litre asetonitril içinde 1 ml asetik asit.
- Mobil faz B %0,1 (v/v) asetik asit içeren su: 1 litre ddH₂O içinde 1 ml asetik asit.

3.4. Örneklerin Hazırlanması

Laboratuvara ulaştırılan kenevir bitkisi numuneleri düşük sıcaklık uzun süre kombinasyonunda (35 °C'de 48 saat olarak) etüvde kurutulmuşlardır. Kurutulan bitki örnekleri laboratuvar tipi değirmen kullanılarak öğütülmüş ve ardından yine laboratuvar tipi eleme cihazı kullanılarak parçacık çapları eşit büyüklükte numuneler elde edilmiştir. Bu işlemin ardından numuneler analiz edilinceye kadar 50 mL santrifüj tüpleri içinde karanlık ortamda oda koşulları altında muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.5. Laboratuvara ulaştırılan kenevir numunelerinin örnek hazırlama aşamaları

3.5. Örneklerin Dekarboksile Edilmesi

Dekarboksilasyon işlemi bir karbon zincirinden karbon atomunun uzaklaştırılarak karboksilik asitlerin reaksiyonunu ifade etmektedir. Bu işlem sırasında numunelere sıcaklık uygulanarak numunelerde mevcut asit formdaki kannabinoid molekülleri yapılarında bulunan CO₂'in uzaklaştırılmasıyla bu moleküllerin dekarboksile formu olan nötr kannabinoidlere dönüştürülmektedir (Kotra vd. 2019).

Belirtilen reaksiyonun meydana gelmesi için elde edilen kurutulmuş ve öğütülmüş kenevir numunelerin kritik sıcaklıklara ısıtılması ve böylelikle yapıda bulunan CO₂'in buharlaştırılması gerekmektedir. Bu kapsamda farklı sıcaklık ve süre değerlerinde denemeler gerçekleştirilerek numunedeki CBDA azalışı ve CBD oluşumu izlenmiş ve en yüksek verimlilikte CBD elde edilebilmesi için kritik değerler yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planlamalarından yararlanarak belirlenmiştir.

Bu kapsamda hazırlanan numuneler Çizelge 3.5'te belirtilen deneme planı çerçevesinde farklı sıcaklık ve sürelerde ısıtılma işlemine tabi tutulmuşlardır.

Çizelge 3.5. Dekarboksilasyon işlemine ait deneme planı

DENEME NO	Sıcaklık (°C)	Süre(dak)
1	95,00	20,00
2	145,00	20,00
3	95,00	60,00
4	145,00	60,00
5	84,64	40,00
6	162,04	40,00
7	120,00	11,72
8	120,00	73,64
9	120,00	40,00
10	120,00	40,00
11	120,00	40,00
12	120,00	40,00
13	120,00	40,00



Şekil 3.6. Numunelere uygulanan dekarboksilasyon işlemlerine ait bir görsel

3.6. Örneklerden Majör Kannabinoidlerin Ekstrakte Edilmesi

Belirlenen materyal kullanılarak majör kannabinoidlerin ekstrakte edilebilmesi amacıyla literatür çalışmaları ışığında aşağıda belirtilen dört farklı ekstraksiyon tekniği denenmiştir:

- Dinamik maserasyon
- Ultrasonik destekli ekstraksiyon
- Zeytinyağı ekstraksiyon
- Süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu

Ekstraksiyon teknikleri ve şartları karşılaştırmak için yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planlamasından yararlanılmış ve denemeler sonucunda kannabinoidlerin konsantrasyonu HPLC sisteminde analiz edilerek ilgili ekstraksiyon yöntemine ait en uygun parametrik değerler tespit edilmiştir. Ekstraksiyon çalışmaları kapsamında uygulanan tekniklere ilişkin detaylar aşağıda başlıklar halinde detaylandırılmıştır.

3.6.1. Dinamik maserasyon

Bu teknikte analizler için uygun hale getirilen materyal çeşitli çözücüler kullanılarak Çizelge 3.6'da belirttiği gibi farklı dilüsyon oranı, sıcaklık ve süre kombinasyonlarında sıcaklığı kontrol edilebilir çalkalamalı inkübatör cihazı yardımıyla muamele edilmişlerdir. Süre sonunda uygun şekilde dilüe edilerek (400 µl + 600 µl MeOH) 0,45 µm PTFE şırınga ucu filtreden geçirilerek HPLC sisteminde kannabinoid profilleri yönünden analiz edilmişlerdir. Belirtilen amaçla denemeler kapsamında etanol, metanol, diklorometan, aseton, n-hekzan ve su çözücülerini kullanılmıştır.

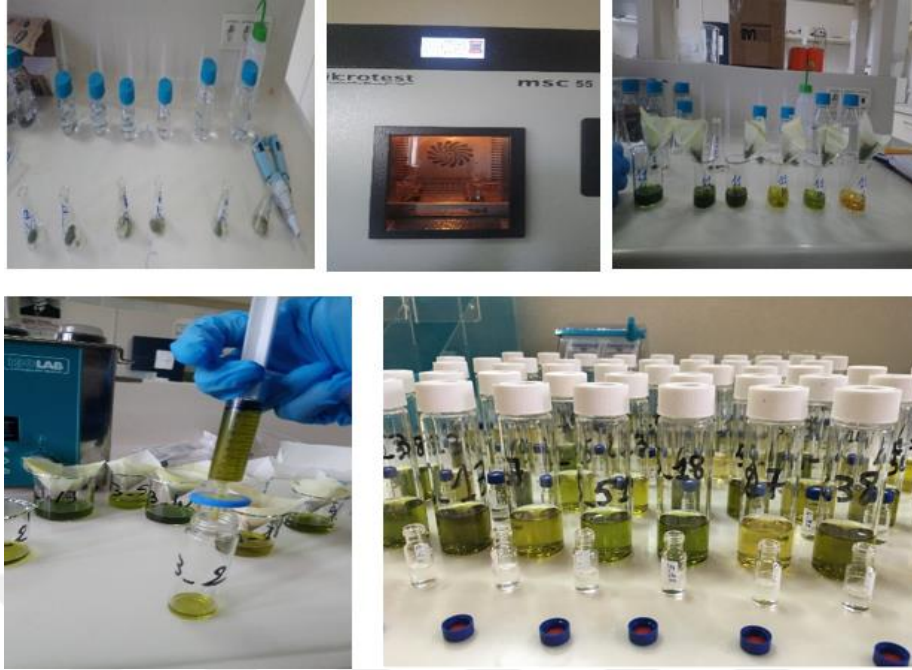
Analizler sonucunda en yüksek ekstraksiyon verimliliğinin tespit edildiği çözücü türü, sıcaklık ve süre değerleri belirlenmiştir. En uygun ekstraksiyon şartlarının oluşturulmasında yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planlamalarından yararlanılmıştır.

Çizelge 3.6. DM tekniğine yönelik istatistiksel deneme planı

DENEME NO	Dilüsyon oranı (kat)	Sıcaklık °C	Süre (dak)
1	40,00	30,00	20,00
2	40,00	50,00	20,00
3	40,00	30,00	40,00
4	40,00	50,00	40,00
5	60,00	30,00	20,00
6	60,00	50,00	20,00

Çizelge 3.6'nın devamı

7	60,00	30,00	40,00
8	60,00	50,00	40,00
9	33,18	40,00	30,00
10	50,00	40,00	46,82
11	50,00	23,18	30,00
12	50,00	40,00	13,18
13	50,00	40,00	30,00
14	50,00	40,00	30,00
15	50,00	40,00	30,00
16	50,00	40,00	30,00
17	50,00	40,00	30,00
18	50,00	40,00	30,00
19	50,00	56,82	30,00
20	66,82	40,00	30,00



Şekil 3.7. DM tekniğinin farklı aşamalarına yönelik görseller

3.6.2. Ultrason destekli ekstraksiyon tekniği

Belirtilen ekstraksiyon tekniğinin uygulanmasında DM tekniğinde ekstraksiyon verimliğinde en yüksek etkiye sahip çözügen olarak belirlenen etanol çözücüsü kullanılmış ve bu çözügen ortamında UAE denemeler gerçekleştirilmiştir.

Denemeler sırasında ultrasonik banyo ve ultrasonik prob olmak üzere iki farklı türde uygulama yapılmıştır.

3.6.2.1. Ultrasonik banyo ekstraksiyon tekniği

Kullanılan ultrasonik banyoya ait ultrasonik işlemci 37 kHz frekansında ve 160 watt gücündedir. Ultrasonik banyo destekli ekstraksiyon tekniğinin optimize edilmesinde Çizelge 3.7’de belirttiği gibi ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi değerleri bağımsız değişkenler olarak incelenmiştir. En yüksek verimlilikte kannabidiol ekstraksiyonunun sağlanması için belirtilen parametrelere ait en uygun değerlerin belirlenmesinde yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planlamasından yararlanılmıştır.

Çizelge 3.7. Ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilen UAE için deneme planı

DENEME NO	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)
1	30,00	15,00
2	60,00	15,00
3	30,00	45,00
4	60,00	45,00
5	23,79	30,00
6	70,23	30,00
7	45,00	8,79
8	45,00	55,23
9	45,00	30,00
10	45,00	30,00
11	45,00	30,00
12	45,00	30,00
13	45,00	30,00

Ultrasonik banyo kullanılarak UAE tekniğinin uygulanması aşağıdaki işlem aşamalarını içermektedir.

- Cam şişelerde 0,25 gr kenevir bitkisi tartılıp üzerine 10 ml EtOH eklenmiştir.
- 10 dakika Çizelge 3.7’de belirtilen sıcaklık değerlerinde su banyosunda bekletilerek termal stabilizasyon sağlanmıştır.
- Çizelge 3.7’de belirtilen farklı sıcaklık ve süre koşullarında numunelere ultrason uygulaması yapılmıştır.
- İşlem sonucunda elde edilen ekstrakt kağıt filtreden geçirilerek şişenin kenarındaki kalan örneğe 10 ml EtOH eklenmiş ve aynı kağıt filtre üzerinden süzülmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen filtrat 0,45 µm filtreden de geçirilmiştir.
- Temizlenmiş ekstraktan 400 µl alınıp üzerine 600 µl MeOH eklenerek HPLC vialine alınmış ve analiz edilmiştir.



Şekil 3.8. Ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilen UAE için işlem aşamaları

3.6.2.2. Ultrasonik prob ekstraksiyon tekniği

UAE tekniğinde kullanılan bir diğer yöntem olan ultrasonik prob uygulamasında 23 kHz frekansında ve en fazla 750 watt gücünde prob şeklinde dizayn edilmiş bir ultrasonikatör kullanılmıştır. Ultrasonik prob ekstraksiyon tekniğinin optimize edilmesinde Çizelge 3.8’de belirttiği gibi ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve ultrasonik güç oranı değerleri bağımsız değişkenler olarak kabul edilmiştir. En yüksek verimlilikte kannabinoid ekstraksiyonunun sağlanması için belirtilen parametrelere ait en uygun değerlerin belirlenmesinde yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planlamasından yararlanılmıştır.

Çizelge 3.8. Ultrasonik prob kullanılarak gerçekleştirilen UAE için deneme planı

DENEME NO	Ultrasonik güç oranı (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	60,00	30,00	60,00
2	90,00	30,00	60,00
3	60,00	60,00	60,00
4	90,00	60,00	60,00
5	60,00	30,00	180,00
6	90,00	30,00	180,00
7	60,00	60,00	180,00
8	90,00	60,00	180,00
9	49,77	45,00	120,00
10	100,23	45,00	120,00

Çizelge 3.8'in devamı

11	75,00	19,77	120,00
12	75,00	70,23	120,00
13	75,00	45,00	19,09
14	75,00	45,00	220,91
15	75,00	45,00	120,00
16	75,00	45,00	120,00
17	75,00	45,00	120,00
18	75,00	45,00	120,00
19	75,00	45,00	120,00
20	75,00	45,00	120,00

Ultrasonik prob kullanılarak UAE tekniğinin uygulanması aşağıdaki işlem aşamalarını içermektedir.

- 1 gr kenevir bitkisi üzerine 40 ml EtOH eklenilerek karıştırılmıştır.
- 10 dakika Çizelge 3.8'de belirtilen sıcaklık değerlerinde su banyosunda bekletilerek termal stabilizasyon sağlanmıştır.
- Çizelge 3.8'de belirtilen farklı ultrasonik güç oranı, sıcaklık ve süre koşullarında numunelere ultrason uygulaması yapılmıştır.
- İşlem sonucunda elde edilen ekstrakt kağıt filtreden geçirilerek şişenin kenarındaki kalan örneğe 10 ml EtOH eklenmiş ve aynı kağıt filtre üzerinden süzülmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen filtrat 0,45 µm filtreden de geçirilmiştir.
- Temizlenmiş ekstraktan 400 µl alınıp üzerine 600 µl MeOH eklenerek HPLC vialine alınmış ve analiz edilmiştir.



Şekil 3.9. Ultrasonik prob kullanılarak gerçekleştirilen UAE için işlem aşamaları

3.6.3. Zeytinyağı ekstraksiyon tekniği

Ekstraksiyon işlemleri için hazırlanan kenevir bitkisinin numunelerindeki CBD aktif maddesinin zeytinyağı fazında ekstraksiyonu Deidda vd. (2019) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. İlgili yöntemle göre; 2 gram civarında hazırlanmış numune ile 3-36 mL zeytinyağı bir beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmış ve ardından farklı sıcaklık ve sürelerde bekletilerek filtre edilmiştir. İşlem sonucunda zeytinyağı fazına geçen kannabinoidlerin konsantrasyonu HPLC sisteminde analiz edilerek belirlenmiştir.

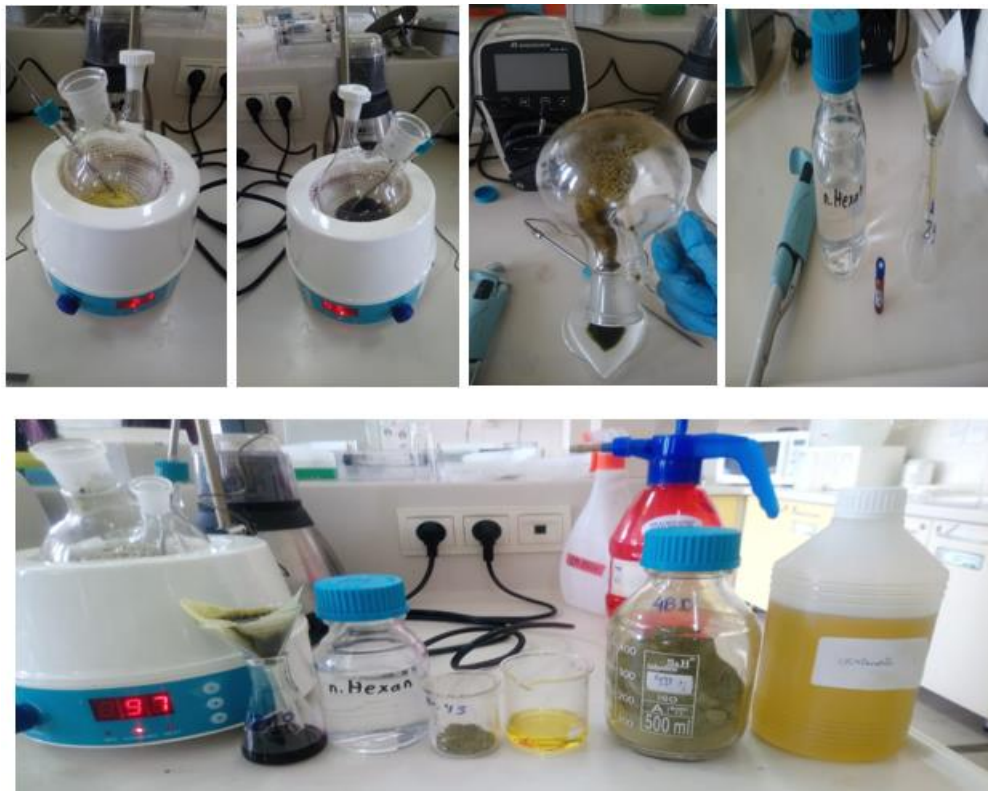
İlgili yöntemin en uygun hale getirilmesinde kullanılması planlanan modelleme çalışmasında bağımsız değişkenler olarak zeytinyağı dilüsyon oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve süre değerleridir. En uygun parametrik değerlerin belirlenmesinde yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planlamasından yararlanılmıştır.

Çizelge 3.9. Zeytinyağı ekstraksiyonu için deneme planı

Deneme No	Zeytinyağı Dilüsyon oranı (kat)	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	5,00	70,00	40,00
2	15,00	70,00	40,00
3	5,00	130,00	40,00
4	15,00	130,00	40,00
5	5,00	70,00	120,00
6	15,00	70,00	120,00
7	5,00	130,00	120,00
8	15,00	130,00	120,00
9	1,59	100,00	80,00
10	18,41	100,00	80,00
11	10,00	49,54	80,00
12	10,00	150,45	80,00
13	10,00	100,00	12,73
14	10,00	100,00	147,27
15	10,00	100,00	80,00
16	10,00	100,00	80,00
17	10,00	100,00	80,00
18	10,00	100,00	80,00
19	10,00	100,00	80,00
20	10,00	100,00	80,00

Zeytinyağı tekniğinin uygulanması aşağıdaki işlem aşamalarını içermektedir:

- Çizelge 3.9'da belirtilen oranda zeytinyağı içinde termal bir prob olan balona konulmuş ve ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı bir balon ısıtıcısına yerleştirilmiştir. Balon ısıtıcısının sıcaklığı çizelgede belirtilen sıcaklık değerine ayarlanarak termal stabilizasyon sağlanmıştır.
- Hazırlanan zeytinyağı içine 2 gr hazırlanmış kenevir ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcısı çalıştırılarak Çizelge 3.9'a belirtilen süre değerleri başlatılmıştır.
- Süre bitince balon ısıtıcıdan alınmış ve ekstrakt bir kağıt filtreden geçirilerek bir erlen içinde toplanmıştır.
- Elde edilen ekstraktan 10 µl alınıp üzerine 990 µl n-hekzan eklenilmiş ve kannabinoid profilini belirlemek üzere HPLC sisteminde analiz edilmiştir.



Şekil 3.10. Zeytinyağı ekstraksiyon tekniğinin işlemleri

3.6.4. Süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu tekniği

Numunelerde mevcut kannabinoid aktif maddelerinin SFE ile ekstrakte edilmesi çalışmaları bazı değişiklikler yapılarak (Rovetto ve Aieta 2017) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Denemeler sırasında en yüksek verimlilikte kannabinoid ekstraksiyonu elde edilebilmesi amacıyla optimizasyon işlemlerinde yer alan değişken parametreler karbondioksit basıncı ve ekstrakte ilave edilen EtOH değişkenleri olarak uygulanmıştır. Gerçekleştirilen uygulamalarda ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C olarak sabit tutulmuştur. Belirtilen tekniğin uygulamasında her bir denemede

yüksek miktarda örneğin kullanılması ve bunun karşılığında tüm ekstraksiyon çalışmaları için yeterli düzeyde bitkisel materyal bulunmaması nedeni ile SFE'nin çalışmaları yanıt yüzey yöntemine göre değil sadece birkaç parametrenin değiştirilmesi suretiyle gerçekleştirilebilmiştir.

Çizelge 3.10. SFE çalışmaları deneme planlaması

Örnek	Karbondiyoksit basıncı (bar)	Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	EtOH oranı (%)
1	300	50	0
2	300	50	0
3	200	50	5
4	200	50	5



Şekil 3.11. SFE cihazı ve numunenin ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt

3.7. Örneklerindeki Majör Kannabinoid Düzeylerinin Belirlenmesi

Kenevir bitkisinin numunelerinde mevcut kannabinoidlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi bazı küçük değişiklikler yapılarak (Brighenti vd. 2017) tarafından bildirilen kromatografik yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Önerilen yöntemle göre kannabinoidlerin düzeylerinin belirlenmesi için hazırlanan numuneler HPLC cihazında oluşturulan kalibrasyon aralığına düşecek şekilde bir volumetrik flask içinde metanol kullanılarak seyreltilmiştir. Dilüsyon sonrası hazırlanan preparatlar 0,45 µm PTFE şırınga ucu filtreden geçirilmiş, HPLC vialine alınmış ve Çizelge 3.11’de belirtilen şartlar altında analiz edilmiştir.

Çizelge 3.11. HPLC cihazı analitik koşulları

Cihaz	Agilent 1200 Series
Dedektör	Diode Array Detector (DAD)
Kolon	ODS3 Intersil (4,6 x 250 mm) 5µm
Akış hızı	1 mL/dak
Kolon sıcaklığı	30°C
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Dalga boyu	210 – 220 nm
Mobil faz	(A)%0,1 (v/v) asetik asit içeren asetonitril; (B) %0,1 (v/v) asetik asit içeren ultra saf su
Mobil faz profili	%65 A, %35 B (izokratik)

Numunelerde kromatografik yöntem yardımıyla CBD, Δ9-THC ve bitkideki sentez yolağının sonu olan CBD'den önce açığa çıkan CBDA, THCA, Δ8-THC, CBDV, CBCR, CBG, CBGA ve CBN bileşenleri düzeyleri belirlenmiştir. İlgili aktif maddelerin tespit edilebilmesi amacıyla kromatografik yöntem en uygun şekilde modifiye edilmiş ve 3.8. bölümde belirtilen “Yöntem Doğrulama Çalışmaları” kapsamında valide edilmiştir.

3.8. Yöntem Doğrulama Çalışmaları

3.8.1. Doğruluk

Doğruluk testi geri kazanım çalışması yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda kalibrasyon grafiğinin düşük, orta ve yüksek ölçüm noktalarına uygun gelecek şekilde üç farklı derişim denenmiştir. Analitleri içeren standart çözelti geri kazanım çalışma örneklerine eklenmiş ve çalışma en az 6 paralel örnek hazırlanarak yapılmıştır. Hazırlanan örnekler HPLC cihazına üç kez enjekte edilmiş ve elde edilen sonuçlardan ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım değeri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Taverniers, De Loose vd. 2004).

$$\% \text{geri kazanım} = (C1 - C2) / C3 \times 100$$

C1 = Analit eklenmiş örnek, C2 = Analit eklenmemiş örnek, C3 = Eklenen miktar

3.8.2. Kesinlik

Bu çalışmalarda çıkış zamanı kesinliği, standart madde ve örnek ile yapılan enjeksiyonlarda elde edilen derişim değerine yönelik tekrarlanabilirlik değerleri değerlendirilmiştir. Çalışmalardan elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri tekrarlanabilirlik kesinliğini belirlemek için kullanılmıştır (Taverniers, De Loose vd. 2004).

3.8.3. Seçicilik

Seçicilik testinin amacı, analiz edilen maddenin (analit) matriksin yanında doğru olarak ölçülüp ölçülemediğinin belirlenmesidir. Bu amaçla HPLC cihazında bir boş enjeksiyon, analitleri içeren çözeltilerin enjeksiyonları ve analit ilave edilmiş örneklerin enjeksiyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiştir.

3.8.4. Tespit sınırı ve ölçüm sınırı (LOD ve LOQ)

Bu değerlerin belirlenmesi amacıyla kalibrasyon doğrusunda kullanılan en düşük derişimdeki analiz çözeltilerinin HPLC cihazına 10 kez enjeksiyon yapılarak ve elde edilen pik alanlarının standart sapması hesaplanmıştır. Standart sapma değerinin 3 katı tespit sınırı ve 10 katı ölçüm sınırı olarak belirtilmiştir (Taverniers, De Loose vd. 2004).

3.8.5. Doğrusallık

Bu çalışma için en az 6 farklı derişim noktasında ve üç kez cihaza analitlerin standart çözeltileri enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar HPLC cihazına ait Chemstation yazılımı ile değerlendirilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Aynı zamanda elde edilen veriler Minitab istatistik programı ile de değerlendirilerek sonuçlar teyid edilmiştir.

3.8.6. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında analiz metodunun ölçüm sonuçları üzerine kalitatif ve kantitatif olarak etkisi olacak sapmalar karşısındaki performansı değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sırasında analiz metodu farklı sıcaklık ve süre değerlerinde testlere tabi tutularak ölçüm sonuçları üzerine olumsuz etkisi olan bir durum oluşup oluşmadığı belirlenmiştir. Ayrıca hazırlanan ara stok ve çalışma standartları farklı günlerde HPLC cihazına enjekte edilerek standartların zaman içindeki bozunma durumları belirlenmiştir. Belirtilen aktif maddelerden bazılarının araştırılan numunede tespit edilememesi durumunda ilgili maddeler için HPLC cihazında analitik standartlar kullanılarak kesinlik, seçicilik, tespit sınırı ve ölçüm sınırı, doğrusallık ve sağlamlık çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

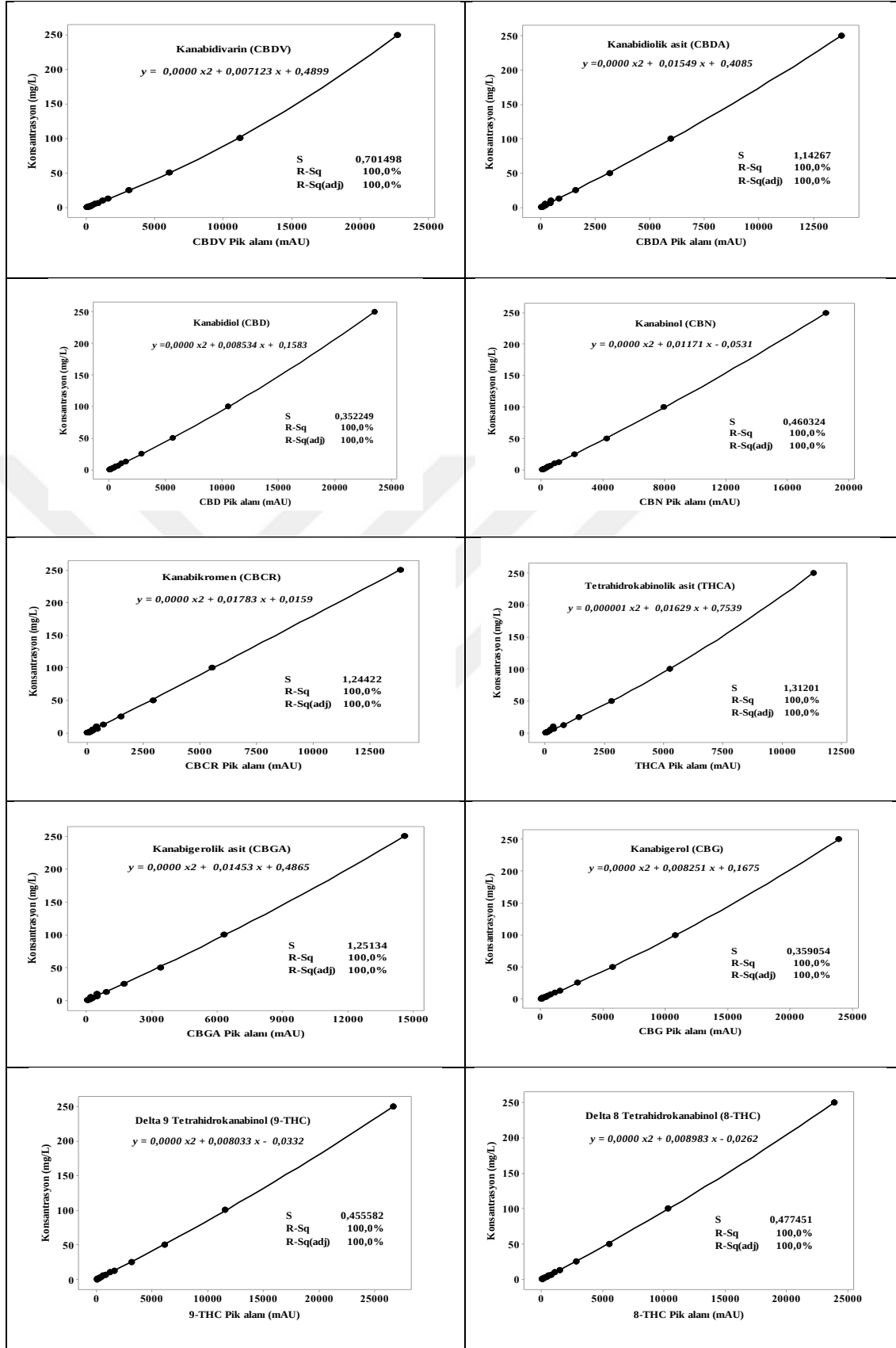
Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi için Yanıt Yüzey Yöntemi deneme tasarımı kullanılmıştır. İlgili tasarımın kullanılmasında MİNİTAB istatistiksel paket programından yararlanılmıştır. Tasarımda her bir değişken üç seviyede incelenmiş olup merkez noktada 3 tekrar yapılmıştır. Optimizasyon işleminde, ekstrakte edilen kannabinoidlerin konsantrasyonları üzerindeki belirtilen parametrelerin birinci ve ikinci dereceden etkileri ve birbirleriyle muhtemel etkileşimleri istatistiksel olarak incelenmiştir. Analizler sonucunda işlem parametrelerinin etkili olduğu modeller kullanılarak bu parametrelerin etkilerini gösterir 3-D yanıt yüzeyler oluşturulmuştur. Bulgular istatistiksel olarak değerlendirilirken Student's t-testi yapılmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında ve $p < 0,05$ anlamlılık seviyesinde değerlendirilmiştir. Özelliklere ait tanımlayıcı görsellerin oluşturulmasında Minitab 18 ve Microsoft Excell yazılımlarından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. HPLC Parametrelerinin Optimizasyonu

HPLC parametrelerinin optimizasyonun çalışmaları kapsamında öncelikle temin edilen analitik standartlar kullanılarak HPLC cihazında çalışmada kullanılacak analitik yöntemin geliştirilme çalışmaları gerçekleştirilmiş olup sonrasında deneme serasında yetiştirilen bitki örneklerinde analizler yapılarak bitkilerde bulunan kannabinoidlerin tespit edilebilme durumları değerlendirilmiştir. Bu çerçevede deneme çalışmalarına Çizelge 3.11’de sunulan analitik şartlar altında hazırlanan HPLC cihazında standart okumaları gerçekleştirilmiş ve analitik standarttaki aktif maddelerin ayrılabilmesi ve en yüksek pik cevabı üretebilmeleri dikkate alınarak HPLC cihazının mobil faz bileşimi, kolon akış oranı, kolon sıcaklığı ve dedektör dalga boyu değerleri en uygun hale getirilmiştir.

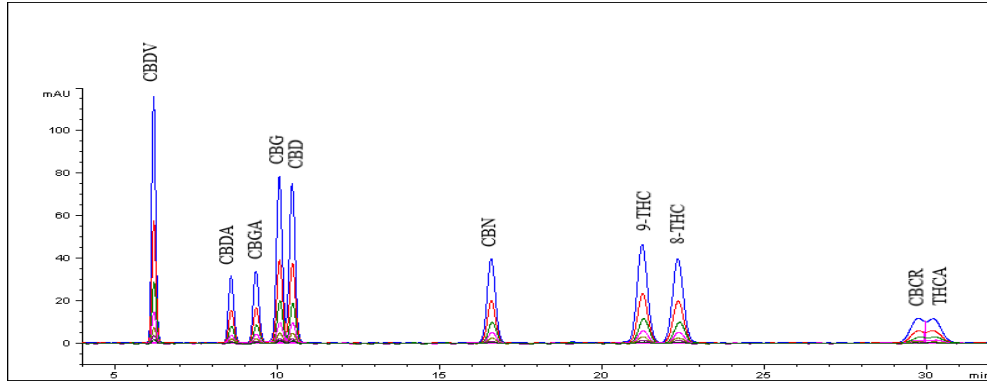
Belirlenen optimum şartlarda kannabinoidlere ait elde edilen bazı metot doğrulama bulguları Çizelge 4.1’de, kalibrasyon grafikleri Şekil 4.1’de, analitik standartların enjeksiyonundan elde edilen örnek bir kromatogram Şekil 4.2’de ve çalışma kapsamında kannabinoid profilleri incelenen bazı bitki örneklerine ait örnek kromatogramlar Şekil 4.3’te sunulmaktadır.



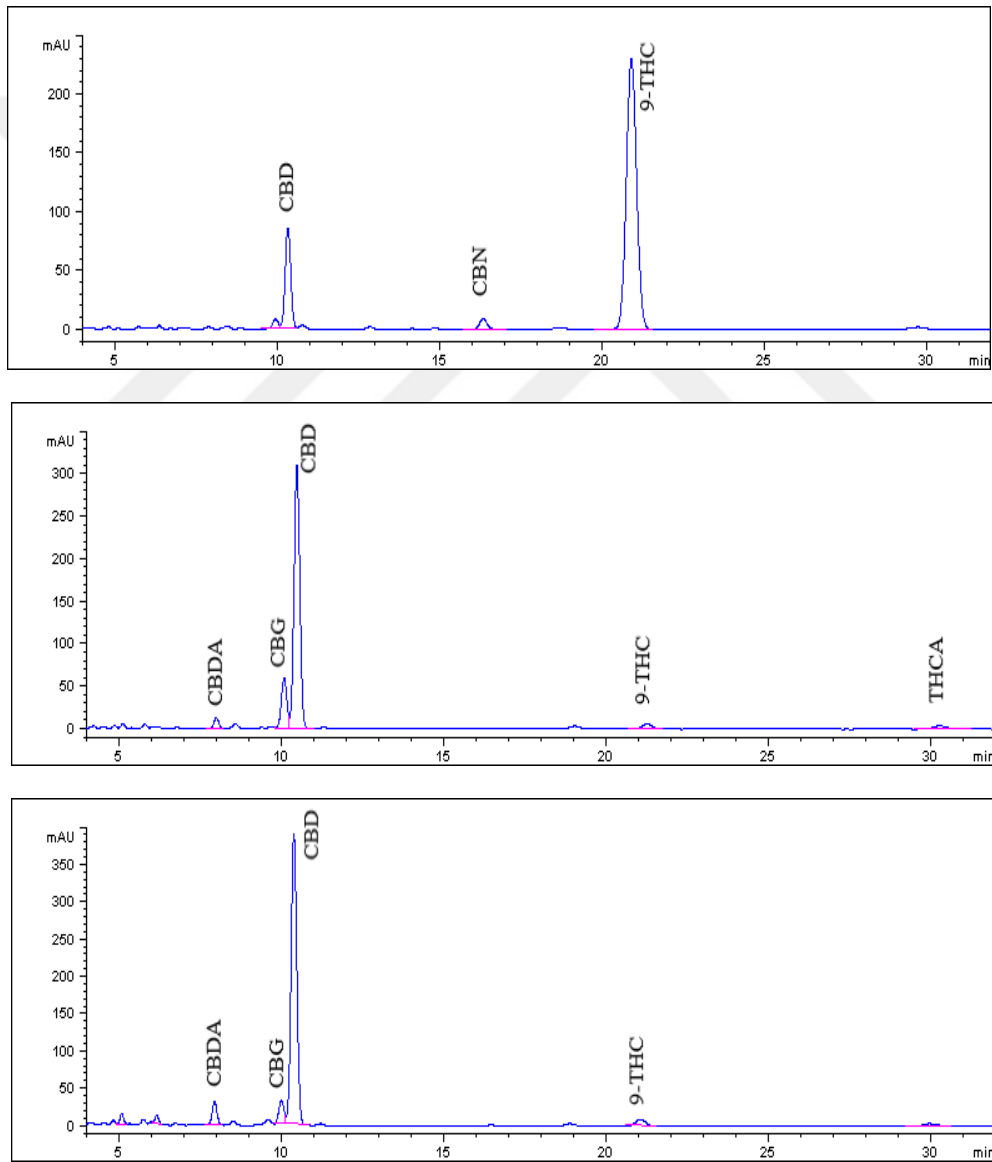
Şekil 4.1. Kannabinoidlere ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.1. Kannabinoidlere ait bazı yöntem doğrulama bulguları

Kannabinoid	Kısaltma	Doğrusal aralık (mg/L)	Kalibrasyon denklemi	r^2	Çıkış zamanı (dak)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	RSD (%)
Kannabidivarin	CBDV	0,51-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,007123 x + 0,4899$	1,00	6,19	0,15	0,51	3,44
Kannabidiolik asit	CBDA	0,85-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,01549 x + 0,4085$	1,00	8,58	0,26	0,85	2,86
Kannabigerolik asit	CBGA	0,48-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,01453 x + 0,4865$	1,00	9,35	0,14	0,48	2,22
Kannabigerol	CBG	0,23-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,008251 x + 0,1675$	1,00	10,06	0,07	0,23	1,28
Kannabidiol	CBD	0,10-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,008534 x + 0,1583$	1,00	10,46	0,03	0,10	0,56
Kannabinol	CBN	0,55-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,01171 x - 0,0531$	1,00	16,59	0,16	0,55	3,24
Delta 9 Tetrahidrokannabinol	$\Delta 9$ -THC	0,63-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,008033 x - 0,0332$	1,00	21,24	0,19	0,63	3,76
Delta 8 Tetrahidrokannabinol	$\Delta 8$ -THC	0,59-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,008983 x - 0,0262$	1,00	22,34	0,18	0,59	3,54
Kannabikromen	CBCRA	1,09-250,00	$y = 0,0000 x^2 + 0,01783 x + 0,0159$	1,00	29,75	0,33	1,09	5,50
Tetrahidrokabinolik asit	THCA	0,85-250,00	$y = 0,000001 x^2 + 0,01629 x + 0,7539$	1,00	30,20	0,25	0,85	3,73



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kannabinoid içeren standartlara ait kromatogramlar



Şekil 4.3. Kenevir bitkisi örneklerinden elde edilen bazı HPLC kromatogramları

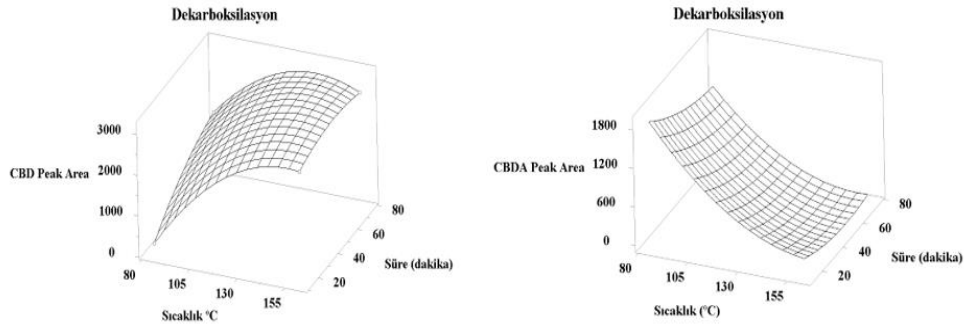
Bu kapsamında elde edilen bulgulara göre kenevir bitkisinde bulunan kannabinoidlerin belirlenen koşullar altında Bağlı (relatif) Standart Sapmalar $RSD \leq 5,50$, $LOD \leq 0,33$ mg/L ve $LOQ \leq 1,09$ mg/L düzeylerinde tanımlanabildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte standart madde ile gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasında düşük, orta ve yüksek konsantrasyon değerlerinde >95 değerinin üzerinde geri kazanım değeri elde edilmesine rağmen bitki örneklerine spayk edilmek suretiyle elde edilen geri kazanım değeri çalışması analitik standart miktarının düşük miktarda olması nedeni ile gerçekleştirilememiştir. Kullanılan analitik standartta her bir kannabinoid aktif maddesi için konsantrasyon değeri 250,00 mg/L'dir. Deneysel çalışmalarda kullanılan kenevir bitkisinin numunesi miktarı 0,25 gramdır. Gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışması sonucunda HPLC cihazına enjekte edilen çözeltideki seyreltme katsayısı 200 kat olarak uygulanmaktadır. LOQ seviyesinde (incelenen kannabinoidler için en yüksek LOQ değeri 1,09 mg/L'dir) bir sinyal elde edebilmek için hiçbir kannabinoid içermeyen numunede ekstraksiyon işlemleri başlangıcındaki konsantrasyonun 218,00 mg/L olması gerekmektedir. Belirtilen konsantrasyonun numunede ayarlanabilmesi için ise anastok kannabinoid çözeltisinden 218 µL alınması gerekmektedir. En az 3 tekrar yapılması gereken bu çalışma için ise toplamda sadece LOQ düzeyindeki bir geri kazanım için kannabinoid içermeyen kenevir bitkisinin numunesinde kullanılmak üzere 654 µL anastok kannabinoid standartına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte belirtilen düzey sadece LOQ düzeyindeki bir geri kazanım için gerekmektedir. Bunun haricinde de orta ve yüksek konsantrasyonlar için daha yüksek miktarlarda kannabinoid standartına ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut analitik standartımızın toplamda 1000 µL olması ve kannabinoid içermeyen bitkisel bir materyal bulunmaması nedenleri ile ilgili geri kazanım çalışmaları analitik standart kullanılarak gerçekleştirilebilmiştir.

Ayrıca çalışmalarda kullanılan tüm analitik standartlar için $r^2 = 1$ olarak tespit edilmiş ve belirtilen konsantrasyon aralıklarında metodun doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte kesinlik çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen analizlerde aynı konsantrasyondaki analitik standartın LOQ düzeyindeki konsantrasyonları 6 kez enjeksiyonu yapılmış ve elde edilen pik alanı büyüklükleri ve çıkış zamanı kaymaları değerlendirilmiştir. Pik alanı kesinlik değeri için %RSD değerleri CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN, Δ9-THC, Δ8-THC, CBCR ve THCA için sırasıyla %3,44, %4,95, %2,86, %1,41, %0,61, %3,14, %3,69, %3,49, %5,54 ve %5,54 olarak tespit edilmiştir. Buna ilave olarak ilgili kannabinoidlere ait çıkış zamanı kayması önemsiz düzeyde bulunmuştur.

Seçicilik kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda ise analitik standartın çözündürüldüğü çözücü olan MeOH sisteme enjekte edilmiş ve ardından analitik standart içeren MeOH enjekte edilmiştir. Gerçekleştirilen karşılaştırma çalışmasında analitik standart içermeyen MeOH enjeksiyonunda hiçbir pik gözlemlenemezken, analitik standart içeren çözücüde ilgili kannabinoidlere ait tüm pikler gözlemlenmiştir.

4.2. Dekarboksilasyon Koşullarının Optimizasyonu

Dekarboksilasyon koşullarının optimizasyonu çerçevesinde gerçekleştirilen uygulamalardan elde edilen CBDA ve CBD verilerine ait yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.4'de ve bu grafiklere göre uygulanması gereken en uygun sıcaklık ve süre değerleri Çizelge 4.2'de sunulmaktadır.

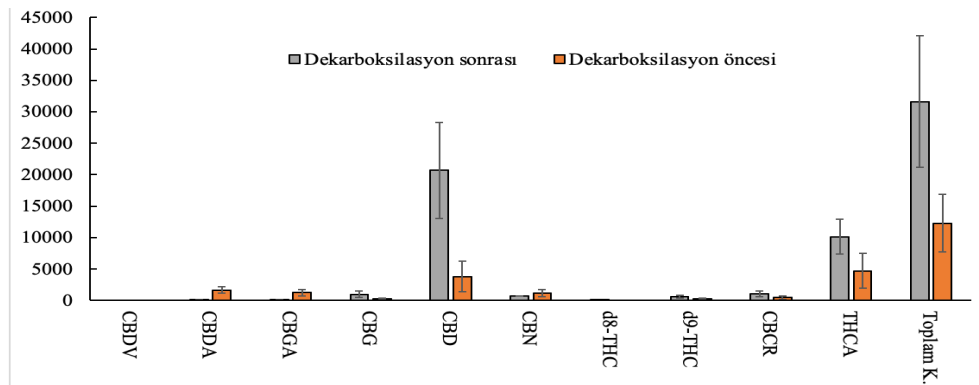


Şekil 4.4. Dekarboksilasyon işlemi sonucunda numunelerdeki CBD ve CBDA değişimine ait yanıt yüzey grafikleri

Çizelge 4.2. Yanıt yüzey yöntemine göre belirlenen en uygun dekarboksilasyon çalışma koşulları

Hedef	Sıcaklık	Süre	Konsantrasyon (mg/kg)
En fazla CBD	142,50	59,25	3147,99
En az CBDA	160,48	49,87	0,00

En uygun uygulama koşulları verilen dekarboksilasyon işleminin uygulanması sonucunda numunedeki kannabinoid profilinin değişimi Şekil 4.5'te gösterilmektedir.



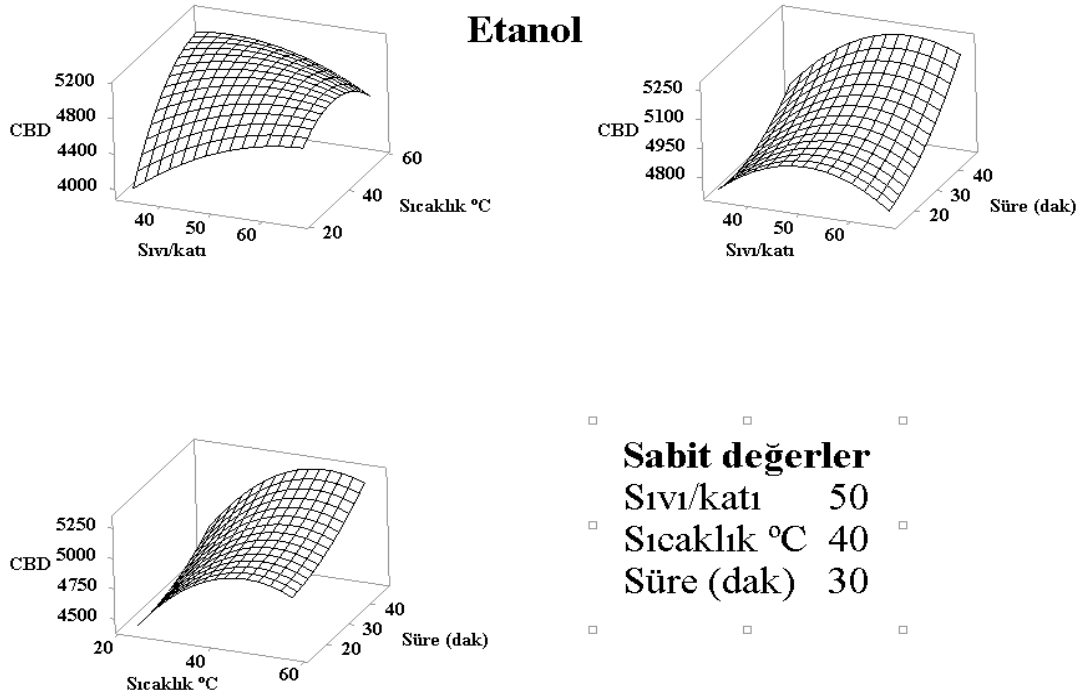
Şekil 4.5. Kenevir bitkisi örneğinin dekarboksilasyon öncesi ve sonrası kannabinoid değişimi (n=10)

Elde edilen bulgulara göre dekarboksilasyon işleminin bitkide bulunan asit formdaki kannabinoidleri aktif formdaki kannabinoidlere dönüştürdüğü sonucuna varılmıştır.

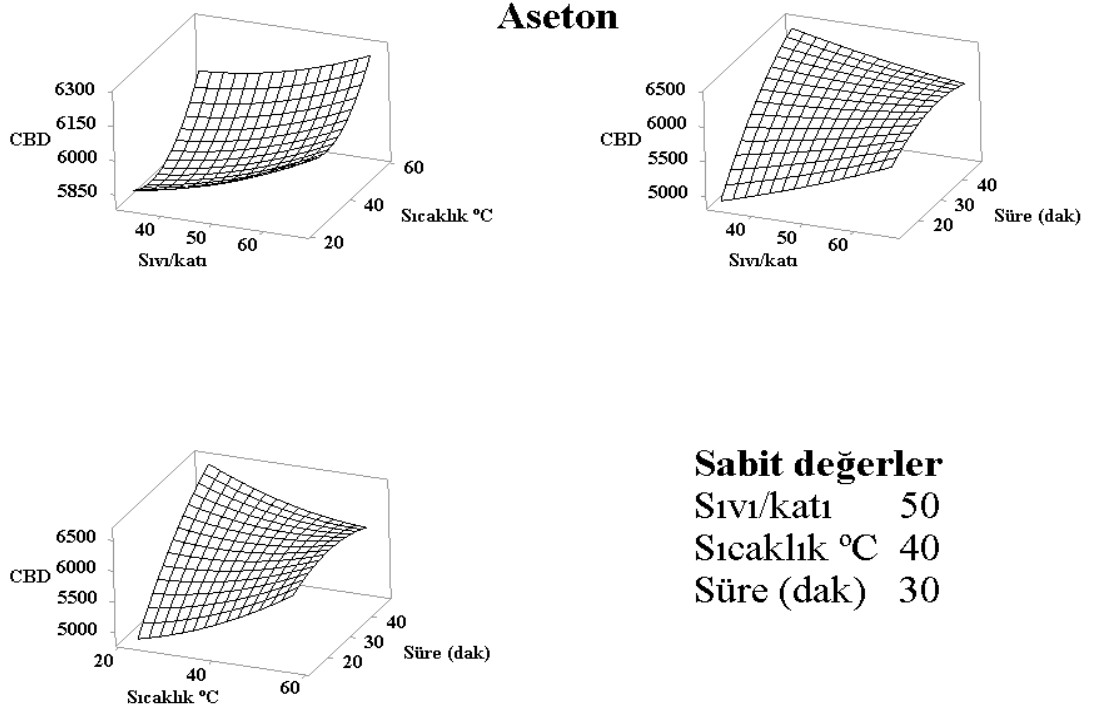
4.3. Kannabinoid Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

4.3.1. Dinamik maserasyon tekniği

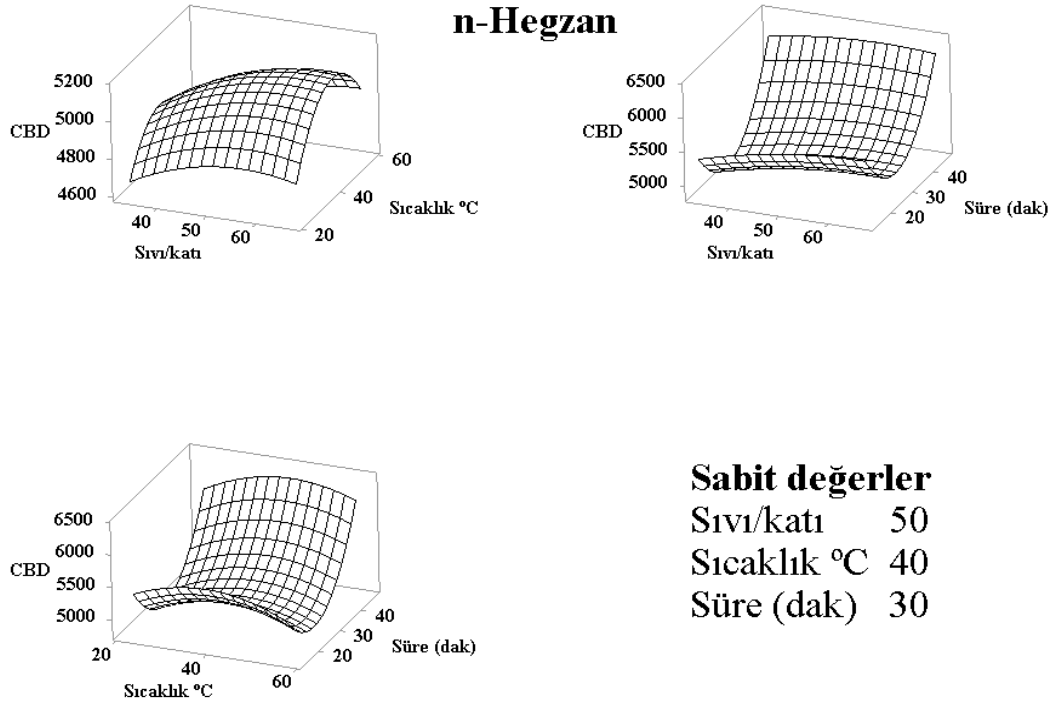
Yanıt Yüzey Yöntemi deneme tasarımının ve MİNİTAB kullanılarak kenevir bitkisinden kannabinoidlerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için denemeler sonucunda elde edilen yanıt yüzey grafikleri etanol için Şekil 4.6, aseton için Şekil 4.7, n-hekzan için Şekil 4.8, asetonitril için Şekil 4.9, ve metanol için Şekil 4.10'da sunulmaktadır.



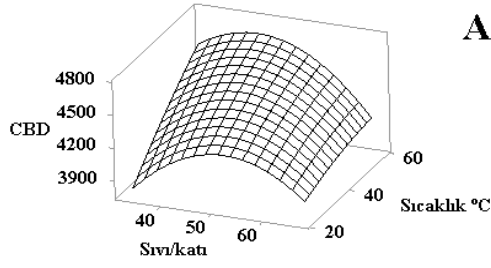
Şekil 4.6. Etanol çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri



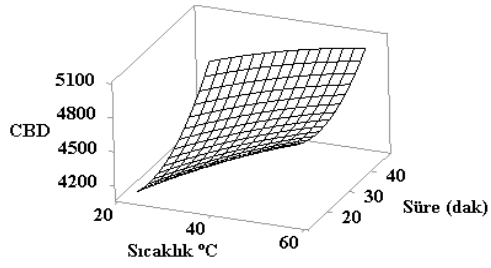
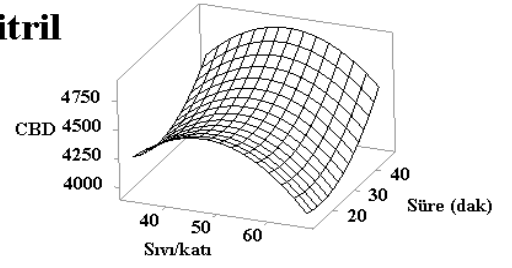
Şekil 4.7. Aseton çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri



Şekil 4.8. n-hekzan çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri



Asetonitril



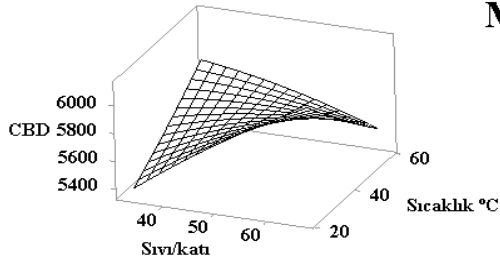
Sabit değerler

Sıvı/katı 50

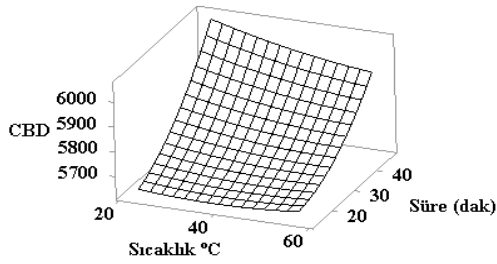
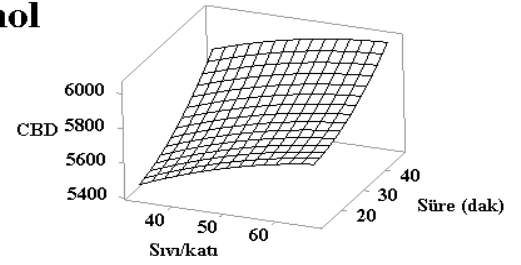
Sıcaklık °C 40

Süre (dak) 30

Şekil 4.9. Asetonitril çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri



Metanol



Sabit değerler

Sıvı/katı 50

Sıcaklık °C 40

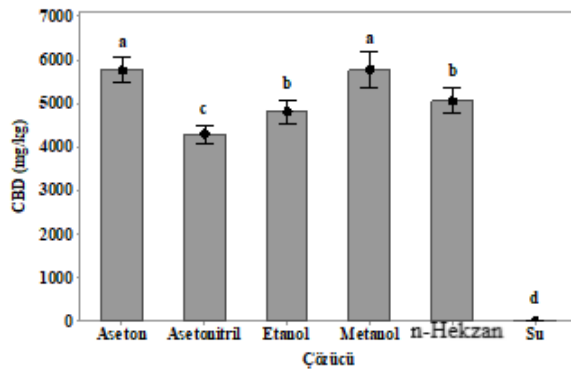
Süre (dak) 30

Şekil 4.10. Metanol çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafikleri

DM ekstraksiyonu çalışmalarında elde edilen yanıt yüzey grafikleri çerçevesinde belirlenen en uygun koşullar Çizelge 4.3'te çözeltilerin ekstrakte edilebilen CBD verimleri üzerine olan karşılaştırma grafiği Şekil 4.11'de sunulmaktadır.

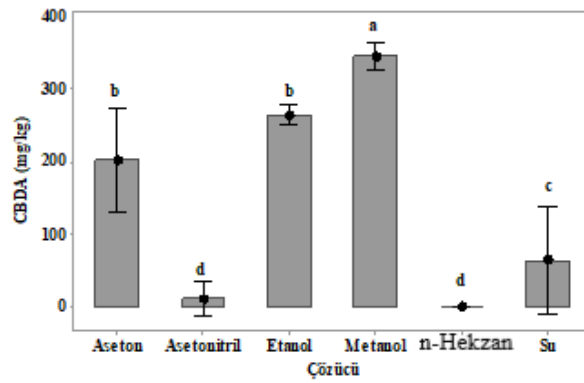
Çizelge 4.3. Farklı çözücüler kullanılarak maximum CBD ekstraksiyonu için en uygun şartlar

	Sıvı/katı oranı	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	CBD (mg/kg)
Etanol	48,81	49,34	46,82	5304,53
Metanol	66,82	23,18	46,82	6379,64
Aseton	33,18	23,18	46,82	6843,98
Asetonitril	46,09	56,82	46,82	5020,38
n-Hekzan	56,97	43,57	46,82	6327,15

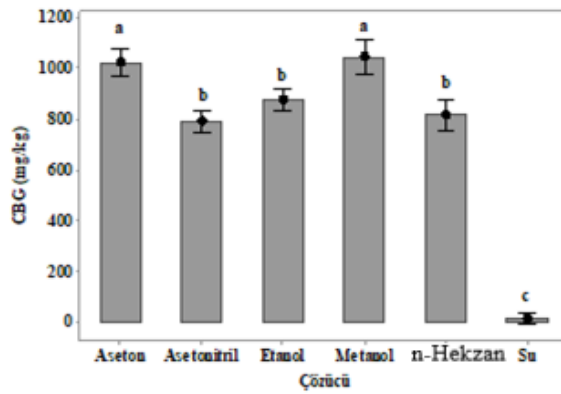


Şekil 4.11. Ekstrakte edilebilen CBD konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri

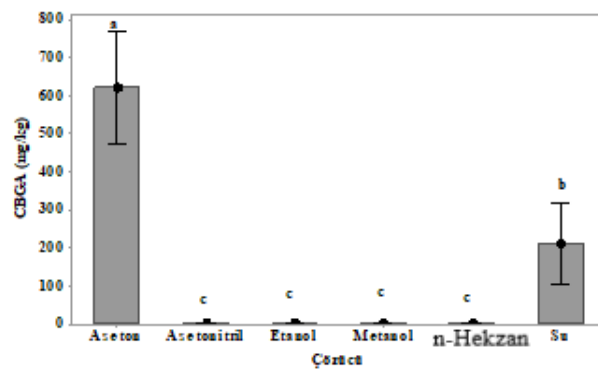
Şekil 4.11'de sunulan grafiğe göre numunelerde bulunan CBD'ün en yüksek verimlilikte ekstrakte edilmesinde istatistiksel olarak aseton ve metanol'ün en etkili olarak bulunduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte etanol ve n-hekzan'ın etkinlikleri arasında istatistiksel açıdan fark bulunmazken asetonitril en düşük etkiye sahip olan çözücü olarak belirlenmiştir. Çözücü olarak kullanılan suyun ise CBD ekstraksiyonu üzerine hiçbir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Grafiste sunulan çözücülerin etkinlikleri değerlendirildiğinde en yüksek etkiye sahip olduğu belirlenen asetonun yüksek maliyeti metanolün ise toksik özellikleri nedenleri ile CBD ekstraksiyonunda etanolün gerek maliyet gerekse non-toksik özelliklerinden dolayı uygun bir çözücü olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte tez kapsamında incelenen diğer kannabinoidlerden CBDA, CBG, CBGA, CBN, Δ^9 -THC ve CBDV üzerine çözücülerin etkinliklerini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de sunulmaktadır.



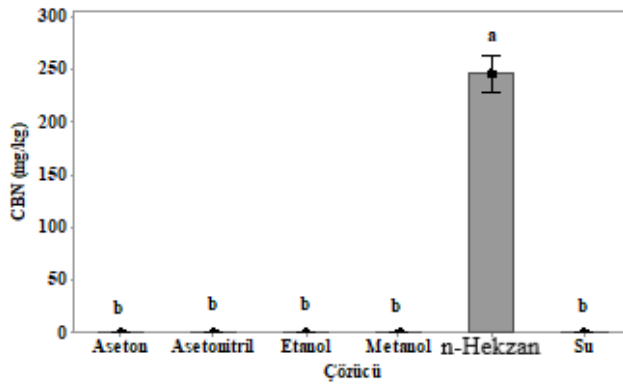
Şekil 4.12. Ekstrakte edilebilen CBDA konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri



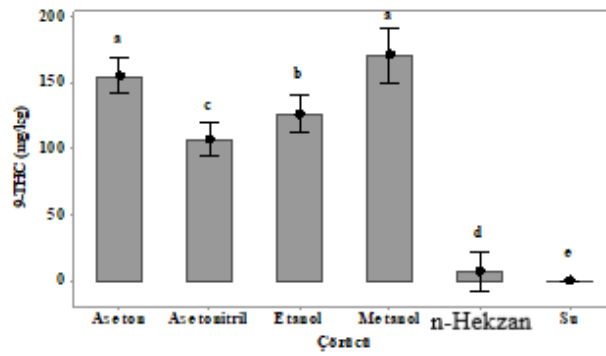
Şekil 4.13. Ekstrakte edilebilen CBG konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri



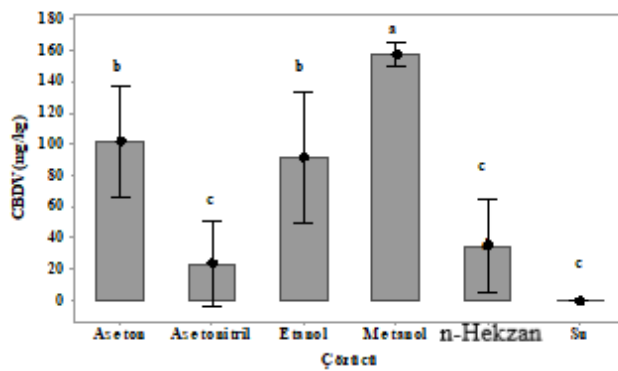
Şekil 4.14. Ekstrakte edilebilen CBGA konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri



Şekil 4.15. Ekstrakte edilebilir CBN konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri



Şekil 4.16. Ekstrakte edilebilir Δ9-THC konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri



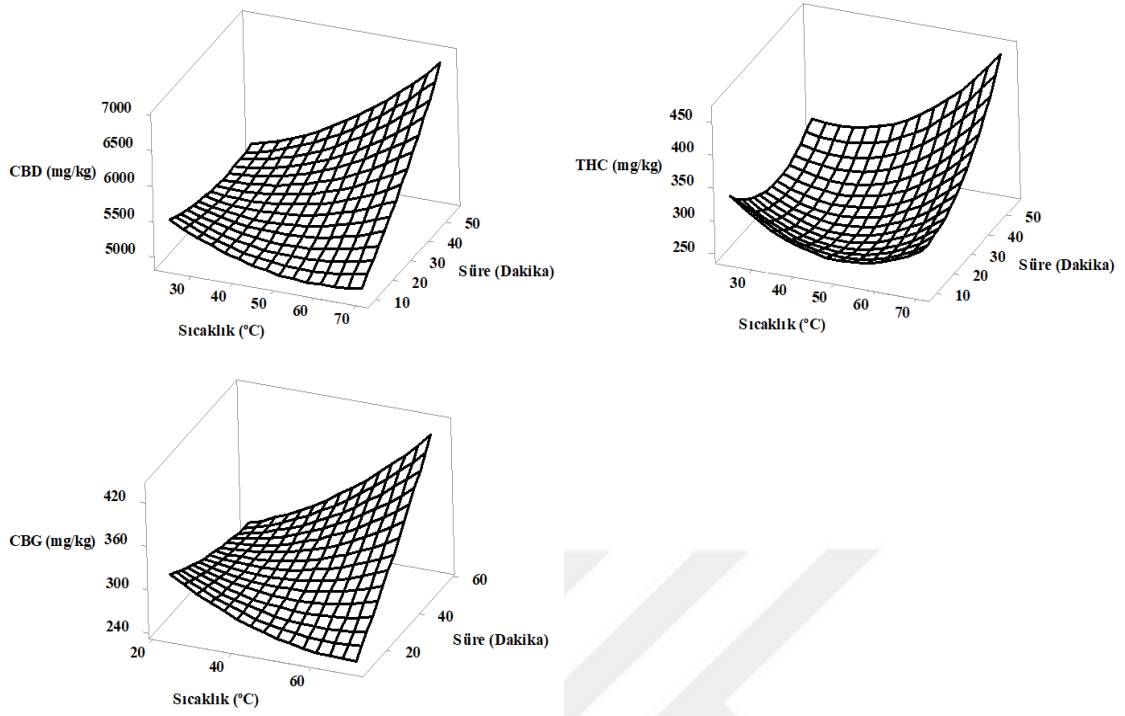
Şekil 4.17. Ekstrakte edilebilir CBDV konsantrasyonu üzerine farklı çözücülerin etkileri

DM ekstraksiyonu tekniği kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde ilgili çözücüler herbir kannabinoidin ekstraksiyonunda farklı etkiler göstermektedir. Bu kapsamda ekstrakte edilebilen kannabinoidler üzerine en etkili çözücüler CBD, CBG ve Δ^9 -THC için metanol ve aseton; CBDA ve CBDV için metanol; CBGA için aseton ve CBN için ise n-hekzan olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.11’de sunulan grafiğe göre numunelerde bulunan CBD’nin en yüksek verimlilikte ekstrakte edilmesinde istatistiksel olarak aseton ve metanol’ün en etkili olarak bulunduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte etanol ve n-hekzan’ın etkinlikleri arasında istatistiksel açıdan fark bulunmazken asetonitril en düşük etkiye sahip olan çözücü olarak belirlenmiştir. Çözücü olarak kullanılan suyun ise CBD ekstraksiyonu üzerine hiçbir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Benzer durum CBGA ve CBN haricindeki diğer tüm kannabinoidler için de geçerlidir. Grafikte sunulan çözücülerin etkinlikleri değerlendirildiğinde en yüksek etkiye sahip olduğu belirlenen asetonun yüksek maliyeti metanolün ise toksik özellikleri nedenleri ile CBD ekstraksiyonunda etanolün gerek maliyet gerekse non-toksik özelliklerinden dolayı uygun bir çözücü olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu bulgu çerçevesinde bir sonraki aşama olan UAE tekniği denemelerinde çözücü olarak etanol kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.2. Ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) tekniği

4.3.2.1. Ultrasonik banyo ekstraksiyon tekniği

Ultrasonik banyo ekstraksiyonun koşullarının optimizasyonu CBD, Δ^9 -THC ve CBG’nin konsantrasyonları üzerine gerçekleştirilmiştir. En yüksek verimlilikte kannabinoid ekstraksiyonunun sağlanması için belirtilen parametrelere ait en uygun değerlerin belirlenmesinde yine yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planlamalarından yararlanılmıştır. Uygulanan deneme planı sonucunda elde edilen yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.18’de ve en yüksek verimlilikte CBD, CBG ve Δ^9 -THC ekstraksiyonu için uygulanması gereken parametrik değerler Çizelge 4.4’te sunulmaktadır.



Şekil 4.18. Ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon için yanıt yüzey grafiği

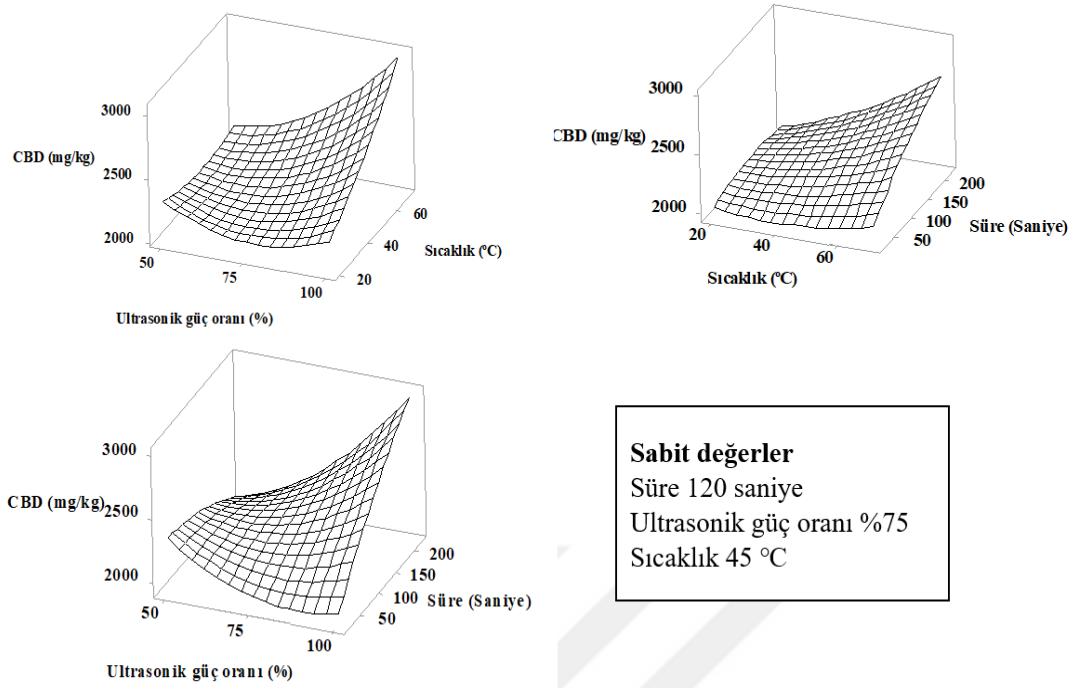
Çizelge 4.4. Ultrasonik banyo kullanılarak maximum kannabinoid ekstraksiyonu için şartlar

Kannabinoid	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	Konsantrasyon (mg/kg)
CBD	70,23	55,23	6884,34
CBG	70,23	55,23	438,29
Δ9-THC	70,23	55,23	461,94

Çizelge 4.4.'te sunulan verilere göre çalışma kapsamında izelenen tüm kannabinoidlerin (CBD, CBG ve Δ9-THC) en yüksek verimlilikte ekstraksiyonu için sıcaklık 70,23 °C ve süre değeri 55,23 dakika olarak uygulanması gerekmektedir.

4.3.2.2. Ultrasonik prob ekstraksiyon tekniği

Ultrasonik prob ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu bitkisel numune bulunan CBD konsantrasyonu üzerine gerçekleştirilmiştir. Yanıt yüzey yöntemi tasarımının ve MİNİTAB kullanılarak elde edilen grafikler Şekil 4.19'da ve en yüksek verimlilikte CBD ekstraksiyonu için uygulanması gereken parametrik değerler Çizelge 4.5'te sunulmaktadır.



Şekil 4.19. Ultrasonik prob ekstraksiyonun koşullarının 3-D yanıt yüzey planı

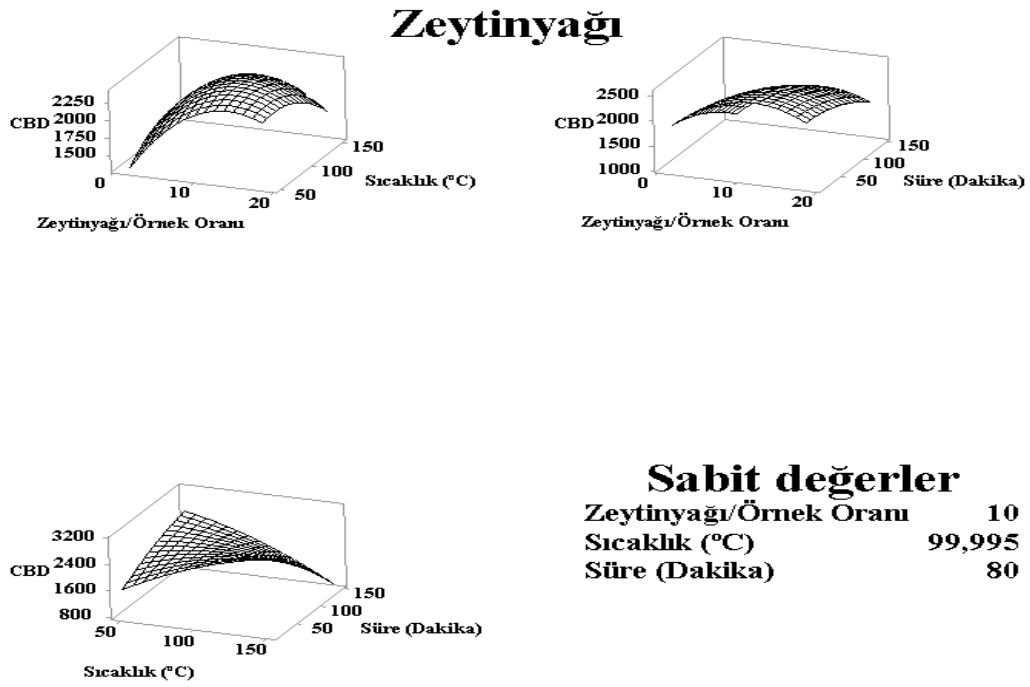
Çizelge 4.5. Ultrasonik prob ekstraksiyon teknikte maximum CBD verimi için şartlar

Ultrasonik güç oranı (w)	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	CBD (mg/kg)
750 (%100)	70,23	220,91	3620,47

Çizelge 4.5.'te sunulan verilere göre CBD'ün en yüksek verimlilikte ekstraksiyonu için ultrasonik güç 750 watt (%100 oranında), sıcaklık 70,23 °C ve süre değeri 220,91 saniye olarak uygulanması gerekmektedir.

4.3.3. Zeytinyağı ekstraksiyon tekniği

Zeytinyağı ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu bitkisel numunede bulunan CBD konsantrasyonu üzerine gerçekleştirilmiştir. Denemeler çerçevesinde elde edilen yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.20'de ve en uygun parametrik değerler Çizelge 4.6'da sunulmaktadır.



Şekil 4.20. Zeytinyağı ekstraksiyonun koşullarının 3-D yanıt yüzey planı

Çizelge 4.6. Zeytinyağı ekstraksiyon tekniğinde maximum CBD verimi için şartlar

Zeytinyağı/örnek oranı	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	CBD (mg/kg)
9,75	150,45	12,73	3057,27

Çizelge 4.6.'ta sunulan verilere göre CBD'ün en yüksek verimlilikte ekstraksiyonu için Zeytinyağı/örnek oranı 9,75, sıcaklık 150,45 °C ve süre değeri 12,73 dakika olarak uygulanması gerekmektedir.

4.3.4. Süperkritik akışkan karbondioksit ekstraksiyonu (SFE) tekniği

Kenevir bitkisinin numunelerde bulunan kannabinoidlerin SFE kullanılarak ekstrakte edilmesinde tekniğin büyük hacimlerde örnek miktarı (birim analiz için 50 gram kurutulmuş numuneye ihtiyaç bulunmakta olup araştırma seramızın üretim kapasitesi itibarı ile karşılanamamıştır) gerektirmesi nedeni ile literatür tarama çalışmalarından, cihaz kurulumu sırasında gerçekleştirilen ön denemelerden ve cihazın tedarikçisi firmanın öngörülerini doğrultusunda Çizelge 4.7'de belirtilen koşullar altında 4 tekrarlı çalışmalar gerçekleştirilmiş ve çalışmalardan elde edilen bulgular Çizelge 4.8'de ve Şekil 4.21'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Uygulanan SFE koşulları

Basınç (bar)	Sıcaklık (°C)	Etanol (%)	Sisteme konulan hammadde (gr)	Elde edilen ekstrakt miktarı (gr)	Atık miktarı (gr)
300	50	0	50,00±0,10	0,92±0,12	47,75±1,87

Çizelge 4.8. SFE'un sonucu kannabinoid profilindeki değişim

Kannabinoid	Hammadde (mg/kg)	Ekstrakt (mg/kg)	Atık (mg/kg)	Verim (%)*	Atık kaybı (%)**	Sistemsel kayıp (%)***
CBDV	216,74±69,50	3252,15±195,13	<LOQ	27,61	0,00	72,39
CBDA	677,14±208,67	1634,34±98,06	514,18±28,25	4,44	75,93	19,62
CBGA	98,55±12,76	1556,96±93,42	<LOQ	29,07	0,00	70,93
CBG	432,41±19,70	11614,00±696,84	61,83±6,32	49,42	14,30	36,28
CBD	7783,89±328,03	238869,53±14332,17	393,33±64,69	56,47	5,05	38,48
CBN	254,18±12,13	9947,88±596,87	<LOQ	72,01	0,00	27,99
Δ8-THC	391,64±7,12	12681,87±760,91	<LOQ	59,58	0,00	40,42
Δ9-THC	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,00	0,00	0,00
CBCR	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,00	0,00	0,00
THCA	4119,51±390,86	124803,07±7488,18	1507,80±142,61	55,74	36,60	7,65
Toplam kannabinoid	12461,47±180,92	362955,17±21,777,31	2253,97±89,33	53,59	18,09	28,32

*Elde edilen %verimin hesaplamasında hammaddede bulunan kannabinoidin tamamının ekstrakte geçmiş olması %100 olarak kabul edilmiş ve ekstrakte tespit edilen kannabinoidin miktarı göz önünde bulundurularak %verim hesaplanmıştır.

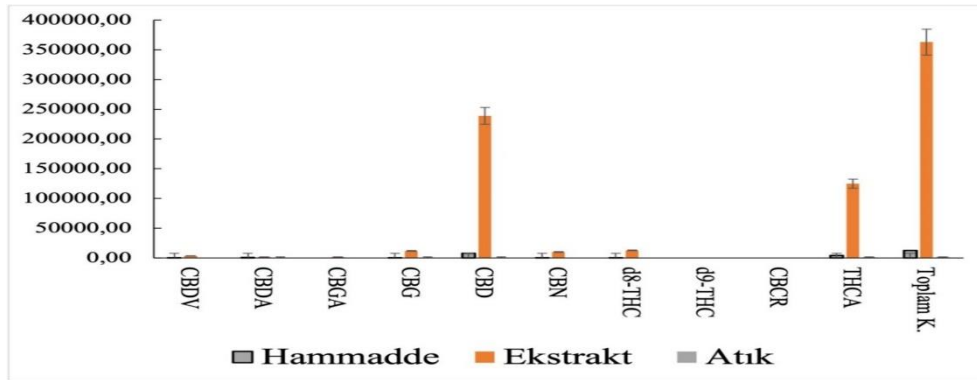
%Verim = (Ekstrakte tespit edilen kannabinoid (mg) / Hammaddede tespit edilen kannabinoid (mg)) x 100

**Atık kaybının %olarak hesaplanmasında ise ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen atık materyalde (küspe) kannabinoid analizleri gerçekleştirilmiş ve bulunan değer üzerinden %atık kaybı değeri ifade edilmiştir.

%Atık kaybı = (Atıkta tespit edilen kannabinoid (mg) / Hammaddede tespit edilen kannabinoid (mg)) x 100

***Sistemsel kaybın %olarak belirlenmesinde aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

%Sistemsel kayıp = %100 – (%Verim + %Atık kaybı)



Şekil 4.21. SFE çalışması sonucu elde edilen ve incelenen hammadde, ekstrakt ve atık maddelerde kannabinoid dağılımını gösteren grafik

5. SONUÇLAR

Tez kapsamındaki çalışmaların ilk aşamasında kannabinoidlerin analitik standartları kullanılarak HPLC cihazında yöntem parametrelerinin en uygun hale getirilmesi için çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sonucunda en uygun parametrelere göre kullanılan yöntem doğrulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre; araştırma kapsamındaki tüm kannabinoidlerin 0,10-250,00 mg/L aralığında doğrusal olarak ($r^2=1,00$) tanımlanabildiği ve geri kazanım değerinin $>95\%$ olduğu belirlenmiştir. Tespit sınırı LOD en düşük CBD için 0,03 mg/L ve en yüksek CBCRA için 0,33 mg/L arasında değiştiği belirlenmiştir. Tayin sınırının ise CBD için 0,10 mg/L ve için CBCR için 1,09 mg/L arasında değiştiği saptanmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmasında %RSD değerinin %0,56 ile %5,50 arasında olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte yöntemin seçici, kesin ve sağlam olduğu ve belirlenen bu verilere dayanarak bu yöntemin örneklerden beklenen konsantrasyon seviyeleri için doğrusal, geri kazanım değerleri, tespit ve tespit limitleri için yeterli ve tekrarlanabilir olduğu ve analizleri yapmaya uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Kullanılacak analitik yöntemin doğrulanmasını ardından kontrollü şartlar altında yetiştirilen kenevir bitkilerinden örnekler alınarak kurutma, öğütme ve eleme gibi ön hazırlık işlemleri yapılmış ve daha sonra numunelerde bulunan asit formdaki kannabinoidlerin dekarboksile edilerek nötr formdaki kannabinodilere dönüştürülebilmesi çalışmaları yürütülmüştür. Bu çerçevede örnekler farklı sıcaklık ve sürelerde dekarboksilasyon işlemi uygulanarak dekarboksile edilmiş ve uygulanan deneme planı verilerine dayanarak en uygun sıcaklık ve süre kombinasyonu belirlenmiştir. Sonuç olarak dekarboksilasyon koşullarını optimize etmek üzere gerçekleştirilen çalışmalarda en uygun şartların 142,50 °C ve 59,25 dakika olarak belirlenmiştir.

Örneklerdeki asit formdaki kannabinoidler optimum dekarboksilasyon normlarına tabii tutularak nötr kannabinodilere dönüştürülmüş ve ardından bu kannabinodilerin en yüksek verimlilikte ekstraksiyonu için literatürde ön plana çıkan ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Bu çerçevede farklı parametrik değerlerde dinamik maserasyon, ultrason destekli ekstraksiyon, zeytinyağı ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan CO₂ ekstraksiyonu denemeleri yanıt yüzey yöntemi istatistiksel deneme planı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler üzerinden en uygun parametrik değer kombinasyonları oluşturulmuştur.

Dinamik maserasyon tekniğin koşullarının optimizasyonu konusunda CBD'ün en yüksek verimi metanol ve aseton çözücüsü kullanılarak elde edilmiştir. Bununla birlikte etanolün ise istatistiksel olarak metanol ve asetona göre daha düşük bir çözücülüğe sahip olmasına rağmen CBD ekstraksiyonu üzerine etkili bir çözücü olduğu belirlenmiştir. Sunulan çözücülerin etkinlikleri değerlendirildiğinde en yüksek etkiye sahip olduğu belirlenen asetonun yüksek maliyeti metanolün ise toksik özellikleri nedenleri ile dezavantajlara sahip olduğu ve bunun karşılığında CBD ekstraksiyonunda etanolün gerek maliyet gerekse non-toksik özelliklerinden dolayı uygun bir çözücü olabileceği düşünülmüştür. CBD ekstraksiyonunda etanol kullanılması durumunda en uygun şartlar olarak 48, 81 sıvı/katı oranı 49,34 °C sıcaklık ve 46,82 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

Ultrason destekli ekstraksiyon çalışmalarında ultrasonik banyo ve ultrasonik prob olmak üzere iki farklı teknik etanol çözücüsü kullanılarak denenmiştir. Tekniklere ait her bir parametre yanıt yüzey yöntemi kullanılarak en uygun hale getirilmiştir. Bu çeçevede ultrasonik banyo için sıcaklık ve süre değerleri sırasıyla 70,23 °C' ve 55,22 dakika olarak ve ultrasonik prob denemesinde ise ultrasonik güç, sıcaklık ve süre değerleri sırasıyla 750 waat, 70,23 °C' ve 220,91 saniye olarak belirlenmiştir.

Zeytinyağı ekstraksiyon denemelerinde ise yanıt yüzey yöntemine göre CBD ekstraksiyonu için en uygun şartlar zeytinyağı/örnek oranı için 9,74, sıcaklık için 150,45 °C ve ekstraksiyon süresi değeri için 12,72 dakika olarak tespit edilmiştir. Bu teknikte kimyasal ve ayrıca kompleks ekipmanlar kullanılamaması nedenleriyle uygun bir yöntem olduğu söylenebilmektedir.

SFE denemeleri kapsamında fazla miktarda bitkisel materyal kullanılması gerektiği için literatürde ön plana çıkan ve cihazın kurulumu sırasında yapılan ön denemelere göre 300 bar basınç, 50 °C ekstraktör sıcaklığı ve 240 dakika ekstraksiyon süresi değeri uygulanmış ve elde edilen ekstrakte, ekstraksiyon sonucu atık materyalde ve başlangıç materyalinde kannabinoid profili analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler yardımıyla yüzde verim, yüzde atık kaybı ve yüzde sistemsel kayıp değerleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak sisteme konulan bitkisel materyalde bulunan kannabinoidlerden CBD'ün %56,47 verimle ekstrakte edilebildiği ve bunun karşılığında atık materyalde tespit edilen CBD konsantrasyonuna istinaden %5,05 oranında bir atık kaybı olduğu ve %38,48 oranında ise sistemsel bir kayıp meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Sistemsel kaybın kaynağı olarak sistemi oluşturan hatlarda kalan ekstrakt, açığa çıkan CBD'ün tamamının ekstrakte alınamayıp buharlaşan CO₂ ile birlikte ortama verilmesi gibi etmenlerin rol oyanayabileceği düşünülmektedir. SFE sisteminde elde edilen ekstraksiyon sonucunda elde edilen özütte yüksek oranda kannabinoid bulunması, ilave evaporasyon ve konsantre etme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaması, diğer yöntemlere göre daha az veya neredeyse hiç toksik kimyasal tüketilmemesi ve daha fazla doğa dostu bir yöntem olmasından dolayı tercih edilen bir yöntem olarak önerilebilmektedir.

Kenevir bitkisinde bulunan kannabinoidlerin ekstraksiyonu kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda her bir ekstraksiyon yöntemi için farklı düzeylerde kannabinoid içeren bitkisel materyaller kullanılmıştır. Bunun nedeni olarak herbir yöntem için fazla miktarda bitkisel materyale ihtiyaç duyulması ve dekarboksilasyon işleminin küçük miktarlarda yapılabilmesi olarak gösterilebilir. Bu nedenle herbir ekstraksiyon yöntemi aynı materyal kullanılması nedeni ile kendi içinde doğru sonuçlar doğururken, farklı yöntemlerin birbirleriyle karşılaştırılması için daha büyük miktarlarda dekarboksile edilmiş materyale ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında üretilen verilerin son zamanlarda popüler hale gelen ve özellikle tarım, eczacılık, gıda ve kimya sektörlerinde kullanım alanı giderek artan kannabinoidlerin bitkisel örneklerdeki düzeylerinin ve en uygun ekstraksiyon koşullarının belirlenmesine yönelik akademik ve endüstriyel düzeydeki çalışmalara katkılar sağlaması beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Agarwal, C., vd. (2018). "Ultrasound-assisted extraction of cannabinoids from Cannabis Sativa L. optimized by response surface methodology." *Journal of food science* 83(3): 700-710.
- Aizpurua-Olaizola, O., vd. (2014). "Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis Sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry." *Analytical and bioanalytical chemistry* 406(29): 7549-7560.
- Alexander, S. P. (2016). "Therapeutic potential of cannabis-related drugs." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 64: 157-166.
- Anderson, L. L., vd. (2019). "Pharmacokinetics of phytocannabinoid acids and anticonvulsant effect of cannabidiolic acid in a mouse model of Dravet syndrome." *Journal of natural products* 82(11): 3047-3055.
- Andre, C. M., vd. (2016). "Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules." *Frontiers in plant science* 7: 19.
- Anonim, 2020a. <https://www.kenevir.com/post/end%3%bcstriyel-kullanım-alanları> Erişim: 15.09.202
- Appendino, G., vd. (2011). "Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry." *Current medicinal chemistry* 18(7): 1085-1099.
- Ashton, C. H. (2001). "Pharmacology and effects of cannabis: a brief review." *The British Journal of Psychiatry* 178(2): 101-106.
- Attard, T. M., vd. (2018). "Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes." *Industrial Crops and Products* 112: 38-46.
- Azmir, J., vd. (2013). "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review." *Journal of food engineering* 117(4): 426-436.
- Barauskaite, J., vd. (2020). "Development of extraction technique and GC/FID method for the analysis of cannabinoids in Cannabis sativa L. spp. sativa (hemp)." *Phytochemical Analysis* 31(4): 516-521.
- BAŞER, U. and M. BOZOĞLU (2020) "Türkiye’de Kenevir Politikalarına ve Mevzuatına Bir Bakış." *Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi* 6(2): 127-135.
- Brighenti, V., vd. (2017). "Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L.(hemp)." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 143: 228-236.
- Büyüktuncel, E. (2012). "Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I." *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*(2): 209-242.
- Cai, C., vd. (2019). "Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (Cannabis sativa L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin." *Journal of Molecular Liquids* 287: 110957.
- Carcieri, C., vd. (2018). "Cannabinoids concentration variability in cannabis olive oil galenic preparations." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 70(1): 143-149.

- Cardenia, V., vd. (2018). "Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L." *Journal of food and drug analysis* 26(4): 1283-1292.
- Carlini, E. (2004). "The good and the bad effects of (–) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) on humans." *Toxicon* 44(4): 461-467.
- Chandra, S., vd. (2017). Cannabis sativa L.-botany and biotechnology, Springer.
- ChemicalBook (2019). "13956-29-1(CANNABIDIOL) Product Description." https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB7673434.aspx (accessed on June 18, 2019).
- Citti, C., vd. (2016). "Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 128: 201-209.
- De Backer, B., vd. (2009). "Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material." *Journal of Chromatography B* 877(32): 4115-4124.
- Degtyarenko, K., vd. (2007). "ChEBI: a database and ontology for chemical entities of biological interest." *Nucleic acids research* 36(suppl_1): D344-D350.
- Deiana, S., vd. (2012). "Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ 9-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive–compulsive behaviour." *Psychopharmacology* 219(3): 859-873.
- Deidda, R., vd. (2019). "Analytical quality by design: development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 166: 326-335.
- DeLong, G. T., vd. (2010). "Pharmacological evaluation of the natural constituent of Cannabis sativa, cannabichromene and its modulation by Δ 9-tetrahydrocannabinol." *Drug and alcohol dependence* 112(1-2): 126-133.
- EIHA (2017) "Reasonable regulation of cannabidiol (CBD) in food, cosmetics, as herbal natural medicine and as medicinal product." *European Industrial Hemp Association (EIHA)* 1-3.
- Ellison, S. L. and A. Williams (2012). "Quantifying uncertainty in analytical measurement."
- Fellermeier, M., vd. (2001). "Biosynthesis of cannabinoids: incorporation experiments with ^{13}C -labeled glucoses." *European Journal of Biochemistry* 268(6): 1596-1604.
- Gul, W., vd. (2015). "Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of Cannabis using high-performance liquid chromatography." *Journal of AOAC International* 98(6): 1523-1528.
- Guzman, M. (2003). "Cannabinoids: potential anticancer agents." *Nature reviews cancer* 3(10): 745-755.

- Hädener, M., vd. (2019). "Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD." *Forensic science international* 299: 142-150.
- Hartsel, J. A., vd. (2016). Cannabis sativa and Hemp. Nutraceuticals, *Elsevier*: 735-754.
- Hazekamp, A. (2007). "Cannabis; extracting the medicine."
- Izzo, A. A., vd. (2009). "Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb." *Trends in pharmacological sciences* 30(10): 515-527.
- Kalra, K. (2011). "Method development and validation of analytical procedures." *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas* 1.
- Kotra LP, Lewis MM, Wasilewski E & Grover H (2019) Decarboxylated cannabis resins, uses thereof and methods of making same. United States) Patent Application Publication US 10 , 383 , 892 B2.
- Kotra, L. P., vd. (2018). Decarboxylated cannabis resins, uses thereof and methods of making same, Google Patents.
- Machado Bergamaschi, M., vd. (2011). "Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent." *Current drug safety* 6(4): 237-249.
- Namdar, D., vd. (2018). "Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods." *Industrial Crops and Products* 113: 376-382.
- Pellati, F., vd. (2018). " Cannabis sativa L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer." *BioMed research international* 2018.
- Pellati, F., vd. (2018). "New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in Cannabis sativa L.(hemp)." *Molecules* 23(10): 2639.
- Perrotin-Brunel, H. (2011). "Sustainable production of cannabinoids with supercritical carbon dioxide technologies."
- Pisanti, S., vd. (2017). "Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications." *Pharmacology & therapeutics* 175: 133-150.
- Pollastro, F., vd. (2018). "Cannabichromene." *Natural Product Communications* 13(9): 1934578X1801300922.
- Protti, M., vd. (2019). "Cannabinoids from Cannabis sativa L.: A New Tool Based on HPLC–DAD–MS/MS for a Rational Use in Medicinal Chemistry." *ACS medicinal chemistry letters* 10(4): 539-544.
- PubChem (2019). "National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Cannabidiol, CID=644019, ." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cannabidiol> (accessed on June 18, 2019).
- Raharjo, T. J., vd. (2004). "Cloning and over-expression of a cDNA encoding a polyketide synthase from Cannabis sativa." *Plant Physiology and Biochemistry* 42(4): 291-297.

- Rock, E. M., vd. (2011). "Interaction between non-psychotropic cannabinoids in marihuana: effect of cannabigerol (CBG) on the anti-nausea or anti-emetic effects of cannabidiol (CBD) in rats and shrews." *Psychopharmacology* 215(3): 505-512.
- Romano, L. L. and A. Hazekamp (2013). "Cannabis oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine." *Cannabinoids* 1(1): 1-11.
- Rovetto, L. J. and N. V. Aieta (2017). "Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from Cannabis sativa L." *The Journal of Supercritical Fluids* 129: 16-27.
- Russo, E. B. and J. Marcu (2017). "Cannabis pharmacology: the usual suspects and a few promising leads." *Advances in pharmacology* 80: 67-134.
- Skoog, D. A., vd. (2017). "Principles of instrumental analysis", *Cengage learning*.
- Sun, D.-W. (2008). "Modern techniques for food authentication", *Academic Press*.
- Suraev, A., vd. (2018). "Composition and use of cannabis extracts for childhood epilepsy in the Australian community." *Scientific reports* 8(1): 1-14.
- Şahin, G. 2019. "kenevir_tarimi_kitabi." Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 66 S.
- Tadeo, J. L., vd. (2010). "Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples." *Journal of Chromatography A* 1217(16): 2415-2440.
- Taura, F., vd. (1996). "Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from Cannabis sativa L.: biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid." *Journal of Biological Chemistry* 271(29): 17411-17416.
- Taura, F., vd. (2007). "Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type Cannabis sativa." *FEBS letters* 581(16): 2929-2934.
- Taverniers, I., vd. (2004). "Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23(7): 480-490.
- Teräsvalli, H. (2020). "Extraction and purification of cannabidiol." Lisans tezi, School of Engineering Science, Chemical and Process Engineering, Lappeenranta Finlanda.
- Tettey, J. (2009). "Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products." *New York: United Nations Office on Drugs and Crime Vienna United Nations*.
- Thomas, B. F. and M. Elsohly (2015). The analytical chemistry of cannabis: Quality assessment, assurance, and regulation of medicinal marijuana and cannabinoid preparations, Elsevier.
- Turner, C. E., vd. (1980). "Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents." *Journal of Natural Products* 43(2): 169-234.

- Zivovinic, S., vd. (2018). "Determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection." *Journal of Analytical Science and Technology* 9(1): 1-10.
- Zougagh, M., vd. (2004). "Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23(5): 399-405.



ÖZGEÇMİŞ

Mariem BOUALİ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2019- 2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2013-2016	La Manouba Üniversitesi Sidi Thabet Biyoteknoloji Yüksek Enstitüsü, farmasötik biyoteknoloji Bölümü, Tunus

ESERLER

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Babacan U., Cengiz M.F., Bouali M., Tuncer Kesci S., "Evaluation of Plant Ingredients Obtained from Cannabis Species for Use as Food Additives", International Conference on Raw Materials to Processed Foods, İSTANBUL, TÜRKİYE, 3-4 Haziran 2021, pp.23-23

Tuncer Kesci S., Cengiz M.F., Babacan U., Bouali M., "Encapsulation of Cannabinoids Derived From Cannabis sativa L. and Its Application in Pharmaceutical Industry ", 8. International Drug Chemsitry Conference, ANTALYA, TÜRKİYE, 27 Şubat - 1 Mart 2021, pp.68-68