DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KODEİNİN HPLC TAYİNİ VE OPTİMİZASYON SÜRECİNİN YAPAY SİNİR AĞLARI İLE MODELLENMESİ

Onur İMER

Temmuz, 2014
İZMİR

KODEİNİN HPLC TAYİNİ VE OPTİMİZASYON SÜRECİNİN YAPAY SİNİR AĞLARI İLE MODELLENMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Onur İMER

Temmuz, 2014

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

ONUR İMER, tarafından **DOÇ. DR. LEVENT ÇAVAŞ** yönetiminde hazırlanan **"KODEİNİN HPLC TAYİNİ VE OPTİMİZASYON SÜRECİNİN YAPAY SİNİR AĞLARI İLE MODELLENMESİ"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Levent ÇAVAŞ

Yönetici

Doç. Dr. Ömer KOZ

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Sibel KILINÇ ALPAT

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi birikimi ve deneyimleriyle verdiği destek sayesinde yolumu aydınlatan, yönlendirmeleriyle tezimin hazırlanmasını ve yürütülmesini sağlayan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Levent ÇAVAŞ'a sabır ve emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımın değerlendirilmesinde yardımlarından ötürü Sayın Nazlı MERT'e değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımı yürütmeme izin veren Afyon Alkaloidleri Fabrikası, Kalite Kontrol Şube Müdürlüğü, Kalite Kontrol Servisi Laboratuarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma ve amirlerime anlayışlı tutumları, sağladıkları güven ve huzur dolu çalışma ortamı dolayısıyla teşekkür ederim.

Karşılıksız sevgileri, maddi ve manevi destekleriyle hayatımın her anında yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Onur İMER

KODEİNİN HPLC TAYİNİ VE OPTİMİZASYON SÜRECİNİN YAPAY SİNİR AĞLARI İLE MODELLENMESİ

ÖZ

Kodein ticari öneme sahip bir alkaloid olup ağrı kesici ve öksürük kesici gibi farmakolojik özelliklere sahiptir. Bu nedenle biyolojik numunelerde kodeinin analitik tayini önem taşır. Sunulan bu tez çalışmasında; var olan literatür ışığında kodeinin HPLC tayini gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar yapay sinir ağları (YSA) kullanılarak modellenmiştir. Levenberg-Marquardt algoritması üzerinde yapılan optimizasyon çalışmalarında optimum nöron sayısı 9, optimum öğrenme-doğrulama-test oranı ise 60-5-35 olarak bulundu. Optimum nöron sayısı için hata kareler ortalaması (MSE) 0,0056854, optimum oran için hata kareler ortalaması 0,0059123 olarak bulundu. Optimizasyon için *nftool* fonksiyonu kullanıldı. 20 adet deneysel alıkonma zamanı, örnek çıkış verisi olarak seçildi ve farklı algoritmalar üzerinde test edilerek tahmini alıkonma zamanları hesaplandı. Tahminde en başarılı algoritmalar trainlm ve trainscg olarak gözlemlendi. Tahmini alıkonma zamanlarını hesaplamak için *nntool* fonksiyonu kullanıldı. Hangi parametrenin alıkonma zamanında en etkili olduğunun belirlenmesi için performans testleri yapıldı. Bunun için 15 farklı giriş verisi için *nftool* fonksiyonu kullanıldı. Sonuç olarak, kodeinin HPLC ile tayininden elde edilen deneysel veriler YSA ile modellenmiştir. YSA'nın değişik HPLC koşullarında kodeine ilişkin alıkonma süresini başarılı bir şekilde tahmin edebileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Kodein, yapay sinir ağları, MatLab, nftool, nntool

HPLC DETERMINATION OF CODEINE AND MODELLING OF ITS OPTIMISATION PROCESS BY ARTIFICIAL NEURAL NETWORK

ABSTRACT

Codeine is a commercially important alkaloid and it has pharmacological properties such as analgesic and cough suppressant. Therefore, the determination of codeine in biological samples is of importance. Codeine determination by using HPLC was conducted and the experimental results were modelled through artificial neural network (ANN). In optimization studies carried out on Levenberg-Marquardt algorithm, optimum neuron number and optimum rate of training-validation-testing were determined as 9 and 60-5-35, respectively. Mean square errors (MSE) of optimum neuron number and optimum rate of training-validation-testing were 0.0056854 and 0.0059123, respectively. *nftool* function was used for optimization. 20 experimental retention times were chosen as sample output and estimated retention times were calculated after being tested on different algorithms. The most successful algorithms in estimation were found as trainlm and trainscg. *nntool* function was used to calculate the estimated retention times. Sensitivity analysis was applied to estimate the effective parameters on the retention time. For this purpose, *nftool* function was used for 15 different input data. In conclusion, the experimental data obtained from HPLC determination of codeine were modelled by using ANN. It was shown that ANN estimates successfully the retention times related to codeine in different HPLC conditions.

Keywords: Codeine, artificial neural network, MatLab, nftool, nntool

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ii

TEŞEKKÜR iii

ÖZ iv

ABSTRACT v

ŞEKİLLER LİSTESİ viii

TABLOLAR LİSTESİ xii

BÖLÜM BİR - GİRİŞ 1

1.1 Kodein 1

1.1.1 Kodein Bazının Tanımlanması 1

1.1.2 Kodein Bazının Farmasötikte Kullanılması 2

1.1.3 Kodein Bazının Analiz Metotları 5

1.2 Yapay Sinir Ağları (YSA) 6

1.2.1 YSA Modellemesi 6

1.2.2 YSA'nın Endüstride Kullanımı 10

1.2.3 YSA'nın HPLC Optimizasyonunda Kullanımı 11

1.3 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) 12

1.3.1 HPLC Terimleri ve Kromatogram Tanımı 12

1.3.2 HPLC Bölümleri 13

1.3.3 HPLC Çeşitleri 14

1.3.4 Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) 15

BÖLÜM İKİ – MATERYAL VE METOT 16

2.1 Materyaller 16

2.2 HPLC Verilerinin Elde Edilmesi 17

2.3 MatLab Programı YSA Fonksiyonlarının - *nftool*, *nntool* - Kullanımı 19

2.3.1 Verilerin Sisteme Girilmesi 19
2.3.2 *nftool* Fonksiyonunun ve Verilerin Girilmesi 20
2.3.3 Doğrulama (Validation), Test (Testing) ve Öğrenme (Training) Verilerinin Oranlarının ve Gizli Nöron Sayısının Değiştirilerek Optimizasyonun Sağlanması 21
2.3.4 Performans ve Regresyon Grafiği Örnekleri 23
2.3.5 *nntool* Fonksiyonunun Girilmesi ve Verilerin Değerlendirilmesi 25
2.4 Duyarlılık Testlerinin Yürütülmesi 28

BÖLÜM ÜÇ – SONUÇLAR 30

3.1 HPLC Kromatogram Örnekleri 30
3.1.1 Mobil Fazın Değiştirilmesi 30
3.1.2 Sıcaklığın Değiştirilmesi 34
3.1.3 Akış Hızının Değiştirilmesi 37
3.2 *nftool* Fonksiyonu ile YSA Optimizasyonu Sırasında Optimum Nöron Sayısının Bulunması 40
3.3 *nftool* Fonksiyonu ile YSA Optimizasyonu Sırasında Optimum Test, Öğrenme ve Doğrulama Oranlarının Bulunması 46
3.4 *nntool* Fonksiyonu ile Örnek Verilerin Farklı Algoritmalarla Testine İlişkin Grafikler 51
3.5 Duyarlılık Testlerine İlişkin Veriler 61

BÖLÜM DÖRT – TARTIŞMA VE ÖNERİLER 63

KAYNAKLAR 66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Kodein molekülünün yapısı 1
Şekil 1.2 Morfinden kodeine geçişte molekül yapısındaki değişme a)morfin, b) kodein 2
Şekil 1.3 Üç farklı tip opioid reseptörlerinin aminoasit sekansları 4
Şekil 1.4 Opioid reseptörleri sinyal transferinin moleküler mekanizması 5
Şekil 1.5 YSA modellerinin çalışma düzeni 9
Şekil 1.6 HPLC cihazının bölümlerinin gösterimi 14
Şekil 2.1 HP Chemstation 3D 16
Şekil 2.2 İki katmanlı 5 gizli nörona sahip 25 matematiksel büyüklük içeren YSA modeli 19
Şekil 2.3 Verilerin sisteme girilmesi 20
Şekil 2.4 *nftool* fonksiyonunun girilmesi ve verilerin seçilmesi 20
Şekil 2.5 Doğrulama, test ve öğrenme verilerinin oranlarının değiştirilmesi 21
Şekil 2.6 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi 22
Şekil 2.7 ANN modelinin oluşturulması ve Öğrenme, Doğrulama ve Teste ilişkin MSE ve R^2 verilerinin elde edilmesi 22
Şekil 2.8 Döngü sayısı, performans grafiği ve regresyon grafiğine ulaşılması 23
Şekil 2.9 Regresyon grafiği örneği 24
Şekil 2.10 Performans grafiği örneği 25
Şekil 2.11 *nntool* fonksiyonunda verilerin girilmesi 27
Şekil 2.12 *nntool* fonksiyonunun girilmesi ve verilerin seçilmesi 27
Şekil 2.13 *nntool* fonksiyonunda "simüle et" sekmesinin kullanımı 28
Şekil 2.14 Programdan tahmin verilerinin elde edilmesi 28
Şekil 2.15 *nntool* fonksiyonunda tahmin verilerinin alınması 28
Şekil 2.16 Programdan tahmin verilerinin okunması 29
Şekil 2.17 MatLab R2013b ver. 8.2.0.701 29
Şekil 3.1 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 3 (FM), 1. Paralel - AZ (Alıkonma Zamanı): 5,525 30
Şekil 3.2 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 3 (FM), 2. Paralel – AZ: 5,535 31

Şekil 3.3 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 3 (FM), 3. Paralel - AZ: 5,554 31
Şekil 3.4 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 1 – AZ: 2,895 32
Şekil 3.5 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 2 - AZ: 4,050 32
Şekil 3.6 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 4 - AZ: 7,897 33
Şekil 3.7 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 5 - AZ: 12,219 33
Şekil 3.8 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –2 °C, mobil faz: FM, 1. Paralel - AZ: 5,777 34
Şekil 3.9 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –2 °C, mobil faz: FM, 2. Paralel - AZ: 5,782 34
Şekil 3.10 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –1 °C, mobil faz: FM - AZ: 5,779 .. 35
Şekil 3.11 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –1 °C, mobil faz: FM - AZ: 5,779 .. 35
Şekil 3.12 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM +1 °C, mobil faz: FM - AZ: 5,893 ... 36
Şekil 3.13 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM +2 °C, mobil faz: FM - AZ: 5,861 ... 36
Şekil 3.14 Akış hızı: FM – 0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM, 1. Paralel- AZ: 6,099 37
Şekil 3.15 Akış hızı: FM – 0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM, 2. Paralel- AZ: 6,089 37
Şekil 3.16 Akış hızı: FM – 0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM, 3. Paralel- AZ: 6,083 38
Şekil 3.17 Akış hızı: FM – 0,1 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM - AZ: 5,778 38
Şekil 3.18 Akış hızı: FM +0,1 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM - AZ: 5,307 39
Şekil 3.19 Akış hızı: FM +0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM - AZ: 5,088 39
Şekil 3.20 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile doğrulama MSE değerlerinin değişimi 40
Şekil 3.21 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile doğrulama R^2 değerlerinin değişimi 41
Şekil 3.22 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile öğrenme, doğrulama ve test MSE değerlerinin değişimi 41

Şekil 3.23 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile öğrenme, doğrulama ve test ve tümüne ilişkin R^2 değerlerinin değişimi 42
Şekil 3.24 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen doğrulama MSE değerleri 46
Şekil 3.25 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen doğrulama R^2 değerleri 47
Şekil 3.26 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen MSE değerleri 47
Şekil 3.27 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen R^2 değerleri 48
Şekil 3.28 Trainbfg (BFGS Quasi-Newton Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 52
Şekil 3.29 Trainbr (Bayesian Regulation Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 53
Şekil 3.30 Traincgb (Conjugate Gradient with Powell/Beale Restarts Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 53
Şekil 3.31 Traincgf (Fletcher-Powell Conjugate Gradient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 54
Şekil 3.32 Traincgp (Polak-Ribiére Conjugate Gradient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 54
Şekil 3.33 Traingd (Gradient Descent Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 55
Şekil 3.34 Traingdm (Gradient descent with momentum Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin 55
Şekil 3.35 Traingda (Gradient Descent with Adaptive Learning Rate Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 56
Şekil 3.36 Traingdx (Gradient Descent with Momentum and Adaptive Learning Rate Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 56

Şekil 3.37 Trainlm (Levenberg-Marquardt Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 57
Şekil 3.38 Trainoss (One Step Secant Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 57
Şekil 3.39 Trainr (Random Order Incremental Training with Learning Functions) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 58
Şekil 3.40 Trainrp (Resilient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 58
Şekil 3.41 Trainscg (Scaled Conjugate Gradient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik 59

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

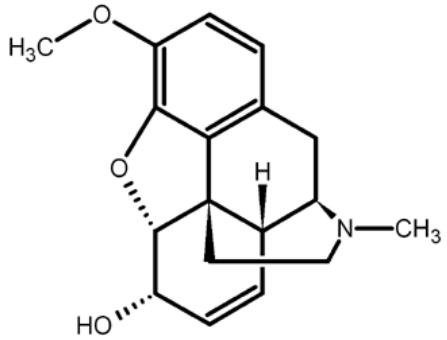
Tablo 2.1 Tez akış şeması 18
Tablo 2.2 Tahminde kullanılan algoritmalar 26
Tablo 3.1 Gizli nöron sayısının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri.. 43
Tablo 3.2 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri 49
Tablo 3.3 Farklı algoritmalar kullanarak örnek giriş verileri için elde edilen tahmini alıkonma zamanları..... 60
Tablo 3.4 Duyarlılık testlerine ilişkin MSE ve R^2 değerleri (p_1=mobil faz bileşen-1, p_2=mobil faz bileşen-2, p_3=akış hızı, $p4$=sıcaklık)..... 63

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

1.1 Kodein

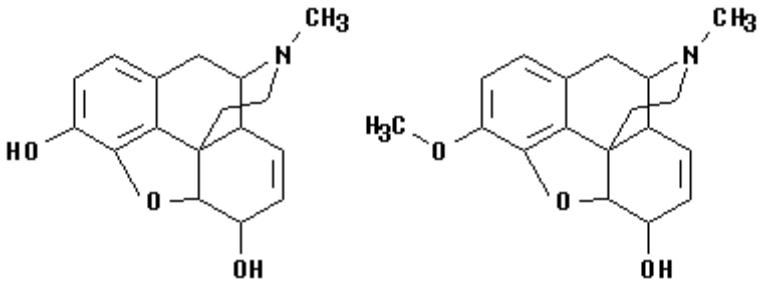
1.1.1 Kodein Bazının Tanımlanması

Kodein; Kodeinum, Kodeina, Metilmorfin, morfin 3-metil eter, Morfin monometil eter isimlerine ve 7,8-Didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorphinan-6-ol / (5alpha,6alpha)-7,8-Didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorphinan-6-ol yapısal isimlerine sahiptir (Şekil 1.1). Molekülün kapalı formülü $C_{18}H_{21}NO_3$ şeklinde gösterilebilir (Paolino, 1990; Taj Pharmaceuticals Limited, 2009).



Şekil 1.1 Kodein molekülünün yapısı (Codeine, b.t)

Opium, *Papaver somniferum* (haşhaş) bitkisinden elde edilen izokinolin yapısında alkaloid moleküldür. Bu moleküller opiumdan elde edilmelerinden dolayı opioid sınıfı moleküller olarak da anılır. Kodein, morfinin metilasyonundan (Şekil 1.2) veya opiumdan elde edilen alkaloid sınıfı bir narkotiktir (M. Bhandari, A. Bhandari ve A. Bhandari, 2011; Barnett, Hindson, Lewis ve Purcell, 1998). Beyaz-renksiz kristal, kokusuz ve acımsı bir tada sahiptir. 154-158 °C arası erime noktasına sahiptir. 1:120 oranında suda, 1:15 oranında kaynar suda, 1:2 oranında alkolde, 1:0,5 oranında kloroformda, 1:50 oranında eterde çözünür. Metil alkolde çözünürdür. Derişik asitte oldukça çözünür bir maddedir (Paolino, 1990).



a b

Şekil 1.2 Morfinden kodeine geçişte molekül yapısındaki değişme a) morfin, b) kodein (Bruner, 2014).

Kodein pKa: 8,2 değeriyle kuvvetli monoasidik baz sınıfında değerlendirilir. Polarize ışığı sola çevirir (levarotatory) (M. Bhandari, A. Bhandari ve A. Bhandari, 2011).

% 0,5'lik çözeltisinin pH değeri 9'dan yüksektir. Işıktan etkilenir. Işık görmeyen yerde saklanmalıdır. Kodein bazı ticari olarak fosfat, hidroklorür veya sülfat bileşikleri şeklinde bulunabilir (Paolino, 1990).

1.1.2 Kodein Bazının Farmasötikte Kullanımı

Öksürük tedavisinde oral tabletler şeklinde (45-120 mg/gün), ağrı hafifletici olarak (120-240 mg/gün), kronik kanser ağrı kontrolü parenteral veya oral uygulamalar şeklinde medikal kullanımı bulunmaktadır (Liu, Woo, Holmes ve Koh, 2000, Pereira ve diğer, 2014). Refleksle doğan öksürüğe karşı referans bir öksürük kesici ajan olarak kabul edilen kodeinin aynı etkisini üst solunum yolu enfeksiyonundan kaynaklanan öksürüğe karşı gösteremediği belirlenmiştir. Benzer etkiyi gösterebilmesi için 50 mg/kg'lık yüksek dozdaki kodein konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Eccles, 1996; Takahama ve diğer, 1997).

Kodein bağımlılık yaratır ve yan etkiler gösterir. Kodein bağımlılığı diğer opioid moleküllerine oranla daha seyrek görülür. Yan etkiler esneme, kusma, diyare, göz yaşarması, kramp, terleme, ateş, uykusuzluk ve kas ağrıları şeklinde gözlemlenebilir.

Ciddi kodein zehirlenmelerinde solunum bozukluğu, morarma, gözbebeği küçülmesi, hipotansiyon gibi koma durumları gözlenir. Aşırı dozda ya da diğer ilaçlarla ve alkolle birlikte damar yoluyla alınması öldürücü olabilir (Pereira ve diğer, 2014).

Yarı ömrü 2,5-3 saat ve biyoyararlanımı % 90 olan kodein, morfine oranla daha zayıf bir analjeziktir. 10 mg morfinin sahip olduğu analjezik etkisine 120 mg kodein sahiptir. Kodein, farmasötik alanında genellikle diğer antihistaminler veya analjezikler (asetilsalisilik asit, parasetamol gibi) ile birlikte kullanılır. Vücutta bir kısmı morfine dönüşür. Tıpkı morfin gibi kodein de beyindeki opioid reseptörlerine bağlanır ve hasta için hala hissedilebilir olan ağrıyı hafifletmeye yardımcı olur. Ancak tüm bunların yanında uyuşukluğa ve nefes darlığına neden olur (M. Bhandari, A. Bhandari ve A. Bhandari, 2011).

Analjezik etkisiyle bilinen opioid molekülleri Sümerlerden beri kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarla memeli beyninde opioid moleküllerinin bağlanma noktaları, yani reseptörleri, keşfedilmiştir. Tek farmakolojik ve fizyolojik özelliği olan mu (μ), delta (δ) ve kappa (κ) isimli üç ayrı temel opioid reseptör tipleri bulunmaktadır. Opioid ligandları endorphin (mu (μ) reseptörüne bağlanır), dynorphin (kappa (κ) reseptörüne bağlanır) ve enkephalin (delta (δ) reseptörüne bağlanır) gibi endojen peptitler olabileceği gibi; morfin, kodein (mu (μ) reseptörüne bağlanırlar) gibi endojen olmayan moleküller de olabilir. Opioid reseptörlerinin en yaygın bilinen antagonisti naloxondur (Jordan ve Devi, 1998; Yaksh, 2013). 3 farklı tipteki opioid reseptör proteinlerinin aminoasit sekansları National Center for Biotechnology Information (NCBI) sitesinden (www.ncbi.nlm.nih.gov) FASTA formatıyla alınarak Şekil 1.3'te belirtilmiştir.

370-400 aminoasitten, 7 transmembran geçişli proteinden oluşan opioid reseptörü adeninil siklaz ile etkileşim içindedir. Proteinin N ucu ekstraselülerdir. Opioid reseptörü 3 alt birimden oluşan G proteini ile bağlanmıştır (Al-Hasani ve Bruchas, 2011; Yaksh, 2013).

Opioid reseptörlerine agonist bağlanmasıyla vücutta bir takım fizyolojik değişiklikler meydana gelir. Bunlardan bazıları analjezi, gözbebeği küçülmesi, vücut sıcaklığındaki düşüş, tansiyondaki düşüş olarak sayılabilir. Opioid reseptörlerine agonist bağlandığında nörotransmitter madde salınımı engellenerek ağrı kontrolü sağlanmış olur (Jordan ve Devi, 1998).

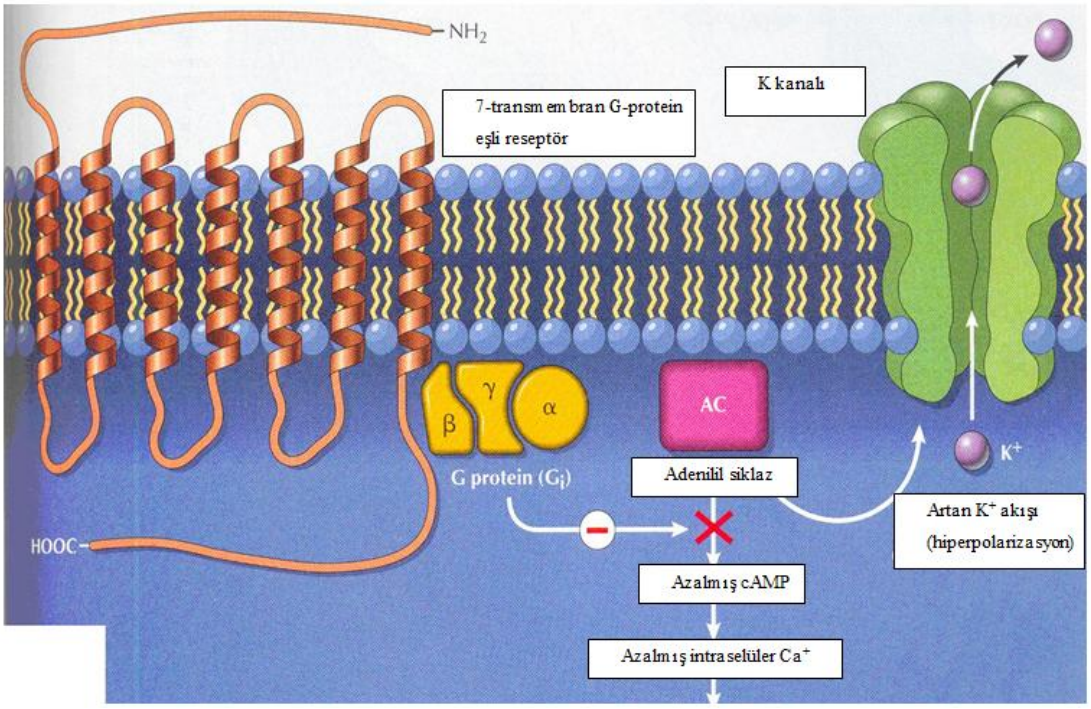
```
>gi|117940060|ref|NP_000905.3| mu-type opioid receptor isoform MOR-1
[Homo sapiens]
MDSSAAPTNASNCTDALAYSSCSPAPSPGSWVNLSHLDGNLSDPCGPNRTDLGGRDSLCPPTGSPSMITA
ITIMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALATSTLPFQSVNYLMGTWPFGTI
LCKIVISIDYYNMFTSIFTLCTMSVDRYIAVCHPVKALDFRTPRNAKIINVCNWILSSAIGLPVMFMATT
KYRQGSIDCTLTFSHPTWYWENLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRRI
TRMVLVVVAVFIVCWTPIHIYVIIKALVTIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCFR
EFCIPTSSNIEQQNSTRIRQNTRDHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP
400 aminoasit

>gi|39725940|ref|NP_000903.2| kappa-type opioid receptor isoform 1
Homo sapiens]
MDSPIQIFRGEPGPTCAPSACLPPNSSAWFPGWAEPDSNGSAGSEDAQLEPAHISPAIPVIITAVYSVVF
VVGLVGNSLVMFVIIRYTKMKTATNIYIFNLALADALVTTTMPFQSTVYLMNSWPFGDVLCKIVISIDYY
NMFTSIFTLTMMSVDRYIAVCHPVKALDFRTPLKAKIINICIWLLSSSVGISAIVLGGTKVREDVDVIEC
SLQFPDDDYSWWDLFMKICVFIFAFVIPVLIIIVCYTLMILRLKSVRLLSGSREKDRNLRRITRLVLVVV
AVFVVCWTPIHIFILVEALGSTSHSTAALSSYYFCIALGYTNSSLNPILYAFLDENFKRCFRDFCFPLKM
RMERQSTSRVRNTVQDPAYLRDIDGMNKPV
380 aminoasit

>gi|63477962|ref|NP_000902.3| delta-type opioid receptor [Homo sapiens]
MEPAPSAGAELQPPLFANASDAYPSACPSAGANASGPPGARSASSLALAIAITALYSAVCAVGLLGNVLV
MFGIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALATSTLPFQSAKYLMETWPFGELLCKAVLSIDYYNMFTSIFTLT
MMSVDRYIAVCHPVKALDFRTPAKAKLINICIWVLASGVGVPIMVMAVTRPRDGAVVCMLQFPSPSWYWD
TVTKICVFLFAFVVPILIITVCYGLMLLRLRSVRLLSGSKEKDRSLRRITRMVLVVVGAFVVCWAPIHIF
VIVWTLVDIDRRDPLVVAALHLCIALGYANSSLNPVLYAFLDENFKRCFRQLCRKPCGRPDPSSFSRARE
ATARERVTACTPSDGPGGGAAA
372 aminoasit
```

Şekil 1.3 Üç farklı tip opioid reseptörlerinin aminoasit sekansları (NCBI sayfasından alınmıştır)

GTPaz aktivitesi, opioid agonistlerinin bağlanmasını düzenler. Opioid reseptöre agonist bağlanmasıyla intraselüler değişiklikler olur ve G proteininin G_{α} ve $G_{\beta\gamma}$ alt birimleri ayrılır. G_{α} proteini potasyum kanalını etkiler ve potasyum akışı artarak membran hiperpolarizasyonuna neden olur. Diğer G-protein bağlı reseptörlerde olduğu gibi cAMP üretimi azalır, adenilil siklaz enzimi inhibe olur. $G_{\beta\gamma}$ alt biriminin ayrılmasıyla kalsiyum geçişi inhibe edilir. Sinaptik veziküllerde ve sinaptozomlardaki kalsiyum içeriği azalır. Voltaj kapılı kalsiyum kanalı inhibe olunca nörotransmitter madde salgısı baskılanmış olur (Şekil 1.4). Böylelikle sinyal aktarımı durur (Al-Hasani ve Bruchas, 2011; Yaksh, 2013).



Şekil 1. 4 Opioid reseptörleri sinyal transferinin moleküler mekanizması (Raffa, Netter, Rawls ve Beyzarov, 2004).

1.1.3 Kodein Bazının Analiz Metotları

Farmakolojik ve toksikolojik aktiviteleri nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılan kodeinin biyolojik örneklerde analitik metotlarla çabuk ve hassas analizi büyük önem taşır (Popa, Oprean, Curea ve Preda, 1998). Gaz kromatografi (GC), Gaz kromatografi-Kütle spektrometresi (GC-MS), Kapiler elektroforez, İnce tabaka kromatografisi (TLC), Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), Yüksek performans ince tabaka kromatografisi (HPTLC), UV-Vis spektrofotometre, Sıvı kromatografi-Kütle spektrometri-Kütle spektrometri (LC-MS-MS) gibi birçok analiz yöntemiyle plazma ve idrar gibi biyolojik sıvılarda kodein tespiti yapılabilir (M. Bhandari, A. Bhandari ve A. Bhandari, 2011).

Kodeinin analize hazırlanması sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-faz ekstraksiyonu gibi metotlarla gerçekleştirilebilir. Katı faz ekstraksiyonu kolay ve pratik oluşu, kısa zamanda gerçekleştirilebilmesi ve çözücü sarfiyatındaki ekonomikliği nedeniyle daha sık kullanılmaktadır. Nitrojen spesifik deteksiyon ile veya türevlendirerek Gaz

Kromatografi, Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi ile oldukça duyarlı kodein ölçümleri sağlanmıştır (Pascual ve Sanagustin, 1998). Gaz Kromatografi ölçüm yöntemi duyarlığı avantajının yanında uygulanabilirliğinde kısıtlılığa yol açan numunelerin türevlendirilmesi gerekliliği ve alev iyonizasyonu dedektörünün duyarlılığı kısıtlaması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. GC-MS oldukça pahalı ve karmaşık bir cihaz tasarımına sahip olması nedeniyle her laboratuarda bulunamaz (Tsina, Fass, Debban ve Matin, 1982). Kodeinin sahip olduğu doğal floresan özellik nedeniyle floresans dedektöre sahip HPLC cihazı ile tayini gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kodeine spesifik yanıt verir (Tsina ve diğer, 1982; Weingarten, Wang ve Roberts, 1994). Opioid alkaloidlerinin biyolojik örneklerde tespiti için en fazla kullanılan yöntemler TLC ve GC-MS analiz yöntemleridir (Popa ve diğer, 1998). Kodeinin HPLC ile tayini; pratikliği, ekonomik ve hızlı oluşu ve sonuçlardaki güvenilirliği nedeniyle kullanımı en çok tavsiye edilen yöntemdir (Freiermuth ve Plase, 1996; Pascual ve Sanagustin, 1999).

1.2 Yapay Sinir Ağları (YSA)

1.2.1 YSA Modellemesi

Yapay zeka (AI) bilgisayar biliminde birçok alanda kullanımı mevcut olan ve karmaşık gibi görünen problemleri insan beynini taklit ederek çözebilen matematiksel sistemlerdir. Yapay zekada iki temel kategori vardır. Bunlardan biri insan tecrübelerini taklit eden sistemlerdir ve çıkarsamalar yapar. Diğeri ise YSA'da olduğu gibi beynin bazı durumlarda izlediği yolu taklit eder. İnsan tecrübelerini taklit eden sistemler medikal çözümlerde kullanılmaktadır. İnsan beyni yaklaşık 100 milyar nöron ve bu nöronların birbirleriyle yaptığı binlerce sinaps sayesinde durumları öğrenir, hafızaya alır, tecrübe eder. Farklı durumlara tepki olarak gerektiğinde bu öğrendiklerini değerlendirerek kullanır (Agatonovic-Kustrin ve Beresford, 2000). Sinir Ağları insan beyninin durumları incelemesi ve bunlara karşı tepki geliştirmesini sağlayan biyolojik nöronları taklit ederek hazırlanmış matematiksel sistemlerdir (Marengo, Gennaro ve Angelino, 1998; Zupan, 1994). Olağan durumlar ile bu durumlara oluşturulan tepkiler arasındaki lineer olmayan

ilişkilere dayanarak tekrarlamalı öğrenmelerle modelleme yapar (M. Bos, A. Bos ve van der Linden. W.E., 1990; Demir, Dural, Alyuruk ve Cavas, 2012; Ghaffari ve diğer, 2006). Lineer hesaplamalara ilişkin yapılan hesaplamalarla alınacak sonuçlar YSA ile yapılacak sonuçlardan çok daha iyi olabilir (Zupan, 1994). YSA modellemelerinde, giriş verileri ile çıkış verileri arasında net bir ilişkiye gerek yoktur (Heravi ve Fatemi, 2000). Giriş verileri katmanı, birden fazla gizli katman ve çıkış verileri katmanı YSA'ların temel bileşenleridir (Khodadoust, 2012; Marengo, Gennaro ve Angelino, 1998). Tüm bu bileşenler birbiriyle paralel etkileşim içerisinde çalışmaktadır (Zhao, Yue, Ni, Zhou ve Zhang, 1999). Bu etkileşimler biyolojideki sinapslara karşılık gelmektedir (Takahara, Takayama ve Nagai, 1997; Zupan, 1994). Giriş verisi katmanı herhangi bir bilgi işlemediğinden inaktif katman olarak değerlendirilir (Gao ve diğer, 2002; Zupan, 1994).

YSA programlanarak değil tecrübeyle güdümlenerek çalışan ve bilgiye bu şekilde ulaşan matematiksel modellerdir. İnsan beyninin dijital olarak modelleştirilmiş şekli olarak düşünülebilir (Agatonovic-Kustrin ve Beresford, 2000). Nöronlar arasındaki matematiksel büyüklüklerin optimizasyonunun sağlanması için öğrenme (alıştırma) aşamasında giriş verileri, hata oranı fonksiyonda belirtilen oranın altına düşene kadar yinelemeli olarak ileri beslenir (Marengo, Gennaro ve Angelino, 1998). Hedef değerlerle tahmin edilen değerler arasındaki hata, yani tahmindeki hata, tekrarlamalı öğrenmelerle küçültülür ve belirlenen doğruluğa ulaşılır (Guo, Lu ve Zheng, 1999; Heravi ve Fatemi, 2000; Marengo, Gianotti, Angioi ve Gennaro, 2003). Buradaki tekrarlamalı öğrenmeler sırasında oluşan giriş verisi çıkış verisi çiftlerine iterasyon (döngü, devir, epoch) denir (Ghaffari ve diğer, 2006; Zupan, 1994). Doğrulama ve test hatalarının birbirine yakın olduğu zaman modelin genelleştirilmesi gerçekleştirilir (Khodadoust, 2012). YSA'yı diğer alışılagelmiş yöntemlerden özel kılan özellikler arasında örüntü tanıma, hata payı, örneklerle öğrenme sayılabilir (Havel, Pena, Hernandez, Doucet ve Panaye, 1997).

YSA giriş verileri ile çıkış verilerini birbirine matematiksel büyüklüklerle bağlayan yapay nöronlardan oluşur (Vasiljevic, Onjia, Cokesa ve Lausevic, 2004). Tek katman veya çok katman yapay nöronlu sistemler mevcuttur. Tek katmanlı

sistemler kompleks problemleri öğrenme ve genelleştirmek konusunda yetersizdir. Sisteme bir veya daha fazla gizli katman eklemekle bu sorun çözülür (Ghaffari ve diğer, 2006).

Giriş verileri olan sinyaller matematiksel büyüklüklerle çarpılarak bir araya getirilir ve transfer fonksiyonu kullanarak çıkış sinyallerini oluşturmak üzere nöronlar üzerinden aktarılır. Kullanılan transfer fonksiyonu çoğunlukla sigmoidal (lojistik) fonksiyondur (Agatonovic-Kustrin, Zecevic, Zivanovic ve Tucker, 1998; Takahara, Takayama ve Nagai, 1997). İki katmanlı YSA modellemesinde kullanılan sigmoidal transfer fonksiyonu (tansig) (1.2) ve lineer fonksiyon (purelin) (1.1) aşağıdaki eşitliklerde belirtilmiştir (Mert, Topcam ve Cavas, 2014).

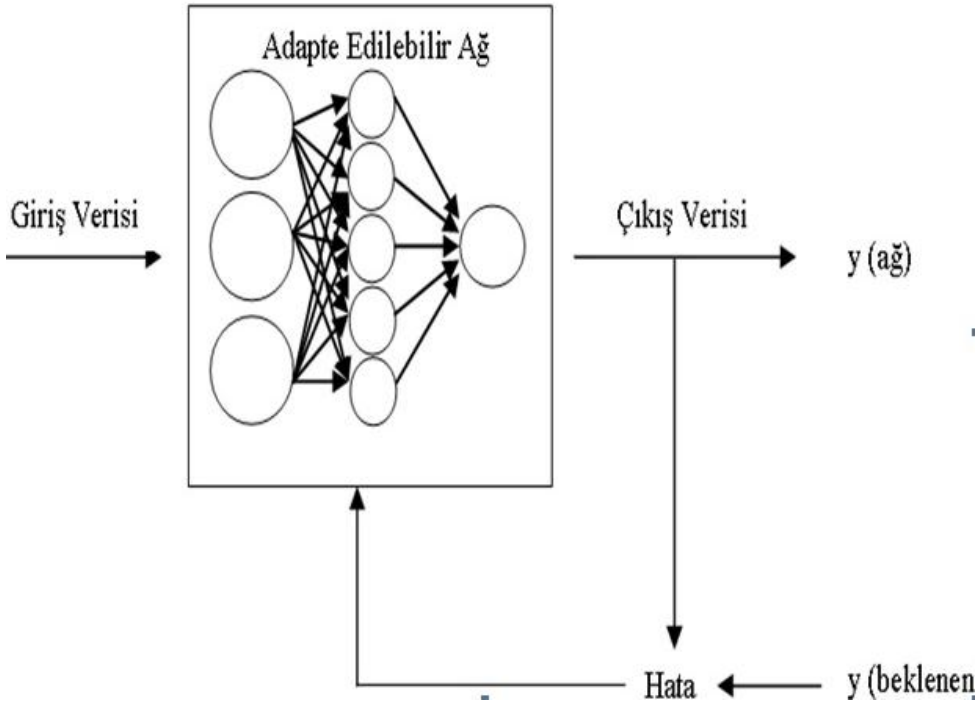
$$\alpha = purelin(n) = n \tag{1.1}$$

$$\alpha = \tan sig(n) = \frac{2}{(1 + \exp(-2 * n)) - 1} \tag{1.2}$$

2 temel bağlantı formülü vardır: geri beslemeli ve ileri beslemeli bağlantı. Geri beslemeli bağlantıda bir tabakadaki çıkış verisi bir önceki tabakanın giriş verisine geri döner ve matematiksel etkileşim içerisine girer. İleri beslemeli bağlantıda böyle bir durum söz konusu değildir. İleri beslemeli tabakalı YSA lineer olmayan çok değişkenli verilerin analizine uygun oldukça güçlü modellerdir (Agatonovic-Kustrin, Beresford, 2000). İleri beslemeli YSA'nın performans kriteri ağdaki çıkış verileri ile hedef çıkış verileri arasındaki hata kareler ortalamasıdır (MSE) (Loukas, 2000).

Çok katmanlı ileri beslemeli YSA modelleri güçlü lineer olmayan haritalama kapasitesi nedeniyle oldukça tercih edilen modellerdir (Cavas, Karabay, Alyuruk, Dogan ve Demir, 2011). Sinyal, giriş verileri katmanından çıkış verileri katmanına doğru akar (Marengo ve diğer, 2003; Yan, Jiao, Hu ve Fan, 1999). Sinir ağı modelinin çalışması 2 aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada giriş verileri ile çıkış

verileri sisteme tanıtılır ve matematiksel büyüklüklerle nöronlar arası bağlantı kuvvetini ayarlaması sağlanır (Şekil 1.5). İkinci aşamada; bağlantı kuvvetinin ayarlanmasında kullanılan matematiksel büyüklükler vasıtasıyla giriş verilerinin doğruya oldukça yakın çıkış verilerini tahmin etmesi temin edilir (Demir ve diğer, 2012). Bu şekildeki modellemeye güdümlü öğrenme modeli de denir (Agatonovic-Kustrin, Zecevic ve Zivanovic, 1999; Jan ve diğer, 1999). Daha fazla matematiksel büyüklükle daha güçlü ağ modelleri elde edilir (Tham ve Agatonovic-Kustrin, 2002).



Şekil 1.5 YSA modellerinin çalışma düzeni (Agatonovic-Kustrin ve Beresford (2000) çalışmasından esinlenerek çizilmiştir)

Gizli katmandaki nöron sayısının optimizasyon çalışmalarının yürütülmesi ile oldukça esnek ve tatmin edici sonuçlar alınabilecek YSA modelleri elde etmek mümkündür. (Marengo, Gianotti, Angioi ve Gennaro, 2003). Eğer bir ağ modeli uzun süre öğrenme yaptırılırsa genelleme kabiliyetini kaybeder (Ghaffari ve diğer, 2006). Modelin genelleştirilmesinin sağlanması için veri setindeki verilerin doğrulama (öğrenilen verilerin performansının kontrolü için), test (öğrenme aşamasında sinir ağının performansının kontrolü için) ve öğrenme verileri (sinir ağını eğitmek için) olarak ayrılmış olması önemlidir (Agatonovic-Kustrin ve diğer, 1998;

Agatonovic-Kustrin, Zecevic ve Zivanovic, 1999). Teori olarak birçok fonksiyonun tek gizli katman kullanılarak yaklaşık olarak tahmin edilebilmesi mümkündür (Agatonovic-Kustrin ve Beresford, 1999).

Birçok öğrenme algoritması mevcuttur. En sık kullanılanı Delta-kuralı veya Geriyayılım (backpropagation) olarak adlandırılan algoritmadır (Ghaffari, 2006; Zhao ve diğer, 1999). Küçük ve orta çaplı problemlerde oldukça iyi sonuç vermesine rağmen aynı etkiyi büyük çaplı problemler üzerine gösterememektedir. Bir diğer dezavantajı da hesaplamalarda saklanması gereken Jacobian matriks verilerinin hafızada büyük yer tutmasıdır. Tüm bunlara ilaveten hesaplamalardaki zaman ihtiyacının da fazla olması eklenince üzerinde birkaç modifikasyon yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır (Jan ve diğer, 2000; Yu ve Wilamowski, 2010; Zhao ve diğer, 1999). Levenberg-Marquardt algoritması geriyayılım öğrenme algoritması olarak kullanılan algoritmalardan biridir. Hatayı ikinci derece denklem kullanarak yaklaştırır. Kenneth Levenberg – Donald Marquardt'ın önerdiği hızlı ve istikrarlı yakınsayan bir modeldir. Eğim düşümü (gradient descent) ile Gauss-Newton metotlarının kombine şekilde kullanımı ile oluşturulan Levenberg-Marquardt algoritması öğrenme algoritmaları arasında en etkili olduğu kabul edilen yöntemdir (Loukas, 2000; Yu ve Wilamowski, 2010).

1.2.2 YSA'nın Endüstride Kullanımı

YSA hızlı ve etkili sonuç vermesi ile kaliteyi, tutarlılığı ve performansı etkilemesi nedeniyle kullanılan oldukça güçlü bir matematiksel tahmin aracıdır (Ghaffari ve diğer, 2006). Son gelişmelerle birçok alanda kullanılması ve oldukça esnek olmasından dolayı farklı türdeki problemlere yanıt verebiliyor olması nedeniyle YSA üzerindeki ilgi artmış ve sınıflandırma, modelleme, ilişkilendirme ve haritalandırma gibi temel konularda çalışmalar artmıştır (Marengo, Gennaro ve Angelino, 1998; Zupan, 1994).

Kromatografik termodinamik konusu altında oldukça önemli olan yapı-alıkonma endeksi arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için YSA modellemeleri kullanılmaktadır

(Fatemi, 2002; Gao ve diğer, 2003). Klinik kimyada böbrek taşının bileşimini tahmin etmekte kullanımı mevcuttur (Volmer ve diğer, 1994).

Oldukça karmaşık lineer olmayan etkileşimler içermesi nedeniyle ilaçların kontrollü salınımları ve dozajlarının ayarlanması konusunda YSA kullanılmaktadır (Chen, McCall, Baichwal ve Meyer, 1999; Ghaffari ve diğer, 2006).

Sharp, Mitsubishi Elektrik, Avon gibi firmalar makine yazımı veya el yazımı karakter tespitlerinde YSA kullanmaktadır. American Express, Mellon Bank, First USA Bank kredi kartı dolandırıcılığı tespitinde, endüstrideki birçok firma kalite kontrol ve kalite güvence programlarında, Arco ve Texaco gibi şirketler petrol aramalarında, elektrokardiyograf, pap smear sistemleri gibi medikal uygulamalarda sınıflandırmak için YSA kullanımı yapılmaktadır. YSA kullanımı; Kontrol ve optimizasyon için yarı iletken proses kontrolünden, petrol rafineri proses kontrolüne, çelik üretim aşmalarından besin ve kimyasal formülasyona kadar birçok alanda şirket sahiplerine milyonlarca dolar kazandırmış ve hala kazandırmaya devam etmektedir. Askeri alanda da oldukça yaygın bir kullanım alanı mevcuttur. Düşman hareketlerinin kontrolü ve yorumlanması, optik teleskop odaklanması, füze yönlendirilmesi gibi uygulamalar görülmektedir. Ford, General Motors gibi büyük otomotiv firmaları motor hata tespiti, problem çözümü, aktif süspansiyon kontrolü gibi hayati konularda YSA'ndan destek almaktadır. Proteinlerdeki aminoasit sekansları, nükleotid sekansları, RNA, DNA dizilimleri, ECG ve EEG dalgalarının sınıflandırılması, hastaya uygun ilaç tedavisinin bulunması, aritmi, göğüs kanseri tespiti, şizofreni modellemesi, akciğer nodül tespiti gibi biyomedikal alanlarda YSA kullanımının entegre edilmesi ile zaman ve para açısından karlı çıkılmıştır (Widrow, Rumelhart ve Lehr, 1994).

1.2.3 YSA'nın HPLC Optimizasyonunda Kullanımı

YSA, HPLC analizlerinin optimizasyonunda kullanılabilir (Mert, Topcam ve Cavas, 2014). Kimya alanında spektroskopiden elektrokimyaya kadar birçok kinetik çalışmalarda YSA'nın kullanımı artmıştır. YSA'ların kullanımı ile kromatografik verilere dayanarak alıkonma zamanı ve örüntü tanıma (pattern recognition)

konusunda tatmin edici sonuçlar alındığı görülmüştür (Marengo, Gennaro ve Angelino, 1998). Pik gözlemleme, yüzey tepki modellemesi ve mobil faz optimizasyonunda yol gösterici olmuştur (Marengo, Gennaro, Angelino ve 1998; Zhao ve diğer, 1999). YSA'nın HPLC metot geliştirilmesi konusunda güçlü bir araç olduğu görülmüştür (Agatonovic-Kustrin ve diğer, 1998).

1.3 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

1.3.1 HPLC Terimleri ve Kromatogram Tanımı

Küçük organik veya inorganik moleküllerden polimerlere ve proteinlere kadar birçok molekülün ayrılmasında oldukça etkili olan HPLC için gerekli olan tek şey uygun yöntemin belirlenmesi ve optimizasyonudur. Bu optimizasyon için sabit fazın bileşiminin, mobil fazın içeriğinin, sıcaklığın ve akış hızının iyice etüt edilmesi gerekmektedir. Saflık kontrolü, kalite kontrolü, çevresel ve farmasötik preparatların analizi HPLC cihazıyla yapılabilen analizlerdir (Skoog, Holler ve Nieman, 1998).

Sabit Faz: Durağan faz da denen; katı bir faz veya katı üzerine emdirilmiş sıvı fazdan oluşan, karışımdaki molekülleri adsorblama özelliğindeki kromatografi bileşenidir.

Hareketli Faz: Yönteme göre sıvı veya gaz halde olabilen, sabit faz üzerine adsorblanan karışımdaki moleküllerin farklı hızlarla sabit faz üzerinden sürüklenmesini sağlayan kromatografi bileşenidir.

Ölü zaman (t_0): Maddelerin alıkonmadan kolonu terk ettikleri zamana karşılık gelir.

Alıkonma Zamanı (t_r): Enjekte edilen örneğin kolonda tutulma zamanını ifade eden bir terimdir. Temel olarak; mobil faz, akış hızı (mL/dk), mobil faz kompozisyonu (çözücü oranları, pH, iyon), kolon sıcaklığı ve kolon kompozisyonu (ters faz, normal faz, C8, C18 gibi) gibi faktörlerden etkilenir. Alıkonma zamanı kapasite faktörüyle ifade edilebilir.

Sıvı kromatografisinde ayırma mekanizmalarını etkileyen iki faktör bulunur:

1) Hareketli ve sabit fazın polaritesi
2) Sabit faz ile gerçekleşen moleküller arası etkileşimler (Skoog, Holler ve Nieman, 1998).

1.3.2 HPLC Bölümleri

HPLC cihazının bölümleri Şekil 1.6'da gösterilmiştir.

Solvent Taşıyıcısı: Mobil fazın hazırlandığı ve depolandığı uygun cam şişeleri ve mobil faz akış yollarını içerir.

Solvent Degasser Ünitesi: Mobil faz içerisindeki baloncukların kolona girişini engeller.

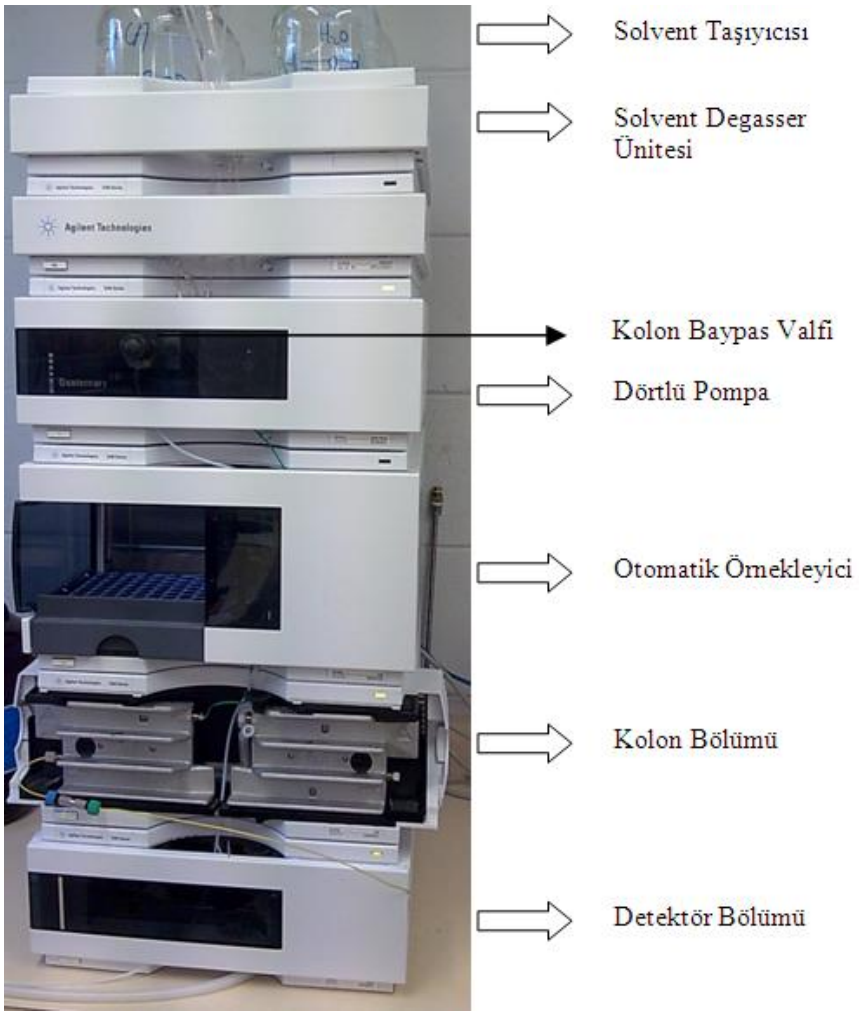
Dörtlü (Quaternary) Pompa: Mobil fazı uygun oranlarda karıştırır ve kolonun içerisinden geçerek detektöre ulaşmasını sağlamak üzere sabit tanımlı bir akış hızı oluşturur.

Otomatik Örnekleyici (Autosampler): Programlı şekilde yerleştirilen vialler içerisindeki örneklerin içerisinden belirli miktar örnek çekilmesi ve kolona enjeksiyonunu sağlar.

Kolon Bölümü: Kolonun prosedürde belirlenen sıcaklıkta kalmasını ve muhafazasını sağlar.

Detektör Bölümü: Düzenli aralıklarla belirli dalga boyunda veya belirli dalga boyu aralığında ölçüm alınan kısımdır.

Kolon Baypas Valfi: Mobil fazın kolona uğramadan geçmesi için tasarlanmış kısımdır. Mobil faz değişikliklerinde akış yolunun yeni mobil fazla temizlenmesi için kullanılır (Skoog, Holler ve Nieman, 1998; Snyder ve Kirkland, 1979).



Şekil 1.6 HPLC cihazının bölümlerinin gösterimi

1.3.3 HPLC Çeşitleri

4 HPLC çeşidi bulunmaktadır (Skoog, Holler ve Nieman, 1998; Snyder ve Kirkland, 1979):

A. Dağılma (Partition)
   a) Ters Faz Dağılma Sıvı Kromatografisi
   b) Normal Faz Dağılma Sıvı Kromatografisi

B. Adsorbsiyon Sıvı Kromatografisi
C. İyon Değiştirme Sıvı Kromatografisi
D. Jel Geçirgenlik veya Moleküler Eleme Sıvı Kromatografisi

1.3.4 Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC)

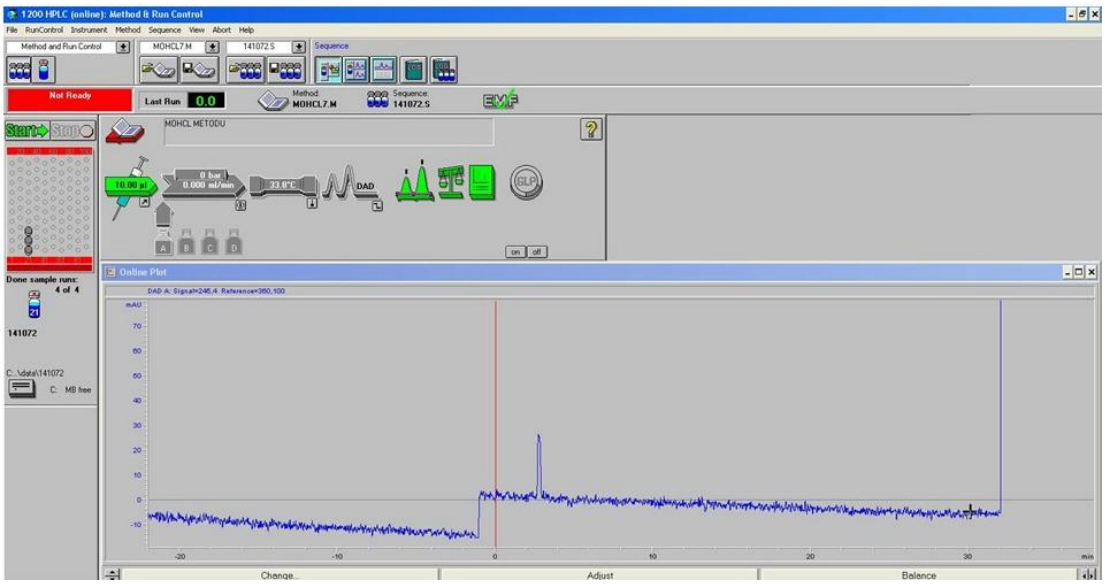
Molekülleri non-polar (apolar, hidrofobik) karakterine göre ayırmaya yarayan oldukça etkili bir yöntemdir. Non-polar moleküllerden polar moleküllere kadar birçok madde üzerinde etkili bir ayırma fonksiyonu vardır. RPLC metodunda sabit faz hidrokarbon zincirinden oluşan non-polar moleküllerden, mobil faz ise polar özellikteki solventlerden seçilir. Ayrılmak istenen karışım içerisindeki en non-polar molekül kolonda en çok kalandır ve dolayısıyla kolonu en son terk eder.

RPLC geniş bir uygulama alanına sahiptir. Oligomerleri, aromatik hidrokarbonları, proteinleri ayırmada oldukça başarılı bir yöntemdir (Aguilar, 2004; Skoog Holler ve Nieman, 1998).

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE METOT

2.1 Materyaller

Metanol (Merck 1.06012.2500) kullanıldı. Sonuçların okunmasında HP Compaq dc5100MT masaüstü bilgisayar ve HP ChemStation 3D yazılımı kullanıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 HP Chemstation 3D

Kolon olarak 4,6 mm x 250 mm boyutlarında Inertsil ODS3 C8 kolon tercih edildi. Bu kolon 3 oktil gruplarının silika jel üzerine bağlanması ile oluşturulur ve ODS kolonları üzerine sıkıca tutunan maddelerin alıkonma zamanını düşürür yönde etki gösterir.

Agilent Marka HP 1200 Model HPLC cihazı ile ölçümler alındı. Ölçümlerin alındığı cihaz; DAD G1315B Dedektör, G1329A Autosampler, G1322A Degasser ünitesi ve Quat G1311A dörtlü pompa konfigürasyonuna sahiptir.

2.2 HPLC Verilerinin Elde Edilmesi

Kodein bazının metanol içerisinde % 0,1'lik solüsyonu hazırlandı ve HPLC'ye bu konsantrasyonda enjekte edildi. Enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Ters faz sıvı kromatografisi ile izokratik mobil faz akışıyla sonuç alındı.

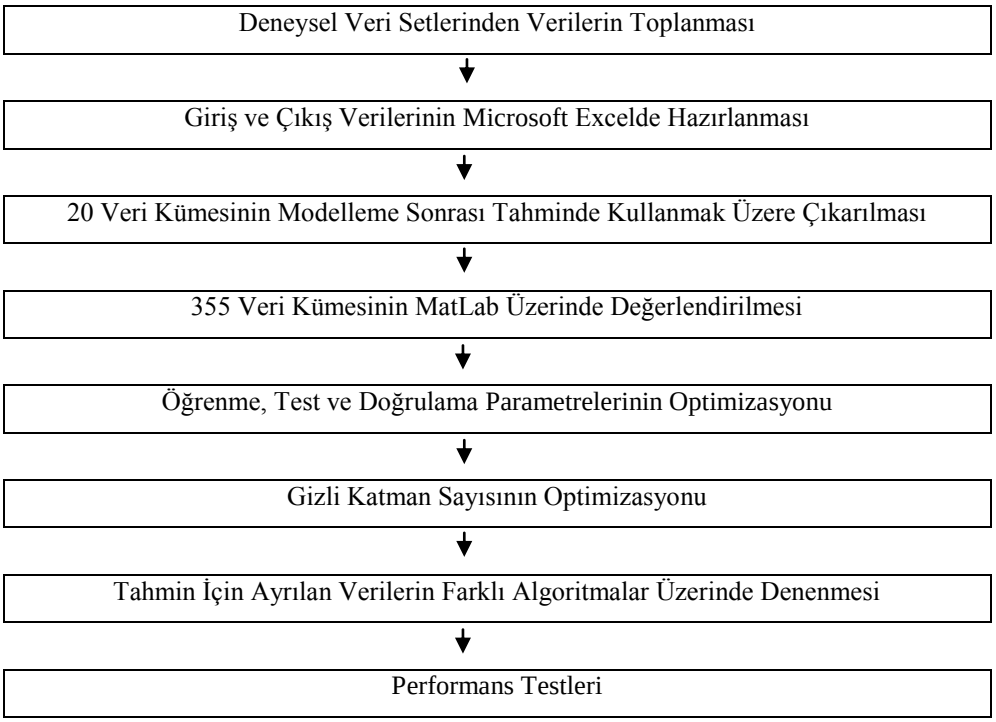
Kodein bazının metanol içerisindeki % 0,1'lik solüsyonu tek kullanımlık vial şişelerine koyuldu ve kapağı kapatılarak Autosampler'a yerleştirildi.

Kolon, mobil faz, HPLC ölçüm koşulları ve materyalleri seçiminde European Pharmacopoeia 8th Edition (Volume II - Council of Europe - Strasbourg) analiz metotları baz alınmıştır. Deney setleri hazırlanırken baz alınan metot üzerinden akış hızı için ± 0,2 mL/dk, mobil faz oranı için ± %2 ve kolon sıcaklığı için ± 2 °C aralığında değerler değiştirilerek 5 farklı deney seti oluşturulmuştur. Her deney setinde farklı bir oranda hazırlanmış mobil faz kullanılmıştır. Akış hızı ve sıcaklık değerleri değiştirilerek mobil faz sabit tutulmuştur. YSA modellemesinde kullanılmak üzere 5 farklı deney setiyle alıkonma süreleri elde edilmiştir. Mobil faz her değiştirildiğinde deney seti numaralandırması da değişmektedir. Bu yüzden ilk çalışılan mobil faza ilişkin deney setine "1. Deney Seti" denilmiştir.

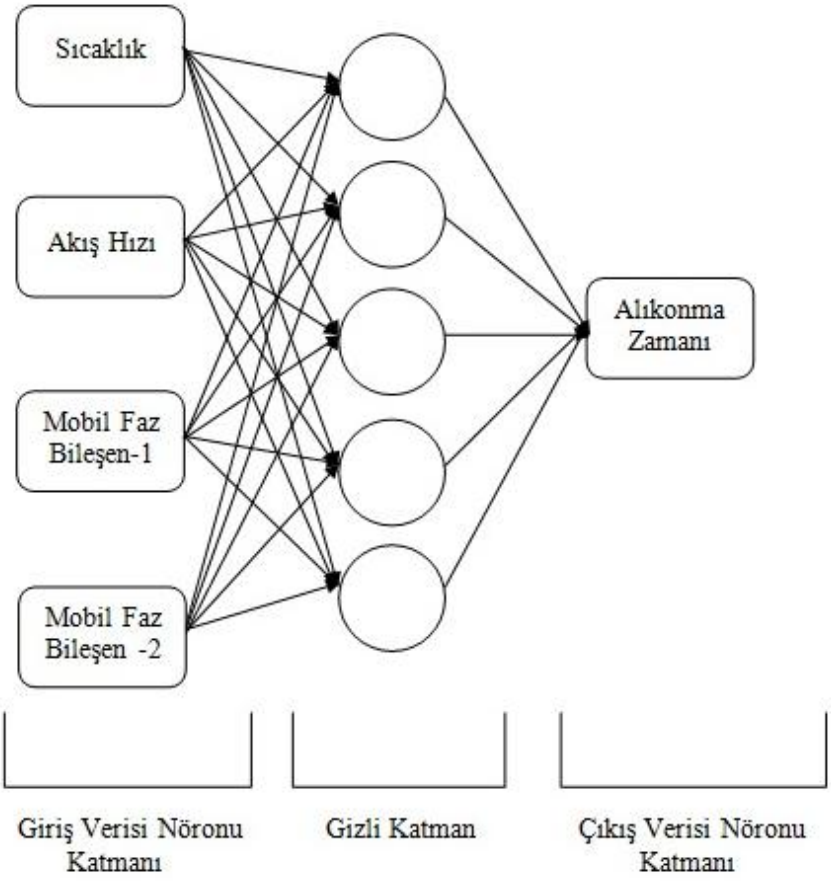
Kolona numune enjeksiyonu yaptırılmadan akış yolu mobil fazla yaklaşık 5 dakika 5 mL/dk'lık akış hızıyla yıkandı (purge). Ardından çalışılacak akış hızında mobil faz akıtılarak düz bir temel çizgi elde edilmeye çalışıldı. Her iki numune enjeksiyonu arasında 5'er dakikalık aralık (post purge) bırakıldı. Akış hızı, sıcaklık ve mobil faz değiştirilerek 5 farklı deney seti ile kodein bazının alıkonma zamanlarının tespiti yapıldı. Deney setinin her elemanı 3 tekrar çalışıldı.

Toplam 375 HPLC kromatogramından kaydedilen alıkonma zamanları kullanılarak MatLab R2013b programı ile "YSA Modellemesi" çalışıldı. Optimizasyon için MatLab *nftool* fonksiyonu, farklı algoritmaların kullanılmasıyla alıkonma zamanının tahmini için MatLab *nntool* fonksiyonu kullanıldı.

Tablo 2.1 Tez akış şeması



İki katmanlı YSA modellemesiyle çalışıldı (Şekil 2.2). Hiperbolik tanjant sigmoid fonksiyonu aktivasyon fonksiyonu olarak seçildi. Hızlı oluşu ve hafıza kullanımındaki etkinlik nedeniyle Levenberg-Marquardt öğrenme algoritması kullanıldı. μ ve β sırasıyla 0,001 ve 10 olarak ayarlandı.

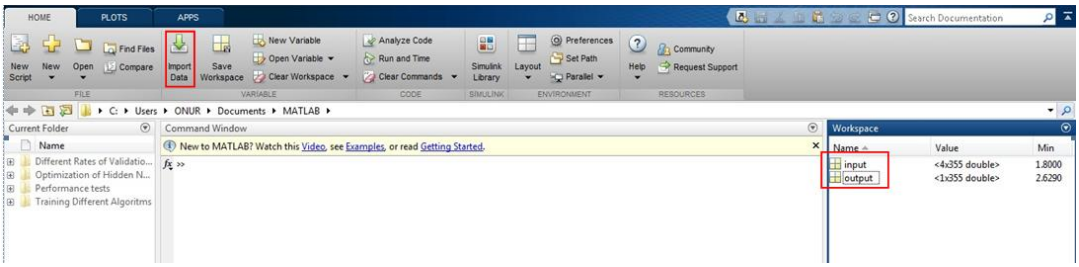


Şekil 2.2 İki katmanlı 5 gizli nörona sahip 25 matematiksel büyüklük içeren YSA modeli

2.3 MatLab Programı YSA Fonksiyonlarının - *nftool, nntool* - Kullanımı

2.3.1 Verilerin Sisteme Girilmesi

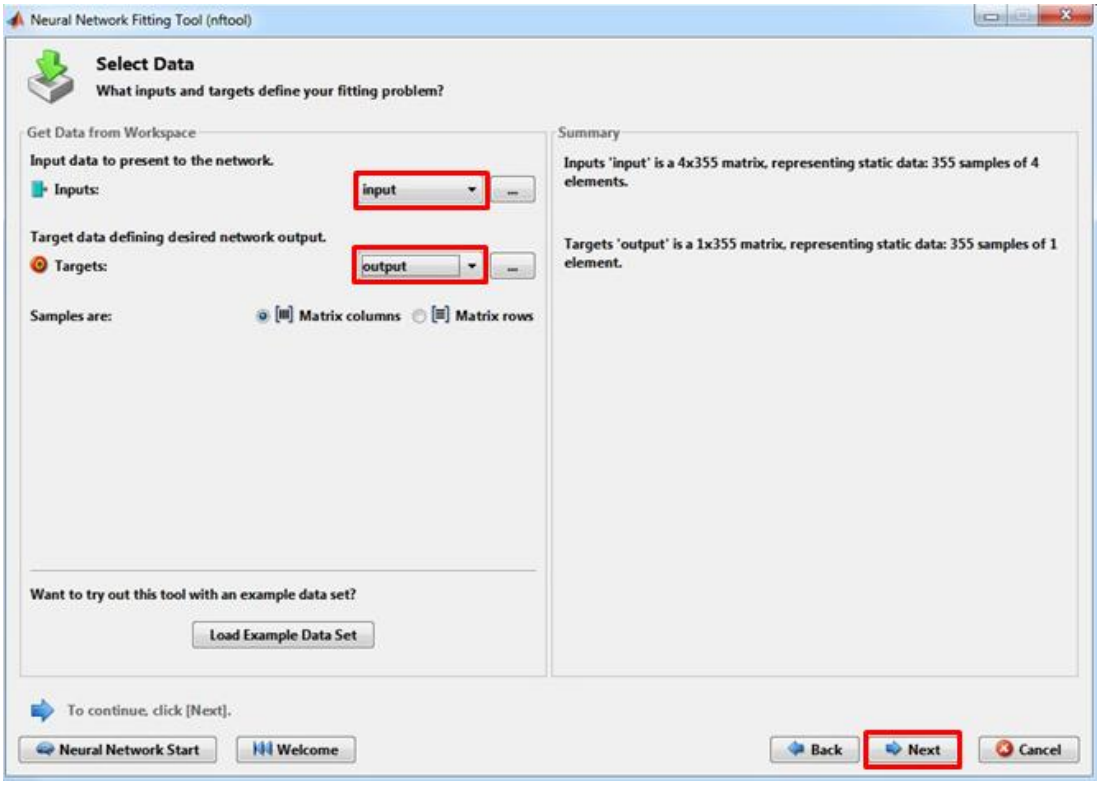
Programın "Import Data" kısmından önce giriş verilerinin bulunduğu "input" (giriş) verileri seçilir ve "matrix" seçeneği seçilerek bu formatta sisteme girilir. Bu modelde giriş verileri 4 temel kategoriden - akış hızı, sıcaklık ve mobil faz karışımını oluşturan iki kimyasal oranından - oluşmaktadır. Verilerin sisteme 4 element 355 veri şeklinde girildiğinden emin olunur. Aynı şekilde "output" (çıkış) verileri de seçilir ve düzenlenir. Çıkış verileri alıkonma zamanından oluşmaktadır. 1 element 355 veri şeklinde girildiğinden emin olunur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Verilerin sisteme girilmesi

2.3.2 nftool Fonksiyonunun ve Verilerin Girilmesi

MatLab ana ekranında fonksiyon olarak "*nftool* (neural network fitting tool)" girilmesi durumunda optimizasyonun yapılması için gerekli "input" ve "output" verilerinin girilmesini gerektiren pencere açılacaktır. 4 elemente ait 355 verinin bulunduğu giriş verileri ve 1 elemente ait 355 verinin bulunduğu çıkış verileri "Summary (özet)" kısmında görülmektedir. Tüm veriler girildikten sonra "next" (ileri) seçeneğine tıklanır (Şekil 2.4).

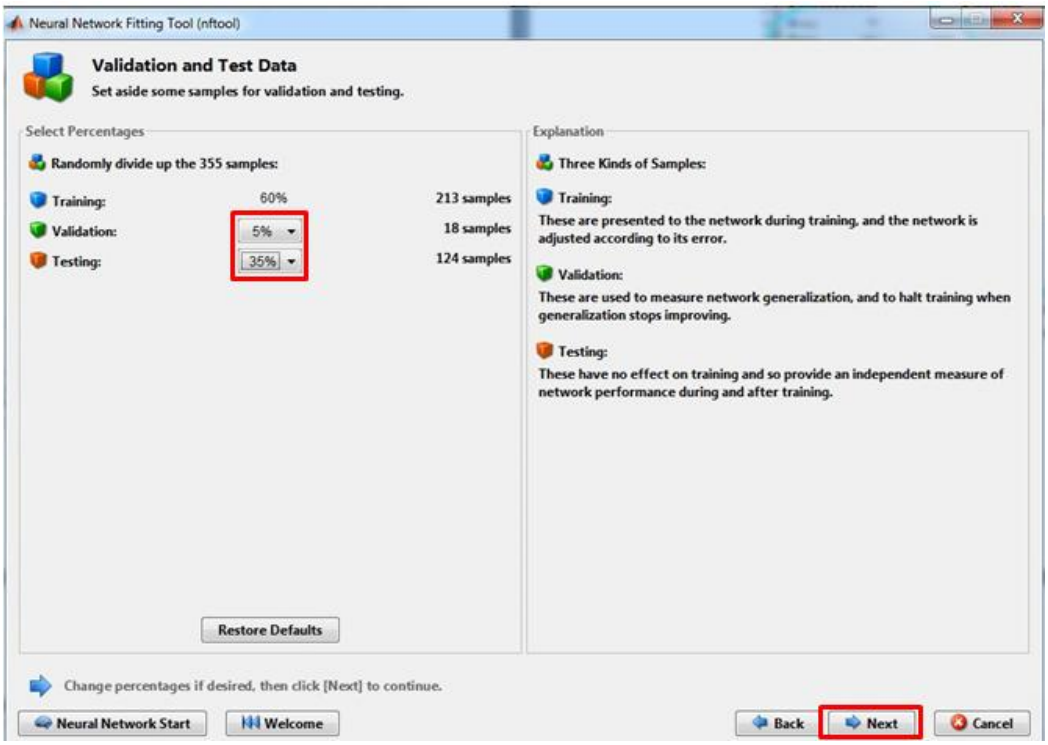


Şekil 2.4 *nftool* fonksiyonunun girilmesi ve verilerin seçilmesi

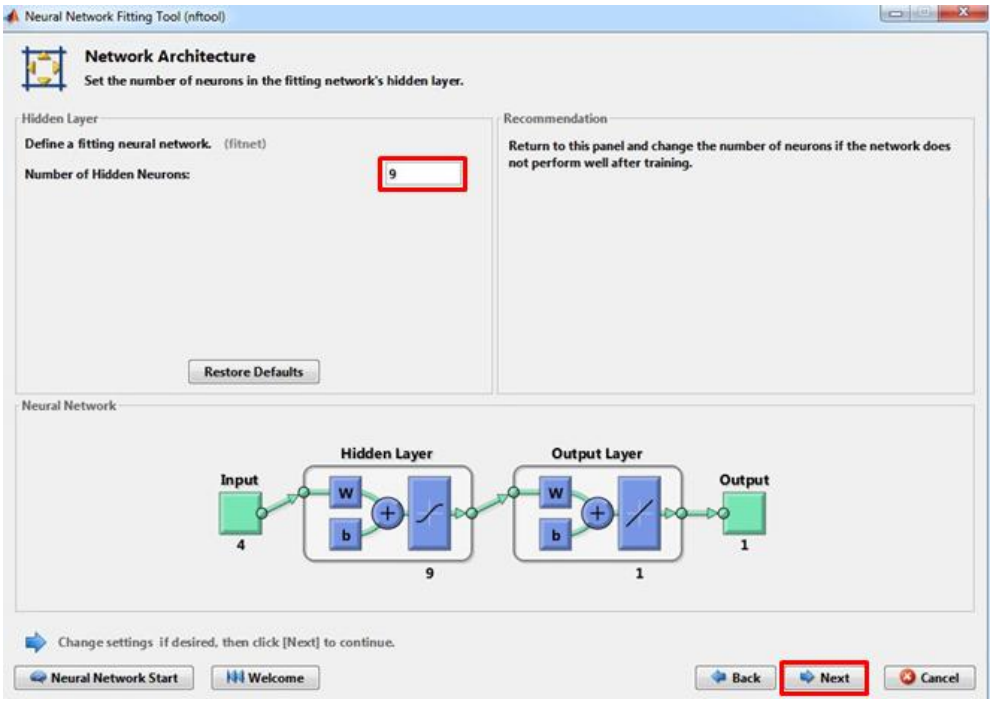
2.3.3 Doğrulama (Validation), Test (Testing) ve Öğrenme (Training) Verilerinin Oranlarının ve Gizli Nöron Sayısının Değiştirilerek Optimizasyonun Sağlanması

Veriler sisteme tanıtıldıktan sonra ileri tuşuna basılarak gelen ekranda doğrulama (validation), test (testing) ve öğrenme (training) verilerinin oranları yanı sıra gizli nöron sayılarının da değiştirilmesini sağlayan ara yüz belirecektir (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6). "Train" yani "çalıştırma" kısmıyla YSA modeli ve modele ilişkin verilerle grafikler elde edilir (Şekil 2.7). Elde edilen grafikler yorumlanır. R^2 ve hata kareler ortalaması (MSE) değerleri kaydedilir.

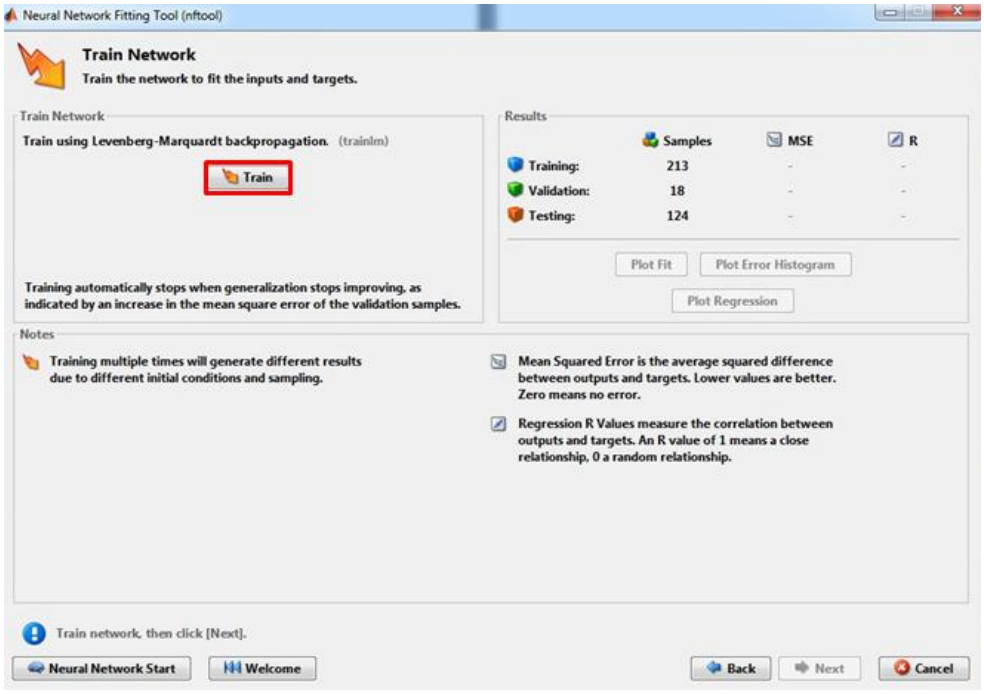
"epoch" değerleri kaç döngüde modelin yaratıldığını gösterir. "plotperform" ve "plotregression" sekmelerinden modele ilişkin performans ve regresyon grafikleri incelenebilir (Şekil 2.8).



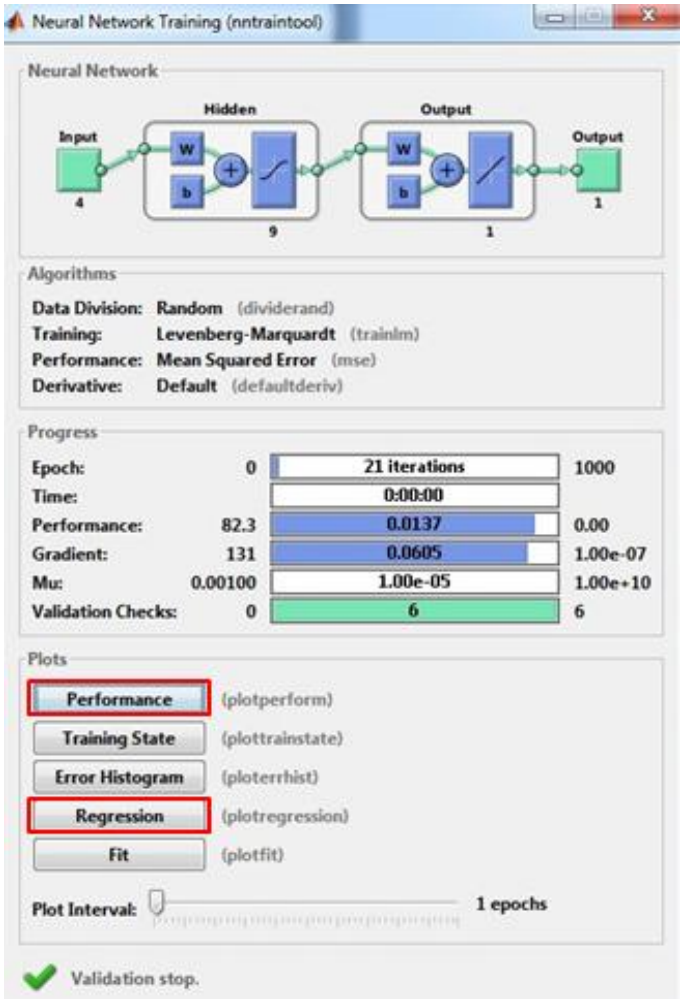
Şekil 2.5 Doğrulama, test ve öğrenme verilerinin oranlarının değiştirilmesi



Şekil 2.6 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi



Şekil 2.7 ANN modelinin oluşturulması ve öğrenme, doğrulama ve teste ilişkin MSE ve R^2 verilerinin elde edilmesi

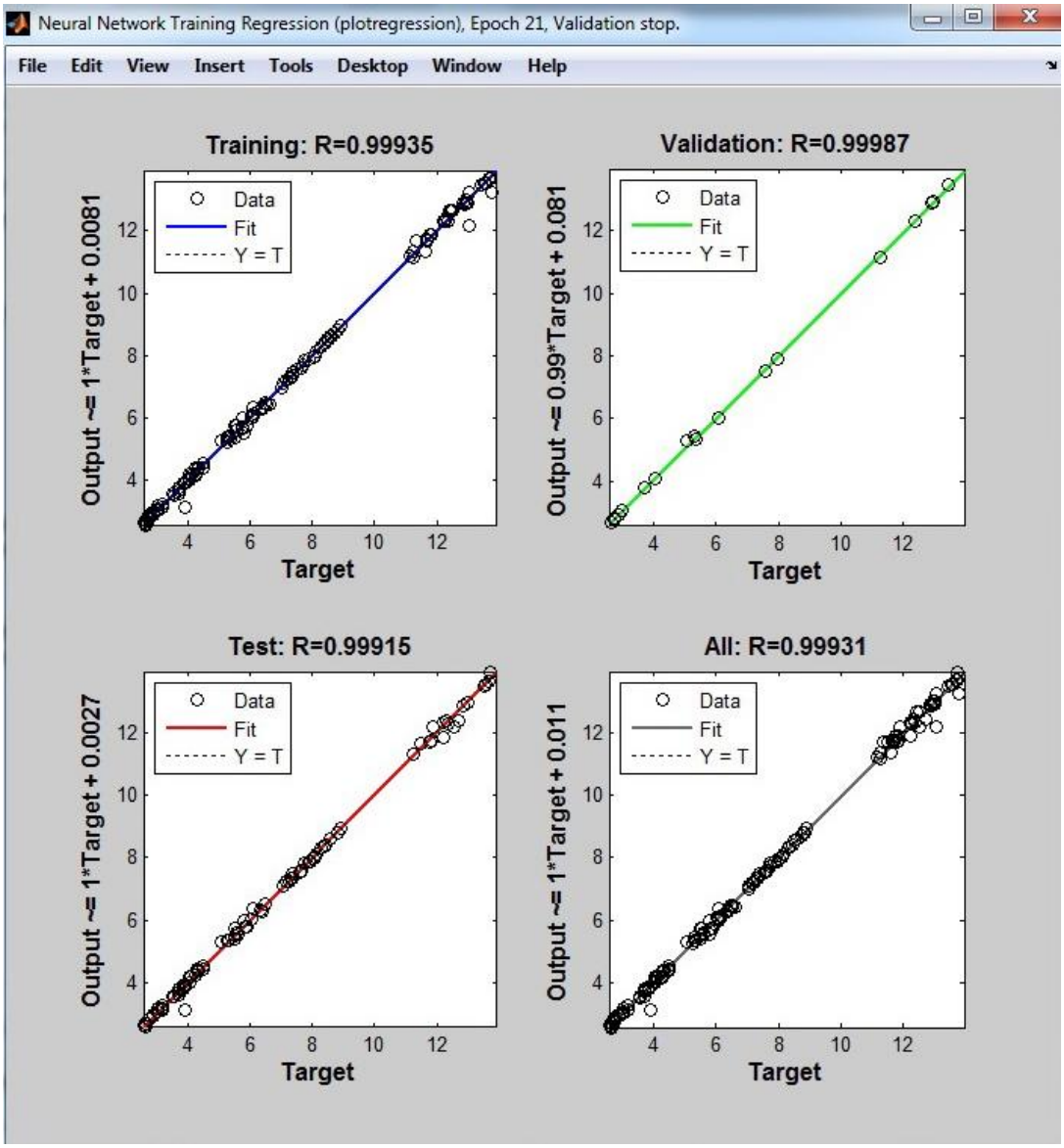


Şekil 2.8 Döngü sayısı, performans grafiği ve regresyon grafiğine ulaşılması

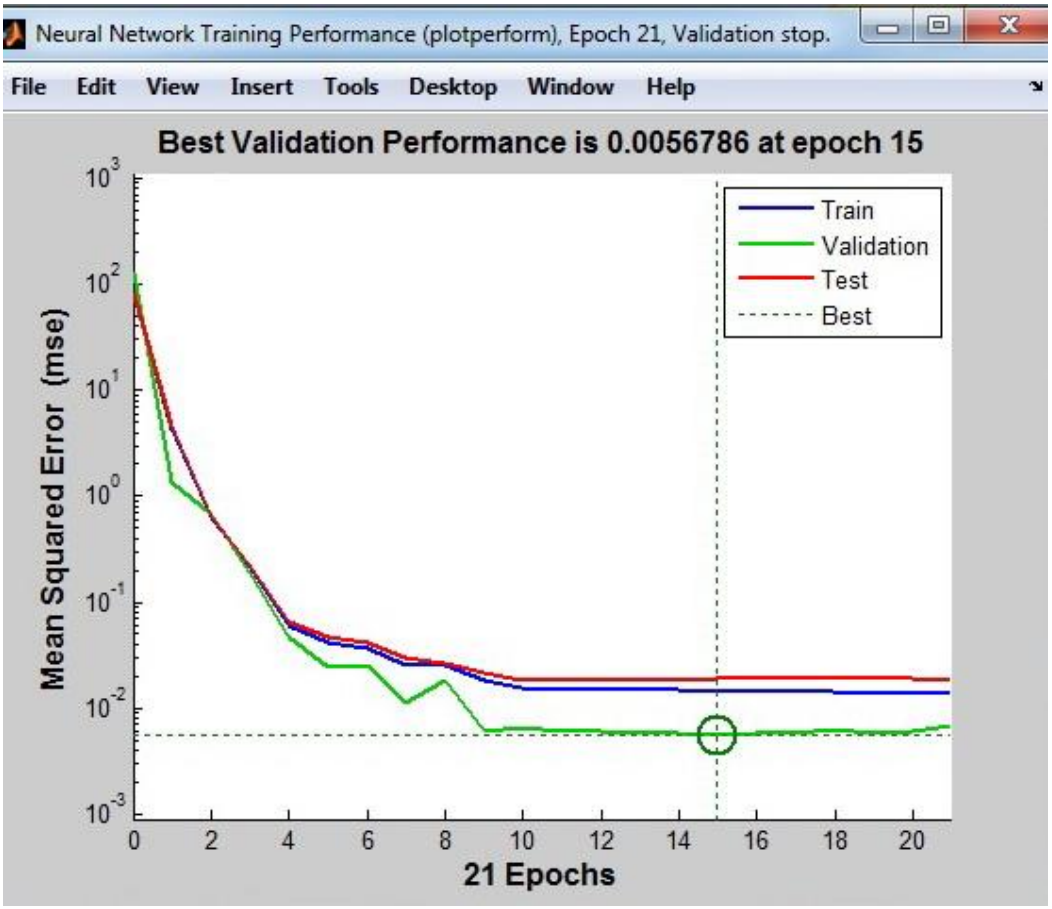
2.3.4 Performans ve Regresyon Grafiği Örnekleri

Elde edilen regresyon grafikleri ile öğrenme, doğrulama, test ve tümünü ayrı ayrı içeren R^2 değerlerine ilişkin verilerle beraber grafikler elde edildi (Şekil 2.9).

Elde edilen performans grafikleri ile öğrenme, doğrulama ve testin MSE değerlerini bir arada içeren grafikler elde edildi (Şekil 2.10). Bu grafiklerle ayrıca en iyi doğrulama performansının hangi döngüde hangi MSE değeriyle elde edildiğine ilişkin bilgiler edinildi.



Şekil 2.9 Regresyon grafiği örneği



Şekil 2.10 Performans grafiği örneği

2.3.5 "nntool" Fonksiyonunun Girilmesi ve Verilerin Değerlendirilmesi

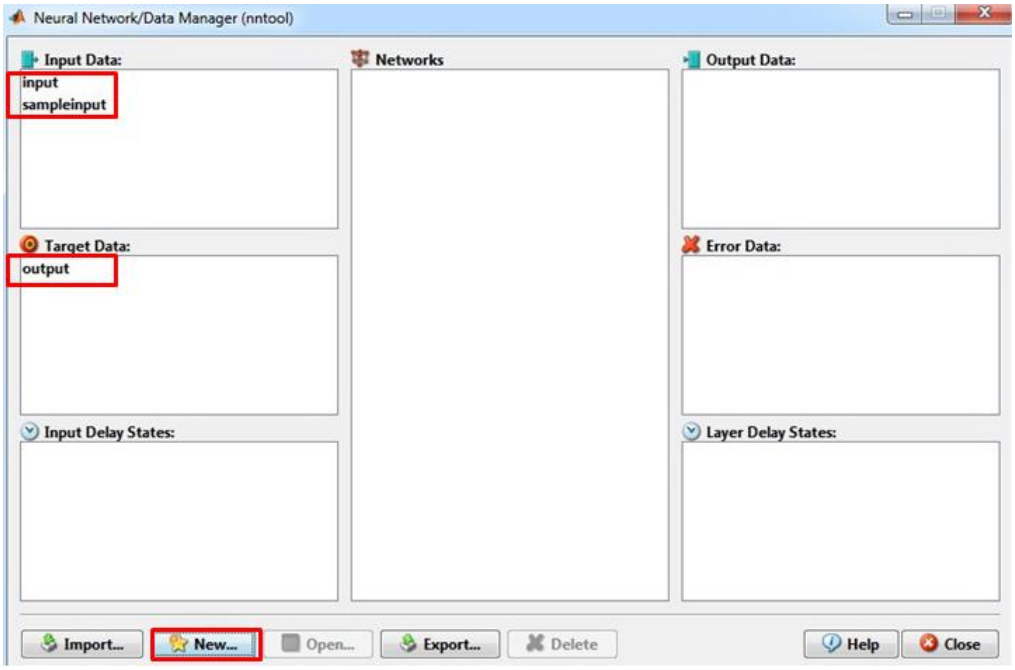
MatLab ana ekranında fonksiyon olarak "*nntool* (neural network toolbox)" girilmesi durumunda; "import (içe aktar)" seçeneği ile giriş verilerinin "input", çıkış verilerinin de "target" kısımlarına eklenerek farklı algoritmalarla farklı modellemelerin yapılabileceği pencere açılır (Şekil 2.11). Tüm veriler girildikten sonra "new" (yeni) seçeneğine tıklandı.

Giriş verisi ve çıkış verisi ilgili yerlere atandı, optimum nöron sayısı olan "9" girildi ve YSA katman sayısı "2" olarak seçildi (Şekil 2.12). Öğrenme fonksiyonu (training function) her defasında değiştirilip "create (yarat)" seçeneğine tıklanarak oluşturulan modellemeler, "ağlar (networks)" kısmında alt alta görüldü.

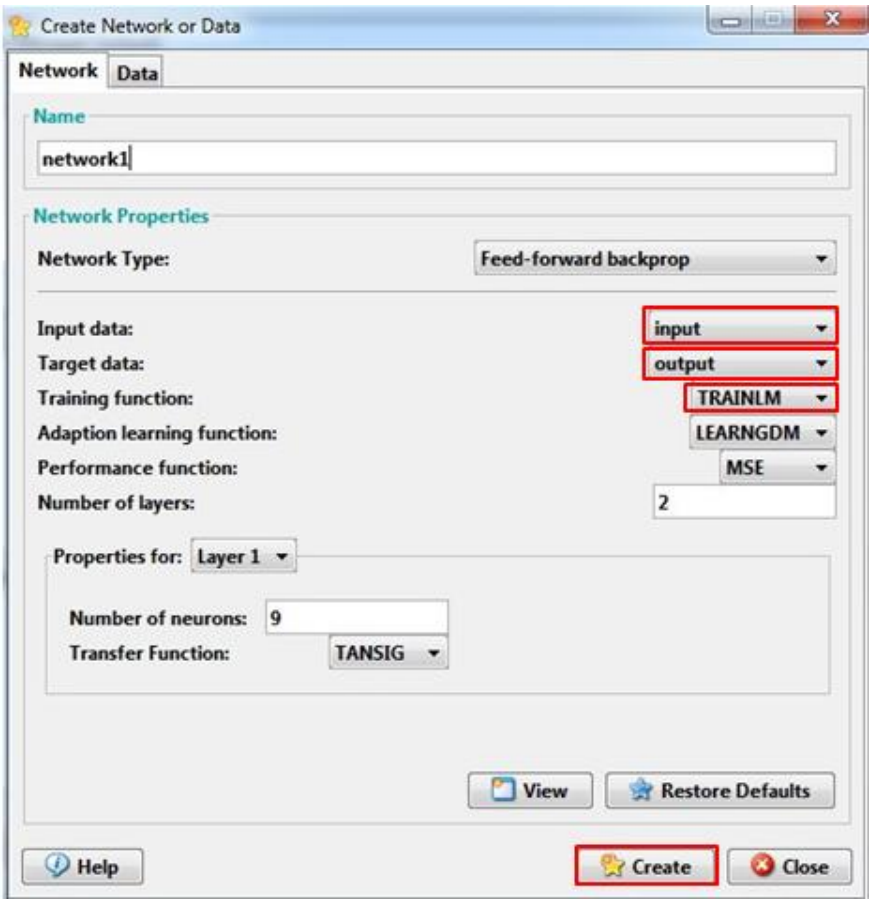
Önceden seçilen 20 örnek veri "sampleinput" olarak programa içe aktarıldı (import). Oluşturulan modele çift tıklanarak açılan pencerede "train (öğret)" sekmesinden giriş ve çıkış verileri girildi ve "train network (ağı çalıştır)" seçeneği tıklanarak model oluşturuldu (Şekil 2.13). "Simulate (simüle et)" sekmesine tıklandı ve giriş verisi olarak örnek verileri girildi (Şekil 2.14). "Simulate network (ağı simüle et)" tıklanarak tahmin verileri "output data" kısmına işlendi. Çift tıklanarak tahmin verileri açıldı ve kaydedildi (Şekil 2.15). Elde edilen tahmin verileri Şekil 2.16'daki gibi görüldü. Tahminde kullanılan algoritmalar Tablo 2.2'de listelenmiştir.

Tablo 2.2 Tahminde kullanılan algoritmalar

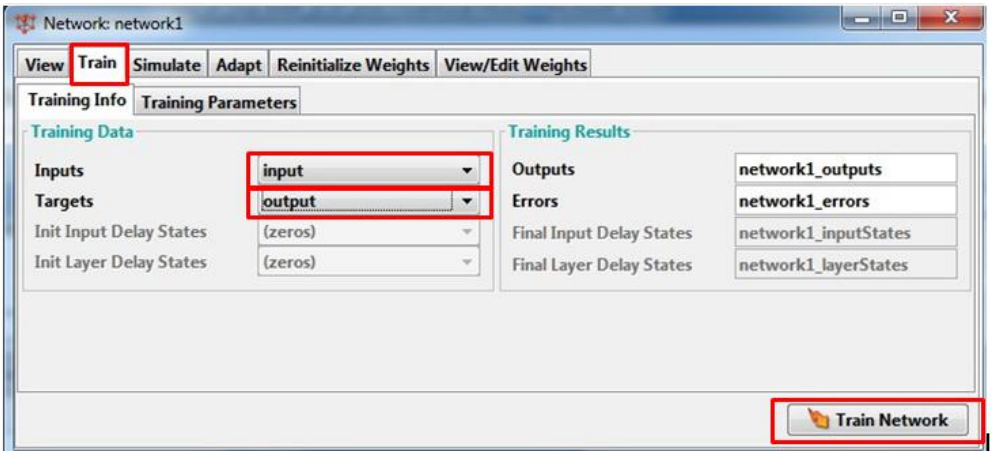
	Kısaltması	Kullanılan Algoritma İsmi
1	trainbfg	BFGS Quasi-Newton Backpropagation
2	trainbr	Bayesian Regulation Backpropagation
3	traincgb	Conjugate Gradient with Powell/Beale Restarts Backpropagation
4	traincgf	Fletcher-Powell Conjugate Gradient Backpropagation
5	traincgp	Polak-Ribiére Conjugate Gradient Backpropagation
6	traingd	Gradient Descent Backpropagation
7	traingdm	Gradient descent with momentum Backpropagation
8	traingda	Gradient Descent with Adaptive Learning Rate Backpropagation
9	traingdx	Gradient Descent with Momentum and Adaptive Learning Rate Backpropagation
10	trainlm	Levenberg-Marquardt Backpropagation
11	trainoss	One Step Secant Backpropagation
12	trainr	Random Order Incremental Training with Learning Functions
13	trainrp	Resilient Backpropagation
14	trainscg	Scaled Conjugate Gradient Backpropagation



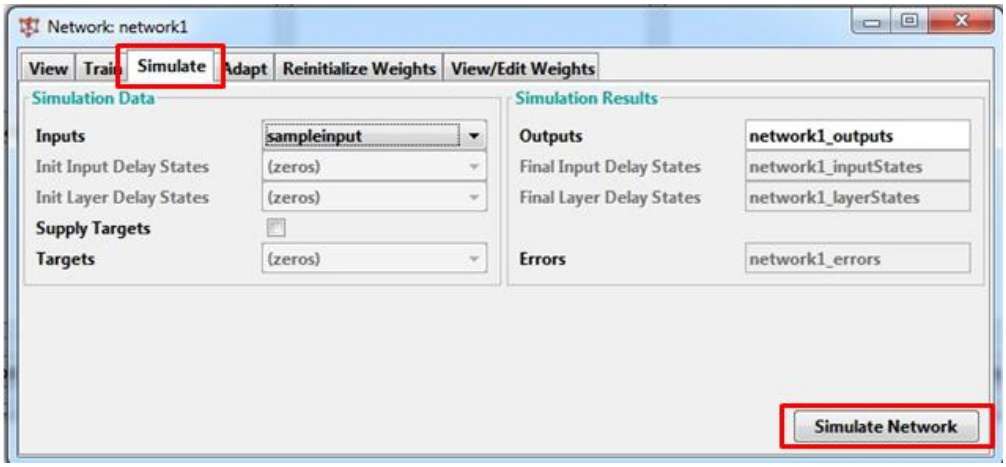
Şekil 2.11 "*nntool*" fonksiyonunda verilerin girilmesi.



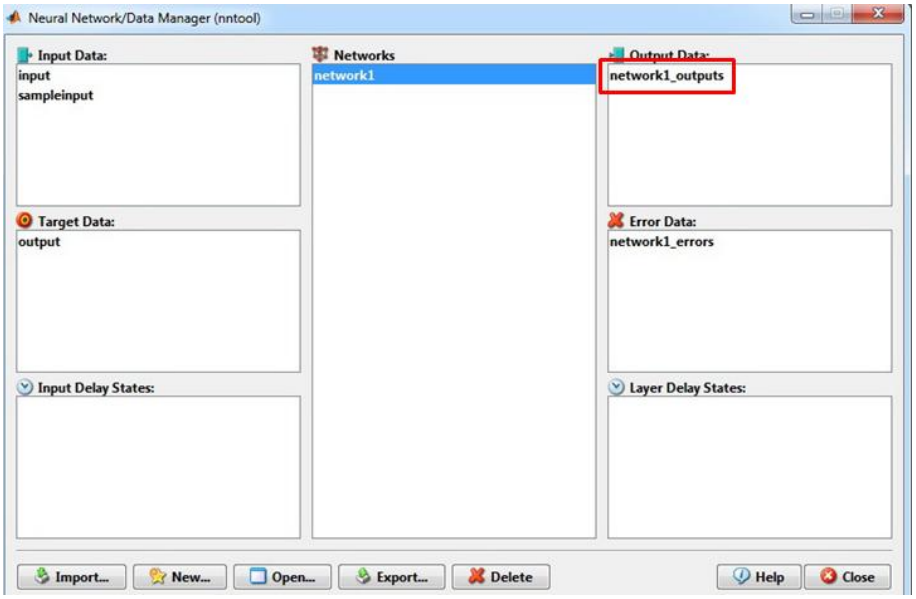
Şekil 2.12 "*nntool*" fonksiyonunda ağ oluşturma



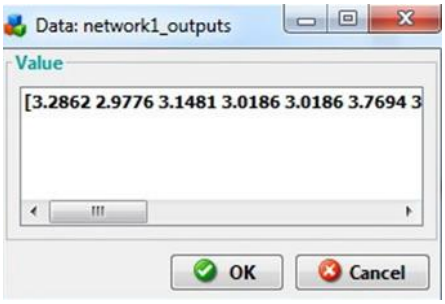
Şekil 2.13 "*nntool*" fonksiyonunda "öğrenme" sekmesinin kullanımı



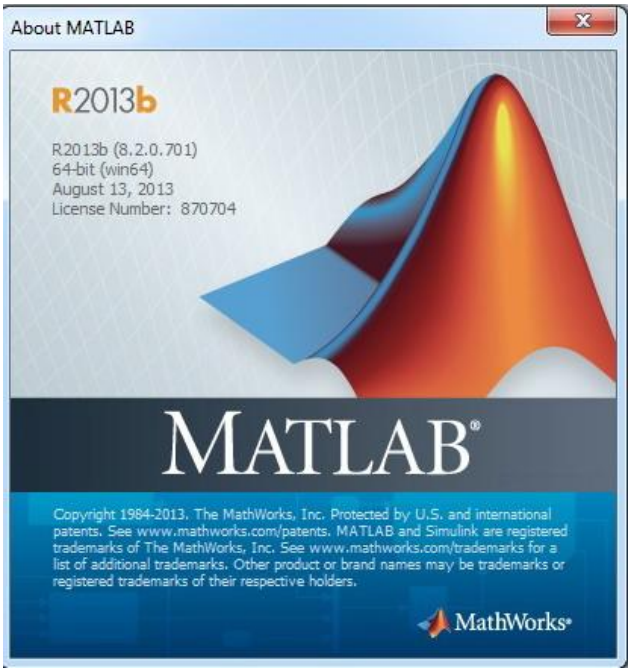
Şekil 2.14 "*nntool*" fonksiyonunda "simüle et" sekmesinin kullanımı



Şekil 2.15 "nntool" fonksiyonunda tahmin verilerinin alınması



Şekil 2.16 Programdan tahmin verilerinin okunması



Şekil 2.17 MatLab R2013b ver. 8.2.0.701

2.4 Duyarlılık Testlerinin Yürütülmesi

Her bir parametrenin tek tek veya birlikte, ağ modelini ne kadar etkilediğini görebilmek için duyarlılık testleri yürütüldü. *nftool* fonksiyonu kullanarak, yukarıda izah edildiği gibi sisteme girildi. Sisteme ayrı ayrı tanıtılan 15 farklı giriş verisi, Levenberg-Marquardt algoritması ve 9 gizli nöron sayısı ile modellenerek elde edilen MSE ve R^2 değerleri değerlendirildi.

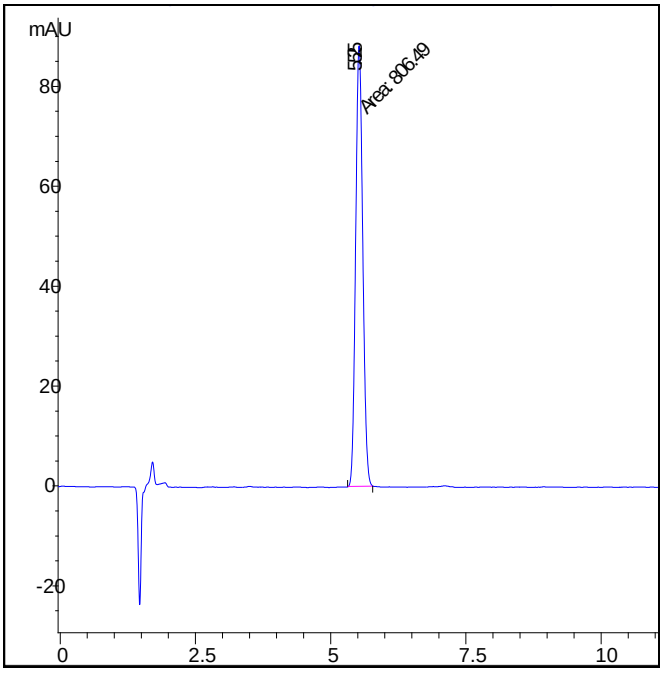
BÖLÜM ÜÇ
SONUÇLAR

3.1 HPLC Kromatogram Örnekleri

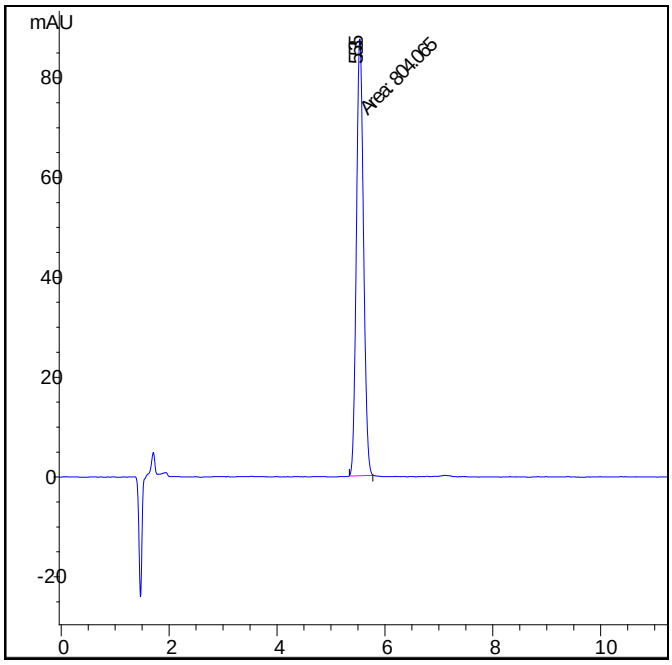
Tez kapsamında toplam 375 kromatogramdan elde edilen alıkonma zamanları değerlendirilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan bazıları; alıkonma zamanıyla ilişkilendirilip örnek olarak sunulmuştur (Şekil 3.1 - Şekil 3.19).

European Pharmacopoeia 8.0'dan baz alınan metot kısaca FM (Farmakopi Metodu) olarak gösterilecektir. Metottaki modifikasyonlar da "FM (artı eksi değerler)" şeklinde girilecektir.

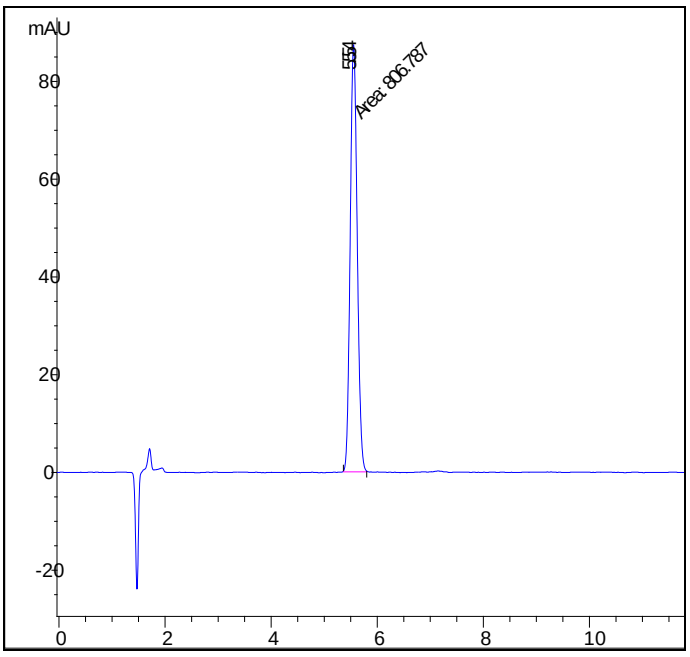
3.1.1 Mobil Fazın Değiştirilmesi



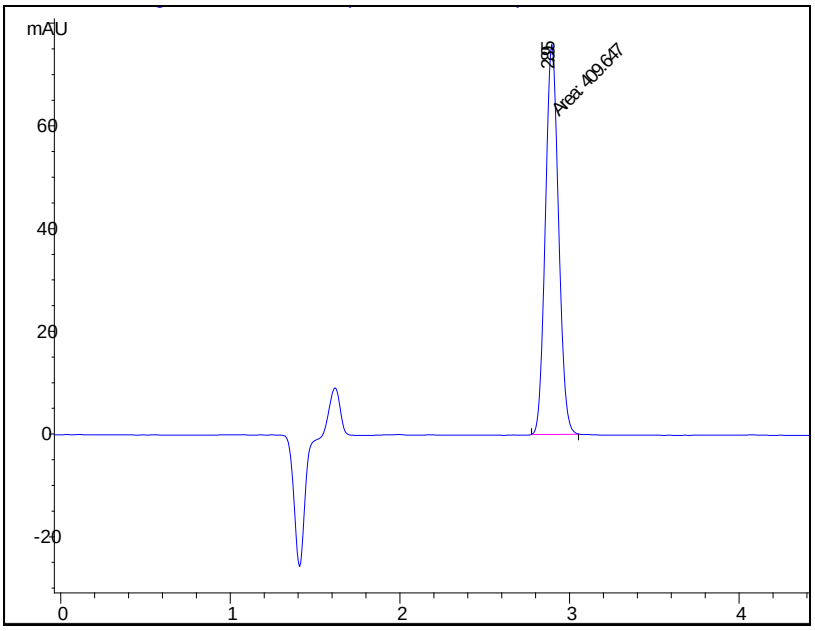
Şekil 3.1 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 3 (FM), 1. Paralel - AZ (Alıkonma Zamanı): 5,525



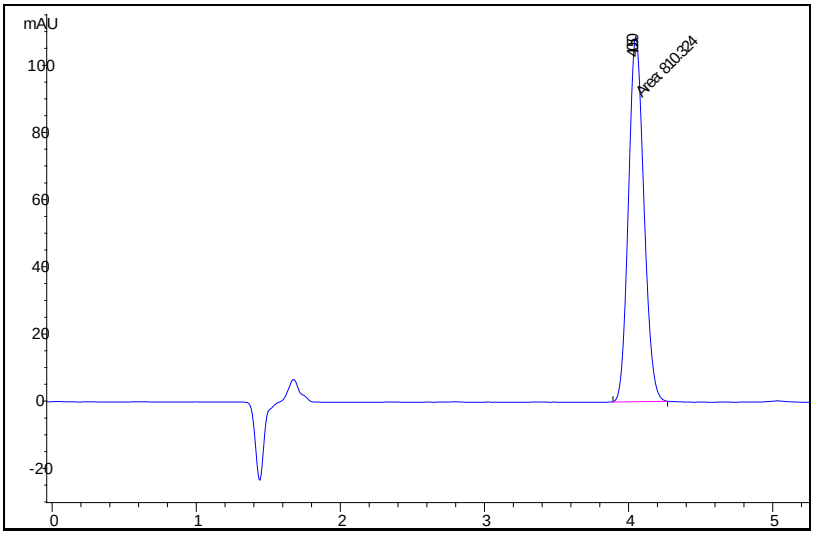
Şekil 3.2 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 3 (FM), 2. Paralel - AZ: 5,535



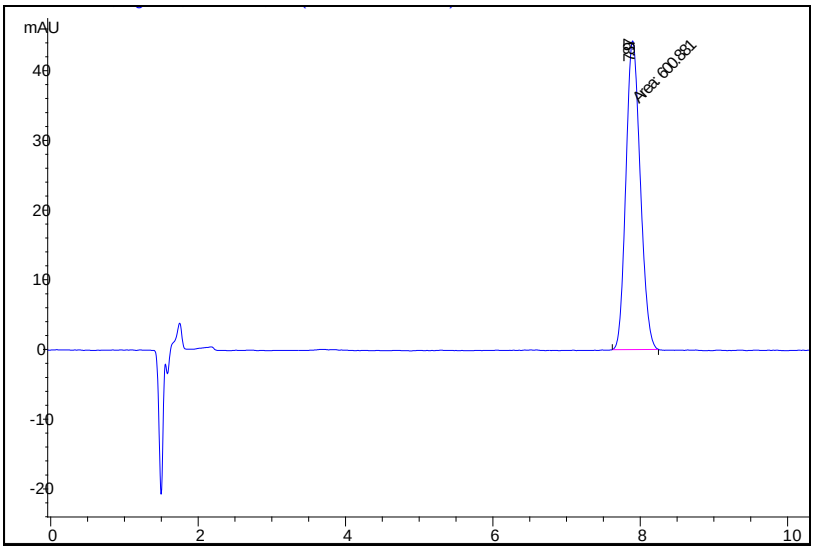
Şekil 3.3 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 3 (FM), 3. Paralel - AZ: 5,554



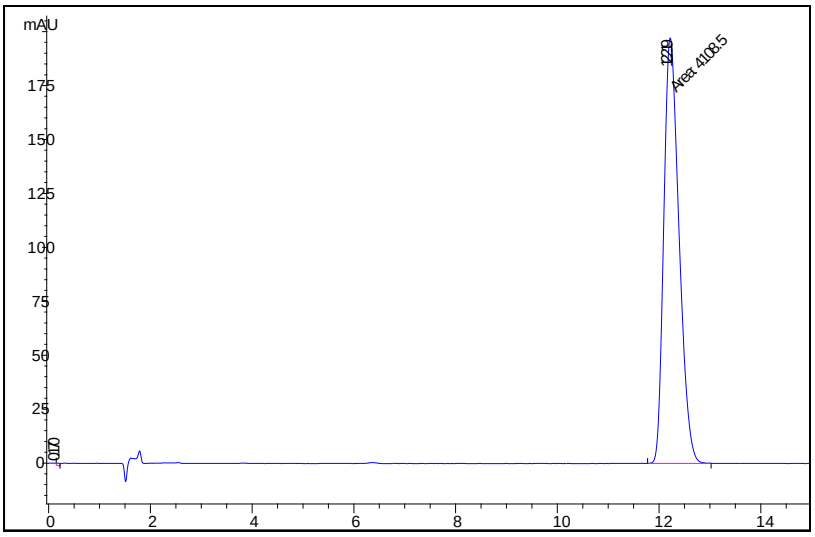
Şekil 3.4 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 1 – AZ: 2,895



Şekil 3.5 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 2 - AZ: 4,050

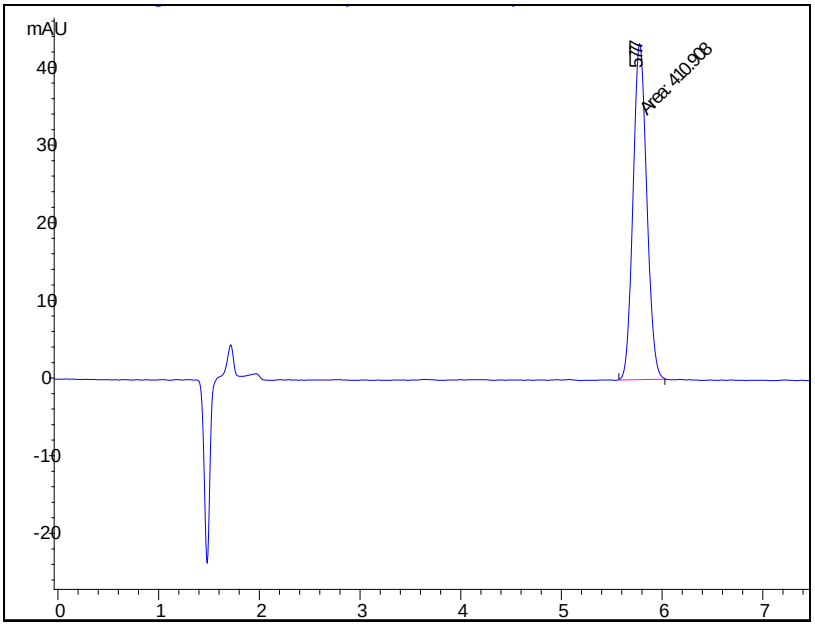


Şekil 3.6 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 4 - AZ: 7,897

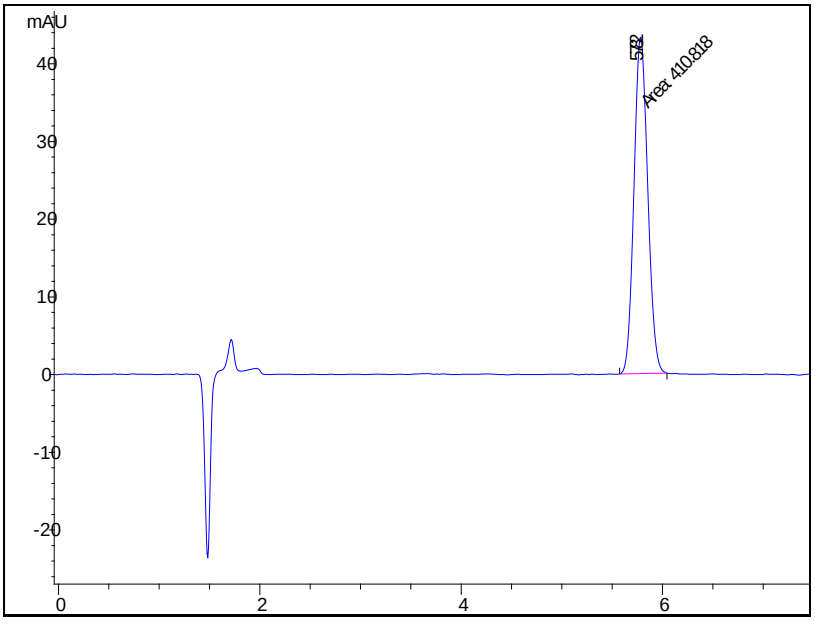


Şekil 3.7 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz 5 - AZ: 12,219

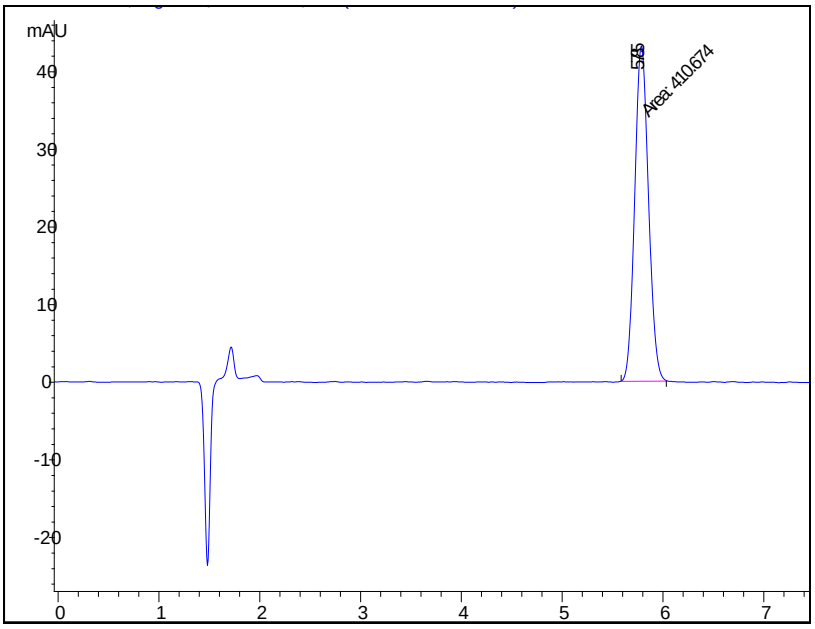
3.1.2 Sıcaklığın Değiştirilmesi



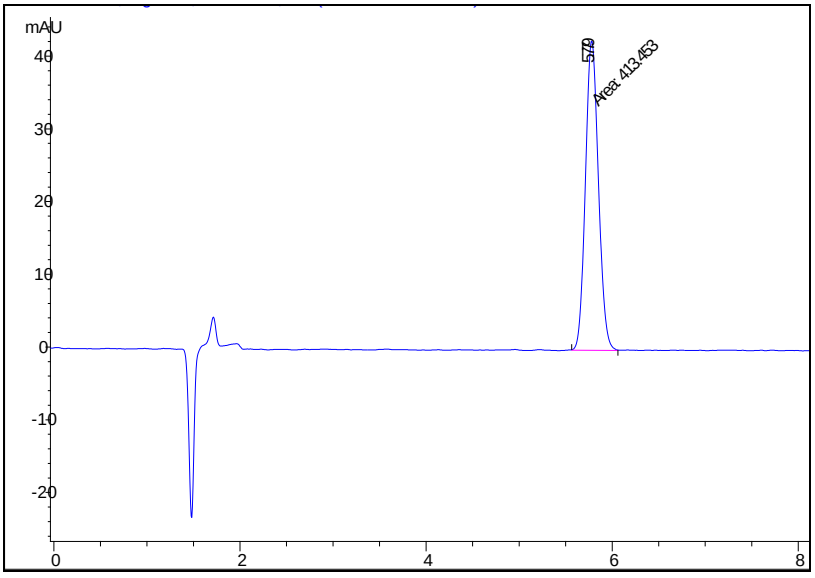
Şekil 3.8 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –2 °C, mobil faz: FM, 1. Paralel - AZ: 5,777



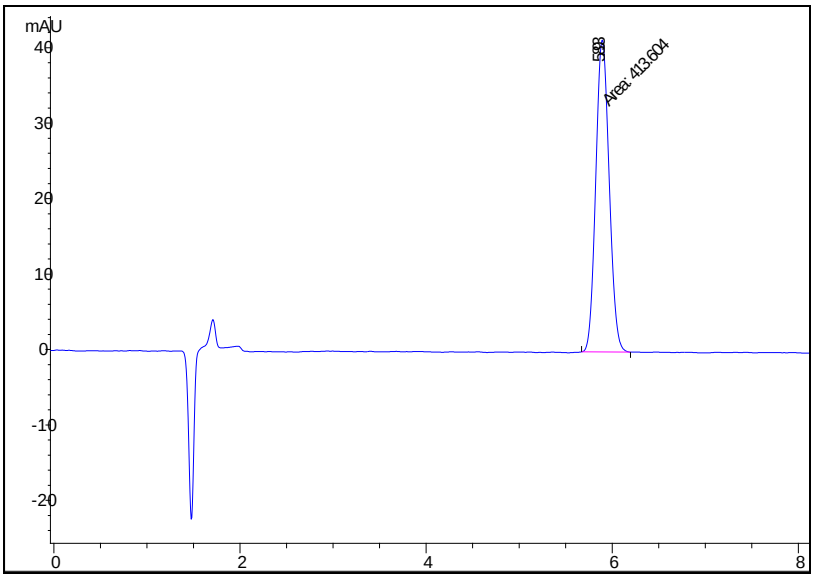
Şekil 3.9 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –2 °C, mobil faz: FM, 2. Paralel - AZ: 5,782



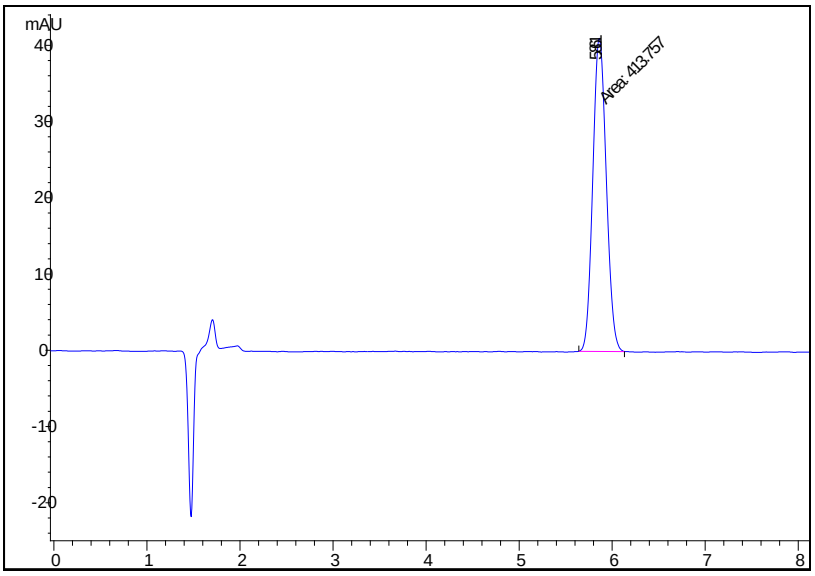
Şekil 3.10 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –2 °C, mobil faz: FM, 3. Paralel – AZ: 5,785



Şekil 3.11 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM –1 °C, mobil faz: FM - AZ: 5,779

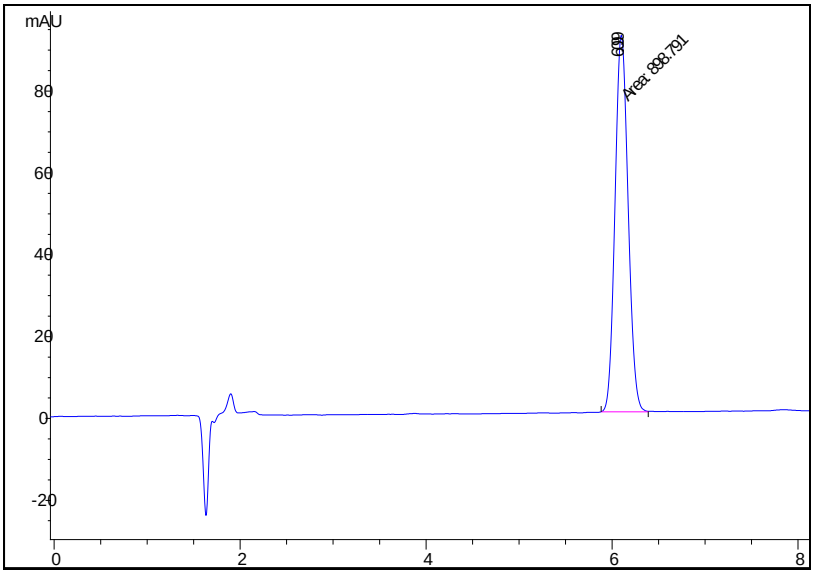


Şekil 3.12 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM +1 °C, mobil faz: FM - AZ: 5,893

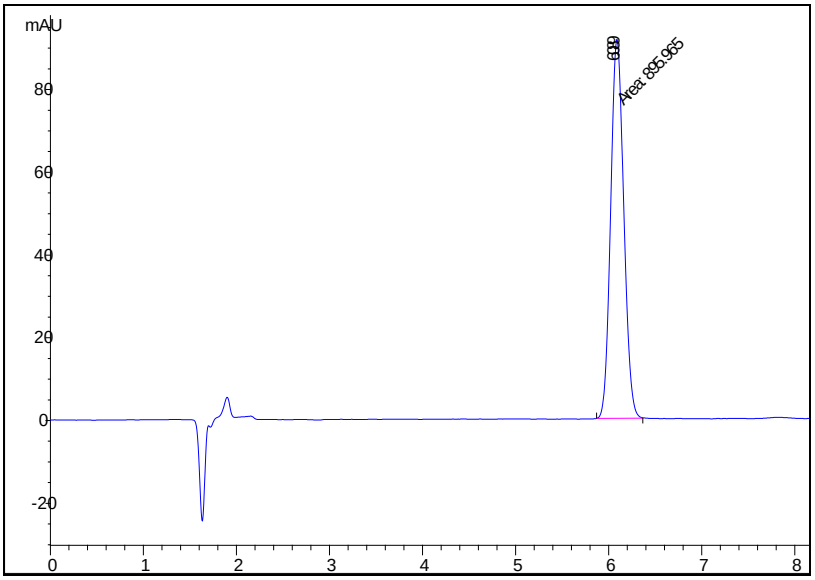


Şekil 3.13 Akış hızı: FM, kolon sıcaklığı: FM +2 °C, mobil faz: FM - AZ: 5,861

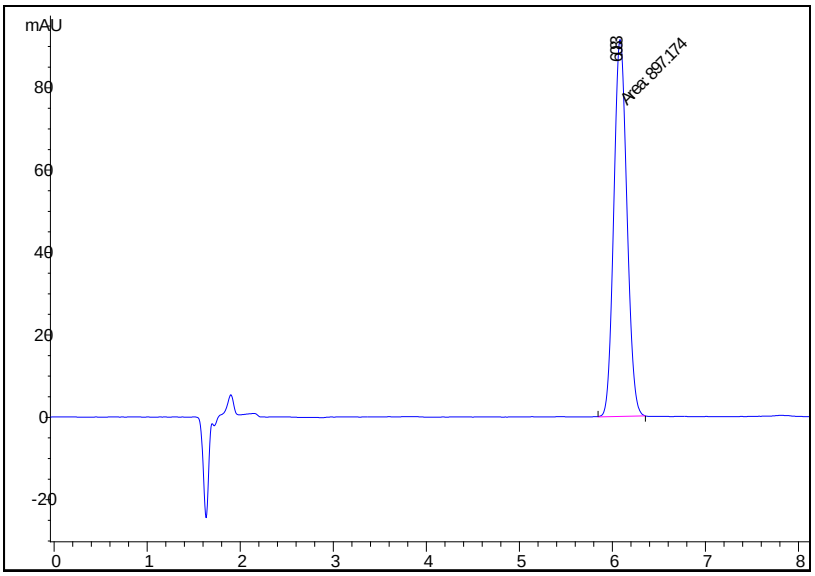
3.1.3 Akış Hızının Değiştirilmesi



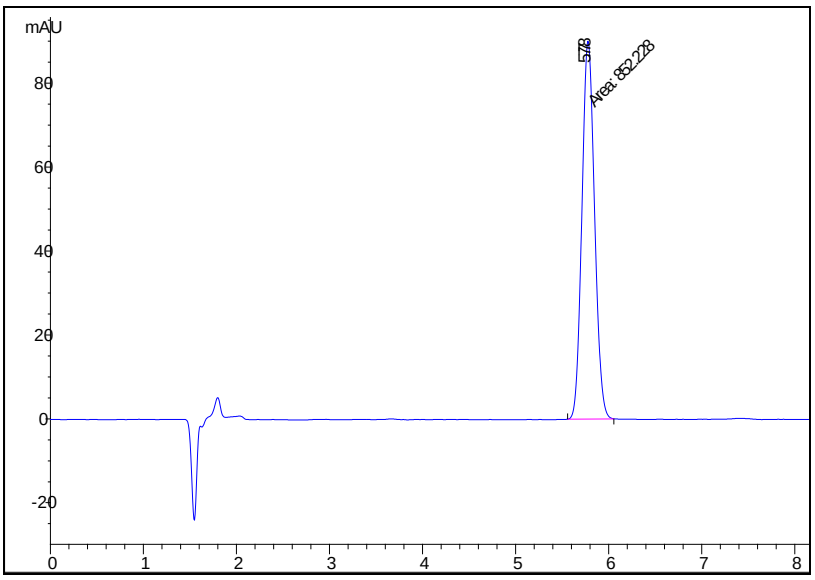
Şekil 3.14 Akış hızı: FM –0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM, 1. Paralel - AZ: 6,099



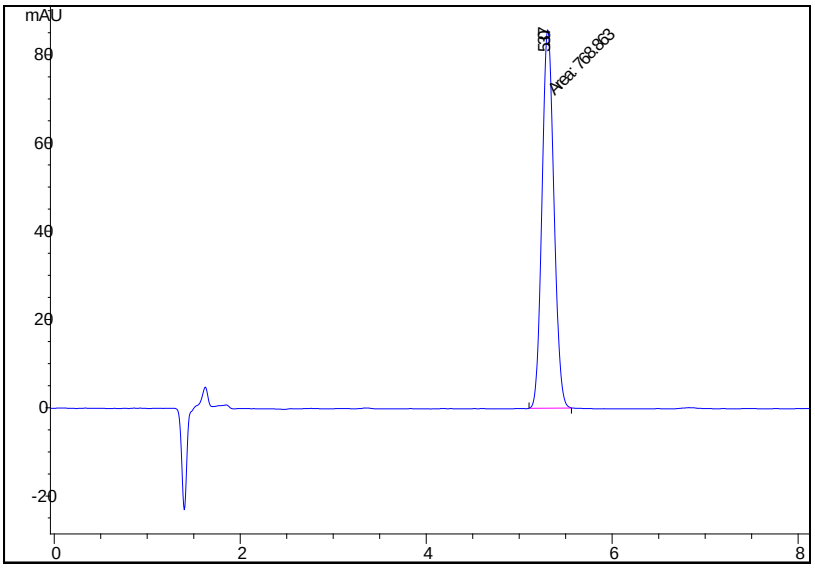
Şekil 3.15 Akış hızı: FM –0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM, 2. Paralel - AZ: 6,089



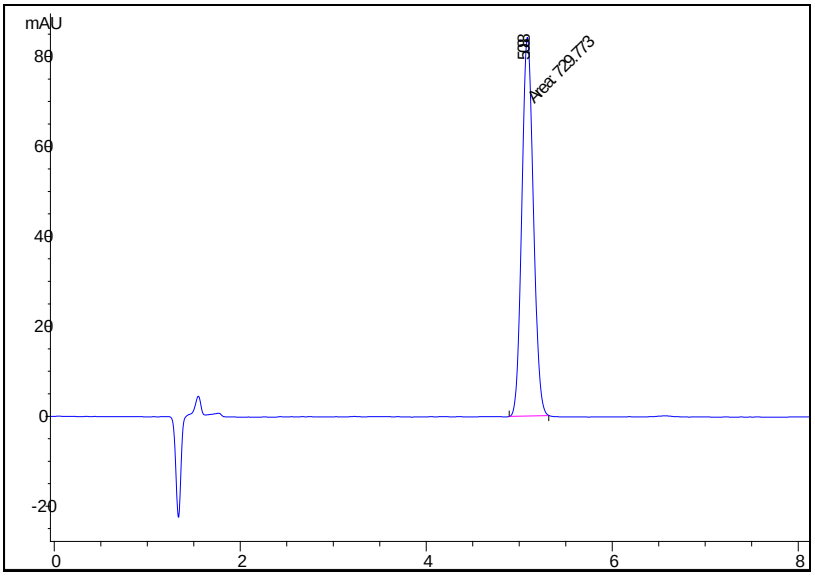
Şekil 3.16 Akış hızı: FM –0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM, 3. Paralel - AZ: 6,083



Şekil 3.17 Akış hızı: FM –0,1 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM - AZ: 5,778



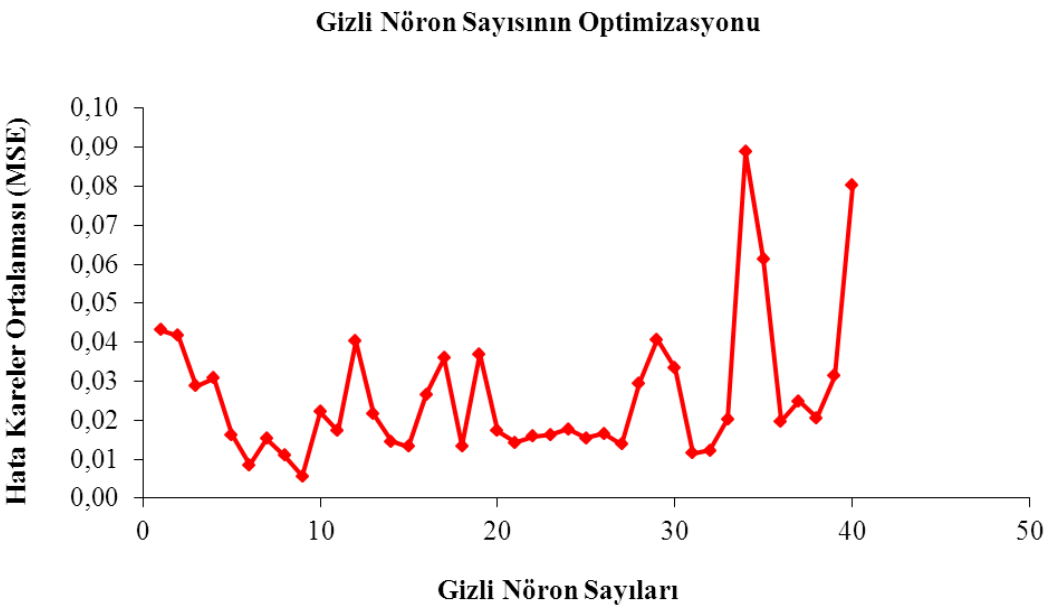
Şekil 3.18 Akış hızı: FM +0,1 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM - AZ: 5,307



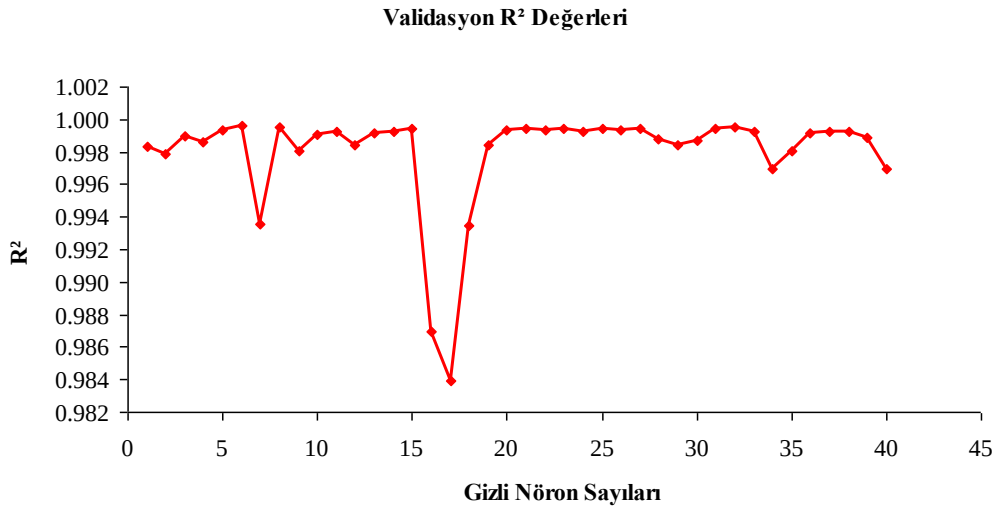
Şekil 3.19 Akış hızı: FM +0,2 mL/dk, kolon sıcaklığı: FM, mobil faz: FM - AZ: 5,088

3.2 *nftool* Fonksiyonu ile YSA Optimizasyonu Sırasında Optimum Nöron Sayısının Bulunması

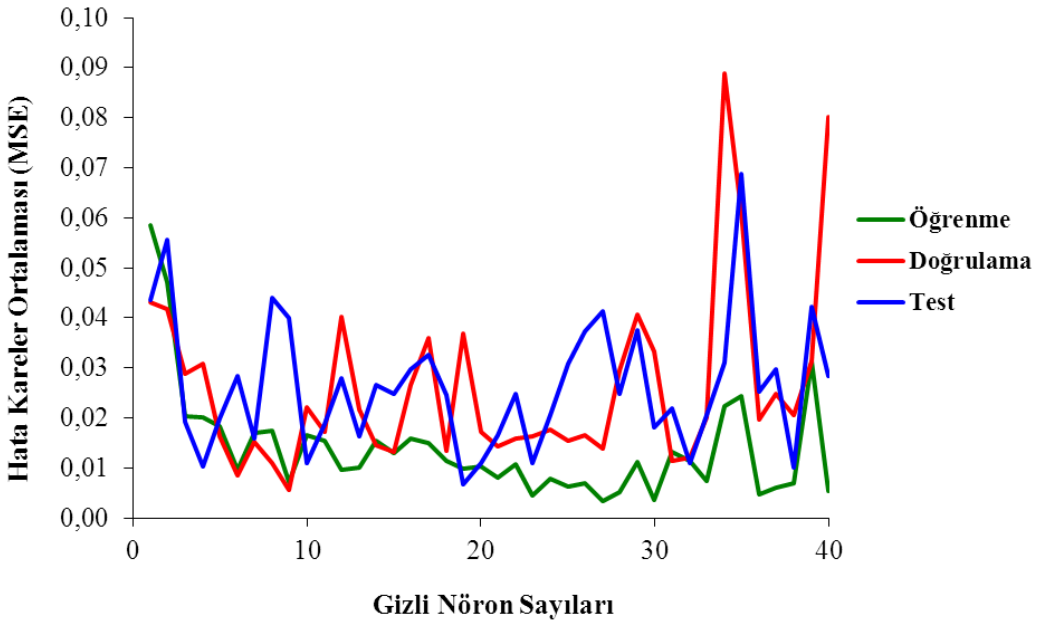
Optimum nöron sayısının tespiti için Test, Öğrenme ve Doğrulama örneklem oranlarının 50–25–25 olduğu durumda R^2 ve MSE değerleri tespit edildi (Şekil 3.21-Şekil 3.23). Bunun için 1'den 40'a kadar gizli nöron sayısı Levenberg-Marquardt algoritması kullanılarak çalışıldı. Tüm değerler Tablo 3.1'de belirtilmiştir. Doğrulama verilerinin MSE değerine (0,0056854) bakıldığında optimum nöron sayısı 9 olarak bulunmuştur (Şekil 3.20).



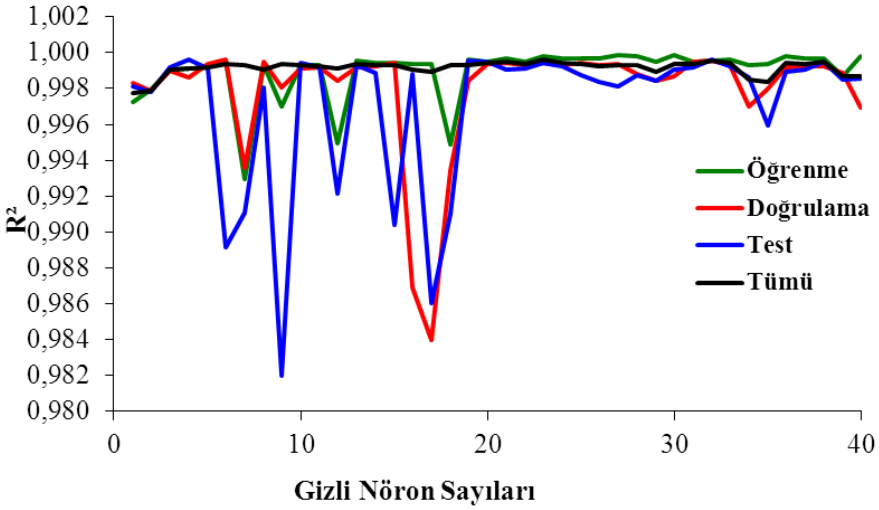
Şekil 3.20 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile doğrulama MSE değerlerinin değişimi



Şekil 3.21 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile doğrulama R^2 değerlerinin değişimi



Şekil 3.22 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile öğrenme, doğrulama ve test MSE değerlerinin değişimi



Şekil 3.23 Gizli nöron sayısının değiştirilmesi ile öğrenme, doğrulama, test ve tümüne ilişkin R^2 değerlerinin değişimi

Tablo 3.1 Gizli nöron sayısının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri

	R^2				Hata Kareler Ortalaması (MSE)				En iyi	
Gizli Nöron Sayısı	Öğrenme	Doğrulama	Test	Tümü	Öğrenme	Doğrulama	Test	Döngü Sayıları	MSE	Döngü
1	0,997256	0,998288	0,998131	0,997760	0,0584607	0,0431164	0,0436340	227	0,043116	221
2	0,997950	0,997861	0,997815	0,997900	0,0471500	0,0417395	0,0555614	164	0,041740	158
3	0,999047	0,998963	0,999186	0,999030	0,0204162	0,0287834	0,0192245	16	0,028783	10
4	0,999117	0,998627	0,999623	0,999110	0,0201127	0,0308118	0,0103606	14	0,030818	8
5	0,999174	0,999364	0,999122	0,999200	0,0183548	0,0163177	0,0198579	19	0,016318	13
6	0,999557	0,999601	0,989140	0,999390	0,0095665	0,0085583	0,0283163	65	0,008558	59
7	0,992940	0,993600	0,991090	0,999280	0,0170416	0,0152606	0,0159199	32	0,015261	26
8	0,999292	0,999506	0,998076	0,999030	0,0174582	0,0109513	0,0440016	23	0,010951	17
9	0,996990	0,998040	0,981960	0,999350	0,0070721	0,0056854	0,0398778	58	0,005685	52
10	0,999314	0,999101	0,999441	0,999280	0,0164632	0,0221762	0,0110213	22	0,022176	16
11	0,999330	0,999210	0,999200	0,999260	0,0153979	0,0172440	0,0188609	56	0,017244	50
12	0,994930	0,998420	0,992130	0,999100	0,0095832	0,0402680	0,0279272	13	0,040268	7
13	0,999527	0,999166	0,999292	0,999360	0,0100653	0,0216350	0,0163289	40	0,021635	34
14	0,999454	0,999250	0,998890	0,999280	0,0154072	0,0145044	0,0265983	16	0,014504	10
15	0,999409	0,999444	0,990400	0,999310	0,0129794	0,0132026	0,0249055	14	0,013203	8
16	0,999380	0,986910	0,998788	0,999050	0,0158615	0,0266599	0,0296938	10	0,026660	4
17	0,999349	0,983950	0,986050	0,998920	0,0148814	0,0359724	0,0326294	15	0,035972	9
18	0,994850	0,993430	0,991010	0,999330	0,0114891	0,0133959	0,0245192	17	0,013396	11

Tablo 3.1 Gizli nöron sayısının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri (devamı)

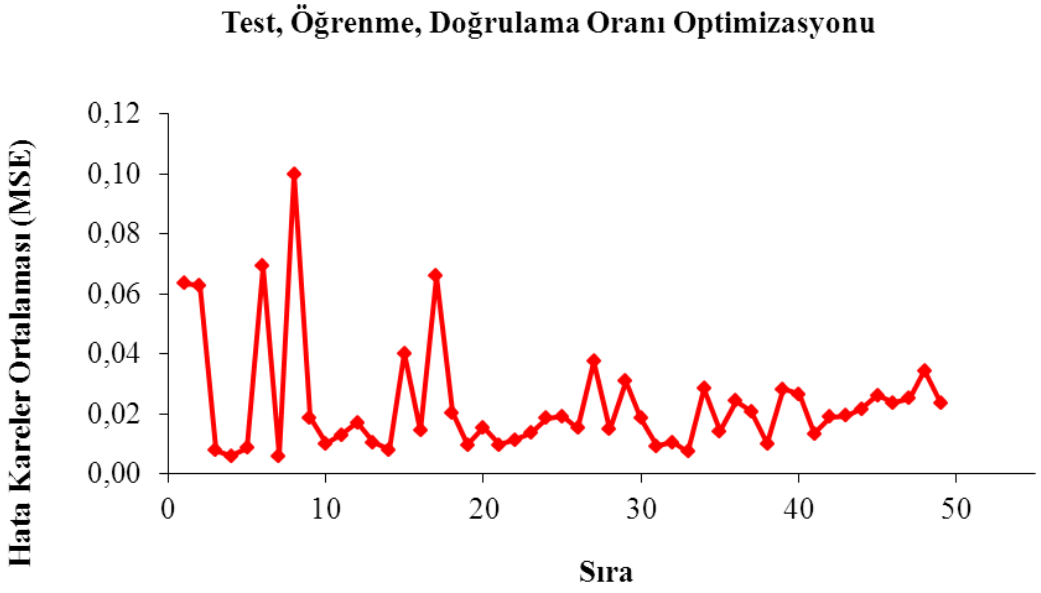
	R^2				Hata Kareler Ortalaması (MSE)				En iyi	
Gizli Nöron Sayısı	Öğrenme	Doğrulama	Test	Tümü	Öğrenme	Doğrulama	Test	Döngü Sayıları	MSE	Döngü
19	0,999639	0,998448	0,999572	0,999310	0,0097452	0,0369222	0,0067325	12	0,036922	6
20	0,999475	0,999366	0,999508	0,999460	0,0102101	0,0172881	0,0109298	17	0,017288	11
21	0,999675	0,999404	0,999081	0,999480	0,0079928	0,0142988	0,0165739	24	0,014299	18
22	0,999517	0,999299	0,999092	0,999340	0,0106642	0,0158888	0,0248576	12	0,015889	6
23	0,999802	0,999423	0,999458	0,999610	0,0043926	0,0162449	0,0110059	30	0,016245	24
24	0,999650	0,999287	0,999220	0,999440	0,0078902	0,0176334	0,0206151	19	0,017633	13
25	0,999707	0,999424	0,998742	0,999360	0,0061812	0,0153648	0,0308621	11	0,015365	5
26	0,999695	0,999335	0,998367	0,999270	0,0070599	0,0164958	0,0372145	14	0,016496	8
27	0,999857	0,999388	0,998107	0,999320	0,0033986	0,0138838	0,0413938	14	0,013884	8
28	0,999791	0,998792	0,998751	0,999300	0,0050886	0,0294805	0,0248992	14	0,029481	8
29	0,999507	0,998420	0,998420	0,998920	0,0112334	0,0406844	0,0374829	10	0,040684	4
30	0,999847	0,998693	0,999080	0,999360	0,0035114	0,0332970	0,0181599	15	0,033297	9
31	0,999478	0,999463	0,999197	0,999390	0,0132216	0,0114953	0,0218053	14	0,011495	8
32	0,999535	0,999530	0,999589	0,999540	0,0114251	0,0121916	0,0109335	12	0,012192	6
33	0,999637	0,999286	0,999218	0,999410	0,0074766	0,0202203	0,0205073	11	0,020220	5
34	0,999320	0,996974	0,998589	0,998510	0,0224560	0,0888571	0,0310861	13	0,088857	7
35	0,999366	0,998018	0,995958	0,998340	0,0242869	0,0612467	0,0688703	11	0,061247	5
36	0,999791	0,999162	0,998905	0,999410	0,0047489	0,0196554	0,0252463	11	0,019655	5

Tablo 3.1 Gizli nöron sayısının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri (devamı)

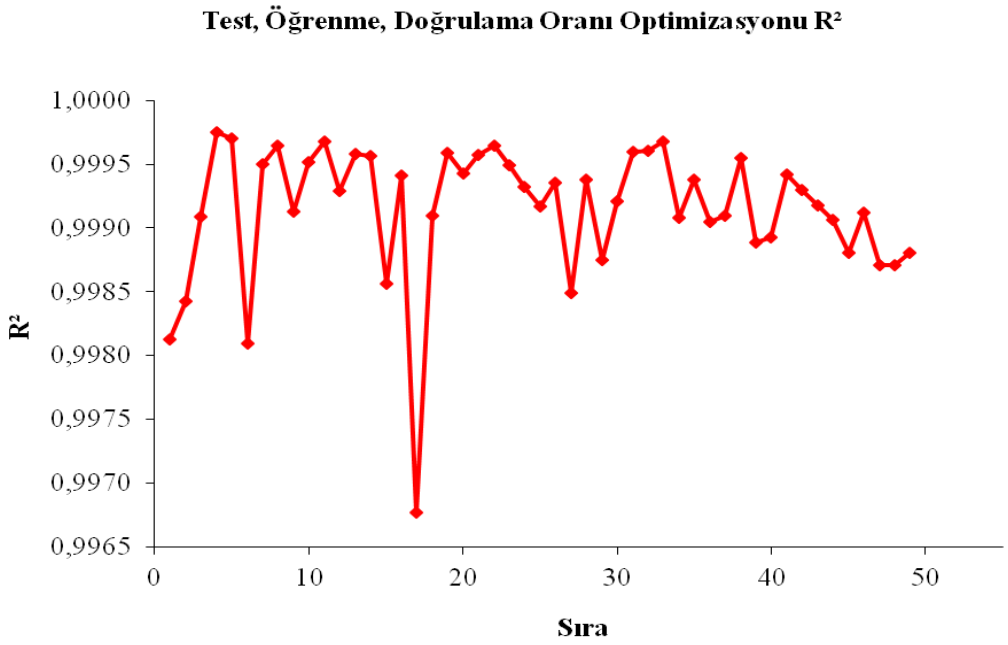
	R^2				Hata Kareler Ortalaması (MSE)				En iyi	
Gizli Nöron Sayısı	Öğrenme	Doğrulama	Test	Tümü	Öğrenme	Doğrulama	Test	Döngü Sayıları	MSE	Döngü
37	0,999700	0,999236	0,999079	0,999360	0,0060543	0,0248279	0,0297975	11	0,024828	5
38	0,999697	0,999217	0,999512	0,999520	0,0070466	0,0205349	0,0101052	14	0,020535	8
39	0,998710	0,998884	0,998509	0,998690	0,0311722	0,0313818	0,0422716	10	0,031382	4
40	0,999815	0,996915	0,998547	0,998710	0,0054072	0,0801561	0,0283882	9	0,080156	6

3.3 *nftool* Fonksiyonu ile YSA Optimizasyonu Sırasında Optimum Test, Öğrenme ve Doğrulama Oranlarının Bulunması

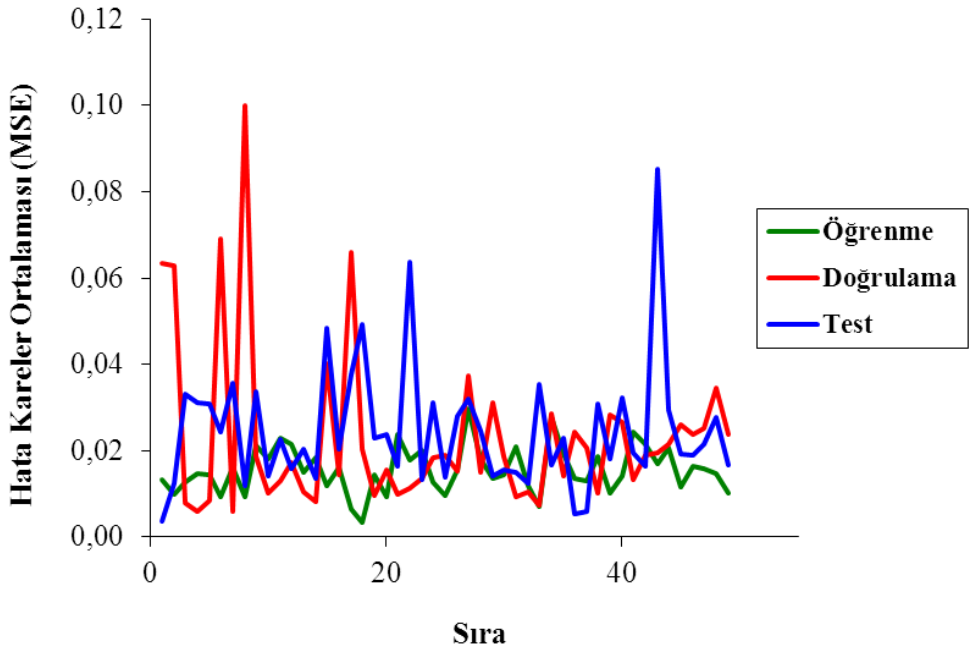
Optimum Test, Öğrenme ve Doğrulama oranı tespiti için optimum nöron sayısı olan 9 kullanılarak R^2 ve MSE değerleri tespit edildi (Şekil 3.25-Şekil 3.27). Tüm değerler Tablo 3.2'de belirtilmiştir. Levenberg-Marquardt algoritması kullanılarak çalışıldı. Doğrulama verilerinin MSE değerine bakıldığında (0,0059123) optimum oranın 60-5-35 (öğrenme-doğrulama-test) olduğu bulunmuştur (Şekil 3.24).



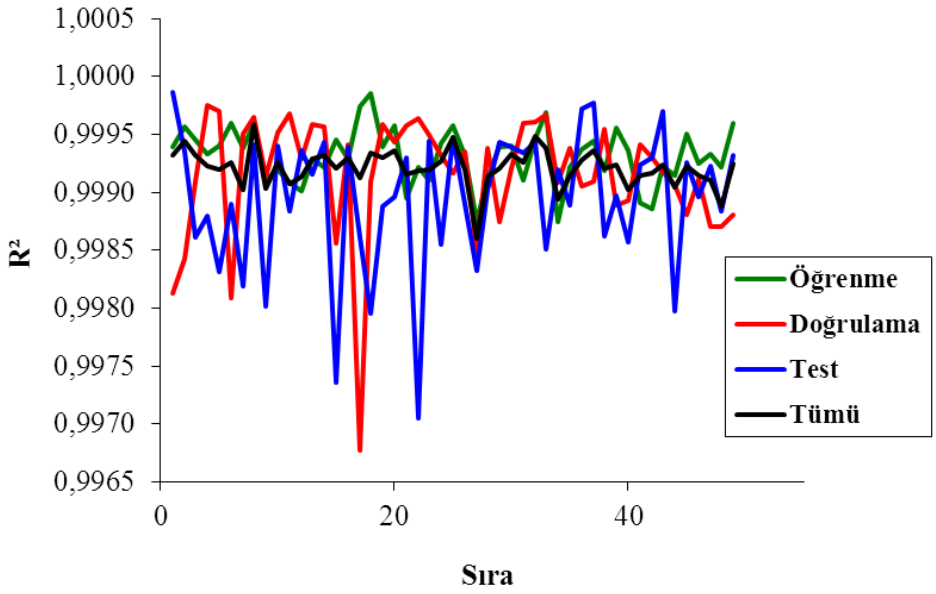
Şekil 3.24 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen doğrulama MSE değerleri



Şekil 3.25 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen doğrulama R^2 değerleri



Şekil 3.26 Test, Öğrenme ve Doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen MSE değerleri



Şekil 3.27 Test, Öğrenme ve Doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen R^2 değerleri

Tablo 3.2 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri

		R^2				Hata Kareler Ortalaması (MSE)				En İyi	
	Öğrenme, Doğrulama, Test	Öğrenme	Doğrulama	Test	Tümü	Öğrenme	Doğrulama	Test	Döngü Sayıları	MSE	Döngü
1	90-5-5	0,999394	0,998127	0,999867	0,99932	0,0133320	0,0634391	0,0035477	18	0,063439	12
2	85-5-10	0,999568	0,998423	0,999356	0,99944	0,0098726	0,0629425	0,0124976	27	0,062943	21
3	80-5-15	0,999459	0,999091	0,998610	0,99932	0,0128179	0,0078351	0,0332126	16	0,007835	10
4	75-5-20	0,999327	0,999753	0,998800	0,99923	0,0146362	0,0059144	0,0312107	18	0,005914	12
5	70-5-25	0,999404	0,999701	0,998317	0,99920	0,0143206	0,0085018	0,0309090	17	0,008502	11
6	65-5-30	0,999597	0,998092	0,998900	0,99926	0,0093807	0,0692070	0,0244021	16	0,069207	10
7	60-5-35	0,999384	0,999501	0,998190	0,99902	0,0160018	0,0059123	0,0356178	19	0,005912	13
8	85-10-5	0,999598	0,999647	0,999410	0,99959	0,0091511	0,0999942	0,0118502	119	0,009994	113
9	80-10-10	0,999105	0,999132	0,998020	0,99903	0,0210862	0,0187345	0,0336502	20	0,018735	14
10	75-10-15	0,999201	0,999513	0,999407	0,99926	0,0182013	0,0100794	0,0141296	21	0,010079	15
11	70-10-20	0,999081	0,999681	0,998835	0,99907	0,0228801	0,0129209	0,0224699	40	0,012921	34
12	65-10-25	0,999013	0,999291	0,999364	0,99914	0,0215522	0,0171316	0,0156622	14	0,017320	8
13	60-10-30	0,999289	0,999585	0,999160	0,99929	0,0150530	0,0104814	0,0204549	51	0,010481	45
14	55-10-35	0,999218	0,999563	0,999432	0,99932	0,0182972	0,0080305	0,0136388	14	0,008031	8
15	80-15-5	0,999458	0,998562	0,997354	0,99921	0,0119611	0,0402003	0,0484220	28	0,040200	22
16	75-15-10	0,999287	0,999409	0,999390	0,99930	0,0161303	0,0143497	0,0202874	49	0,014350	43
17	70-15-15	0,999743	0,996768	0,998615	0,99913	0,0065604	0,0659853	0,0375213	26	0,065985	20
18	65-15-20	0,999854	0,999098	0,997950	0,99934	0,0033316	0,0203586	0,0493614	38	0,020359	32

Tablo 3.2 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri (devamı)

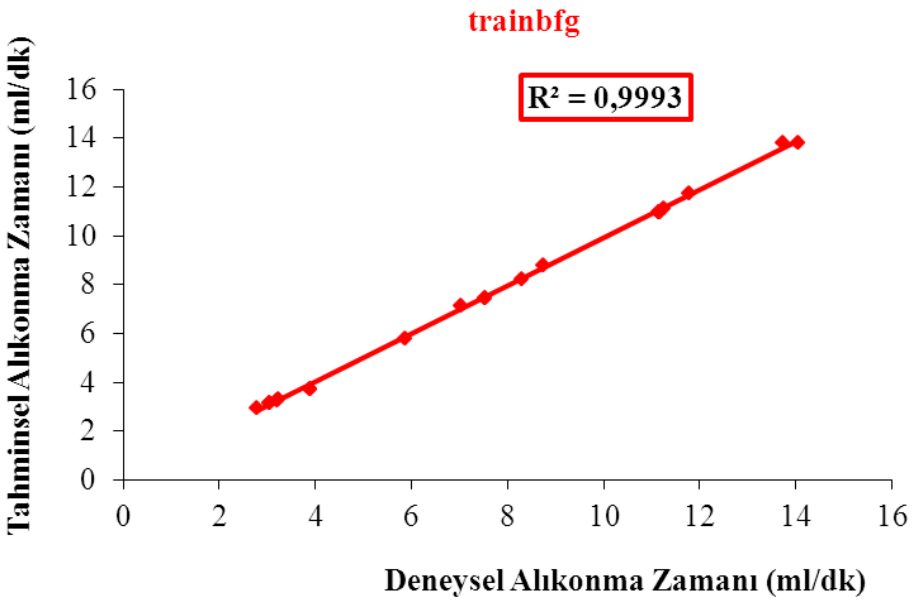
		R^2				Hata Kareler Ortalaması (MSE)				En İyi	
	Öğrenme, Doğrulama, Test	Öğrenme	Doğrulama	Test	Tümü	Öğrenme	Doğrulama	Test	Döngü Sayıları	MSE	Döngü
19	60-15-25	0,999393	0,999593	0,998881	0,99930	0,0143789	0,0096933	0,0229624	19	0,009693	13
20	55-15-30	0,999578	0,999431	0,998964	0,99936	0,0091960	0,0154946	0,0235971	31	0,015495	25
21	50-15-35	0,998954	0,999575	0,999297	0,99916	0,0238594	0,0097185	0,0164809	12	0,009719	6
22	75-20-5	0,999217	0,999643	0,997044	0,99919	0,0176915	0,0112883	0,0635639	22	0,011288	16
23	70-20-10	0,999104	0,999493	0,999448	0,99920	0,0201590	0,0134536	0,0133002	24	0,013454	18
24	65-20-15	0,999422	0,999320	0,998553	0,99927	0,0125782	0,0184391	0,0312224	60	0,018439	54
25	60-20-20	0,999583	0,999167	0,999478	0,99947	0,0094302	0,0190545	0,0137611	82	0,019055	76
26	55-20-25	0,999322	0,999355	0,998900	0,99920	0,0154683	0,0151829	0,0279112	23	0,015183	17
27	50-20-30	0,998745	0,998486	0,998325	0,99860	0,0296066	0,0374235	0,0320573	12	0,037424	6
28	45-20-35	0,999139	0,999380	0,999019	0,99914	0,0180070	0,0148805	0,0245207	27	0,014881	21
29	70-25-5	0,999392	0,998747	0,999438	0,99921	0,0136631	0,0309632	0,0140334	15	0,030963	9
30	65-25-10	0,999405	0,999205	0,999394	0,99933	0,0143141	0,0184925	0,0154813	50	0,018493	44
31	60-25-15	0,999103	0,999597	0,999341	0,99926	0,0208037	0,0091695	0,0148888	65	0,009170	59
32	55-25-20	0,999462	0,999606	0,999431	0,99949	0,0119098	0,0103855	0,0124936	51	0,010386	45
33	50-25-25	0,999694	0,999675	0,998512	0,99938	0,0069445	0,0072995	0,0353262	44	0,007300	38
34	45-25-30	0,998742	0,999080	0,999195	0,99894	0,0277669	0,0284404	0,0166227	22	0,028440	16
35	40-25-35	0,999220	0,999381	0,998885	0,99915	0,0191048	0,0141201	0,0228936	15	0,014120	9
36	65-30-5	0,999368	0,999049	0,999722	0,99928	0,0135912	0,0242445	0,0053069	34	0,024245	28

Tablo 3.2 Test, öğrenme ve doğrulama oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen MSE ve R^2 değerleri (devamı)

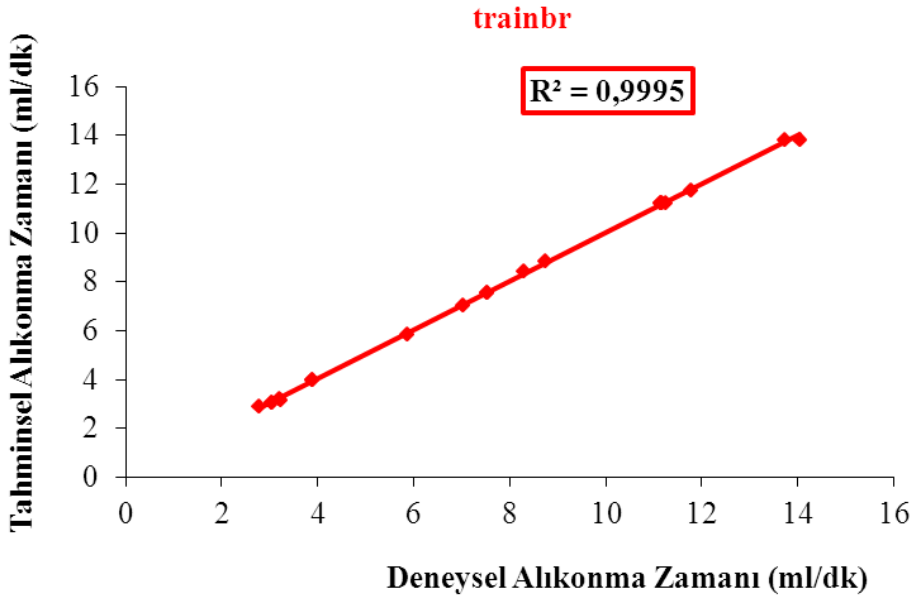
		R^2				Hata Kareler Ortalaması (MSE)				En İyi	
	Öğrenme, Doğrulama, Test	Öğrenme	Doğrulama	Test	Tümü	Öğrenme	Doğrulama	Test	Döngü Sayıları	MSE	Döngü
37	60-30-10	0,999449	0,999097	0,999778	0,99936	0,0130436	0,0207149	0,0058188	23	0,020715	17
38	55-30-15	0,999188	0,999545	0,998625	0,99921	0,0187181	0,0100137	0,0308362	15	0,010014	9
39	50-30-20	0,999553	0,998886	0,998968	0,99924	0,0101378	0,0281600	0,0181869	45	0,028160	39
40	45-30-25	0,999362	0,998926	0,998568	0,99902	0,0140919	0,0265145	0,0322959	19	0,026515	13
41	40-30-30	0,998907	0,999418	0,999243	0,99915	0,0243966	0,0132863	0,0195340	16	0,013286	10
42	35-30-35	0,998860	0,999300	0,999301	0,99917	0,0213559	0,0189254	0,0162384	15	0,018925	9
43	60-35-5	0,999228	0,999173	0,999697	0,99924	0,0169247	0,0193973	0,0853571	28	0,019397	22
44	55-35-10	0,999146	0,999062	0,997975	0,99904	0,0206203	0,0216030	0,0294049	15	0,021603	9
45	50-35-15	0,999509	0,998803	0,999257	0,99923	0,0115357	0,0260802	0,0192879	19	0,026080	13
46	45-35-20	0,999254	0,999119	0,998965	0,99915	0,0162849	0,0236812	0,0187807	12	0,023681	6
47	40-35-25	0,999331	0,998707	0,999233	0,99911	0,0157957	0,0250932	0,0213698	24	0,025093	18
48	35-35-30	0,999213	0,998708	0,998833	0,99888	0,0146434	0,0343679	0,0276080	20	0,034368	14
49	30-35-35	0,999602	0,998804	0,999316	0,99925	0,0100240	0,0237319	0,0165706	31	0,023732	25

3.4 *nntool* Fonksiyonu ile Örnek Verilerin Farklı Algoritmalarla Testine İlişkin Grafikler

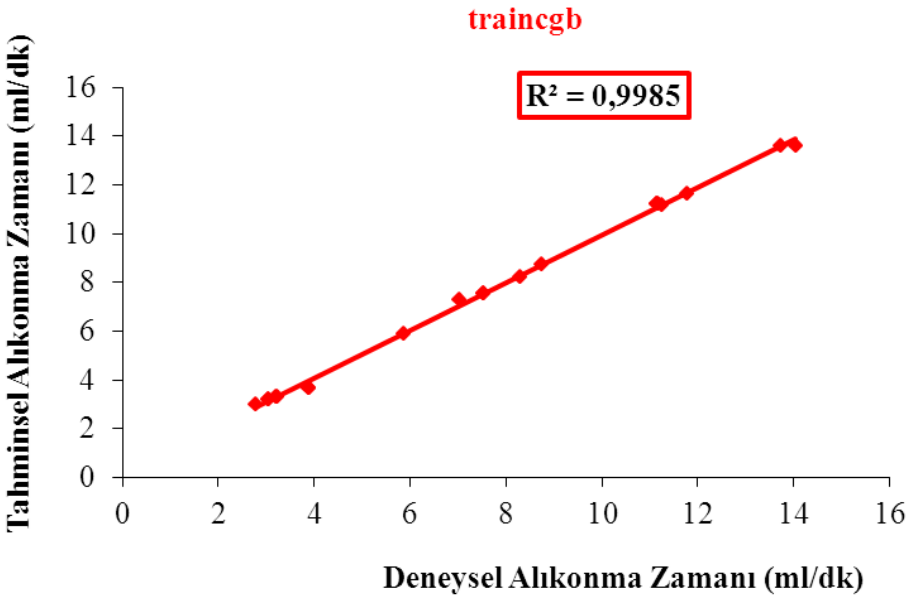
Tablo 3.3'te belirtilen R^2 değerlerine bakıldığında deneysel sonuçlara en yakın tahmini verilerin alındığı algoritmaların Levenberg-Marquardt (trainlm) ve Scaled Conjugate Gradient Backpropagation (trainscg) olduğu görülmüştür. R^2 değerleri sırasıyla 0,9996 ve 0,9997 olarak bulunmuştur (Şekil 3.28-Şekil 3.41).



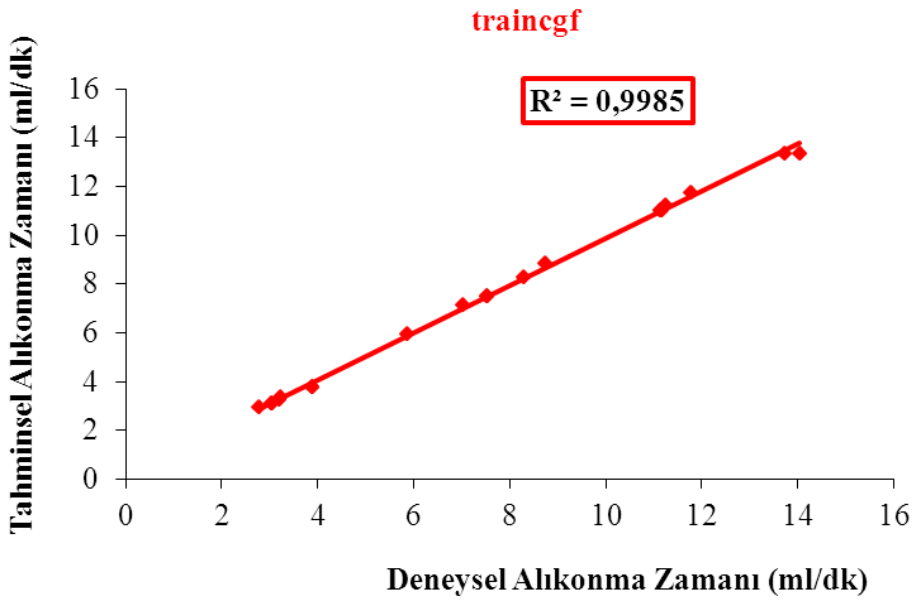
Şekil 3.28 Trainbfg (BFGS Quasi-Newton Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



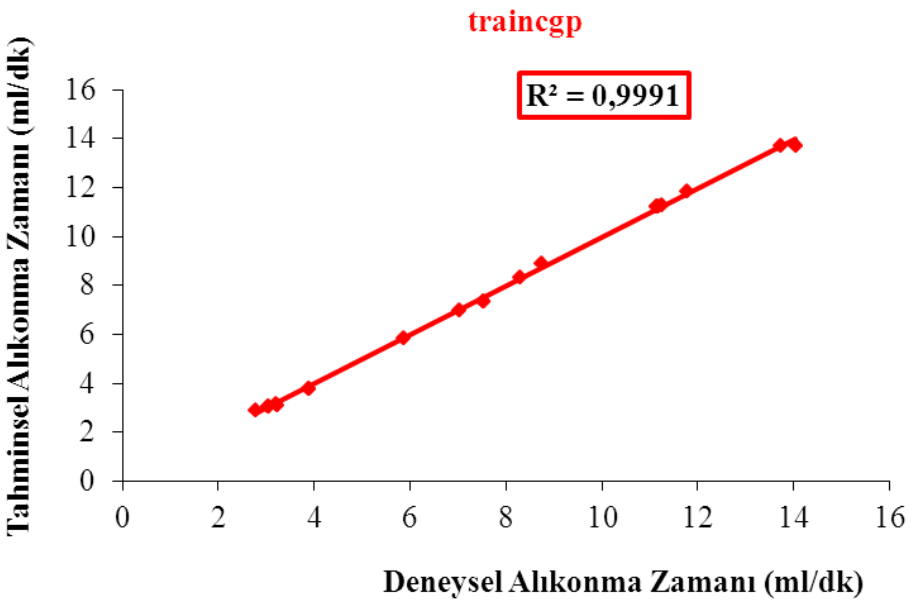
Şekil 3.29 Trainbr (Bayesian Regulation Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



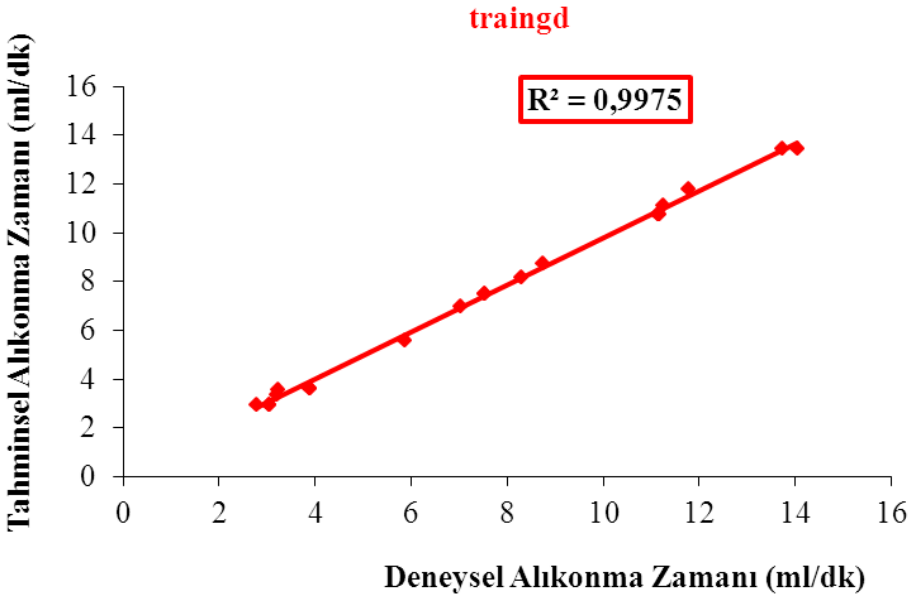
Şekil 3.30 Traincgb (Conjugate Gradient with Powell/Beale Restarts Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



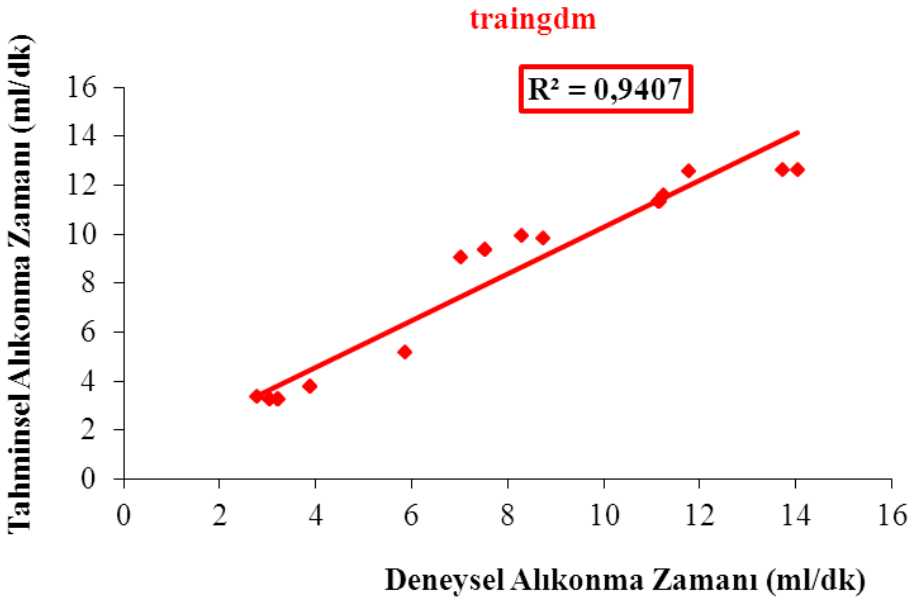
Şekil 3.31 Traincgf (Fletcher-Powell Conjugate Gradient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



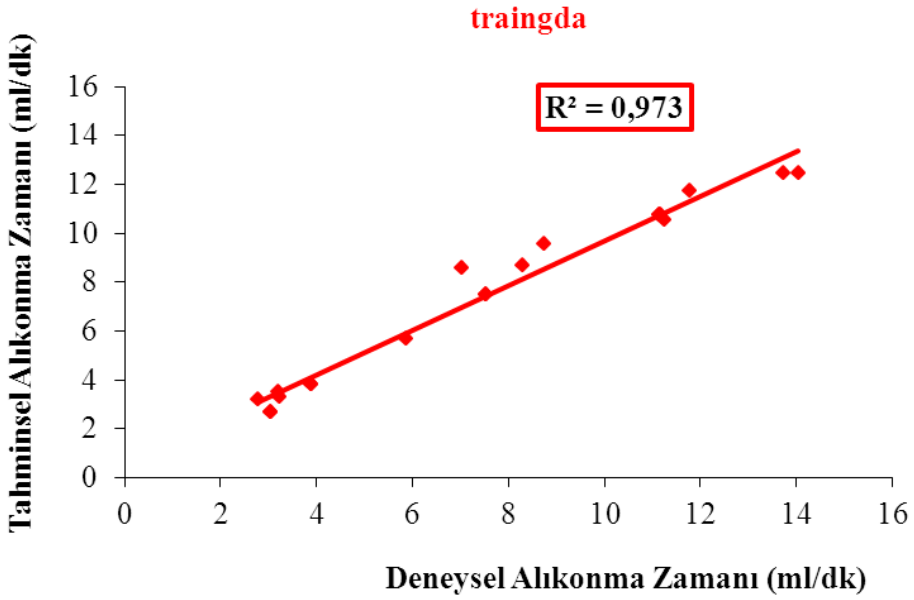
Şekil 3.32 Traincgp (Polak-Ribiére Conjugate Gradient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



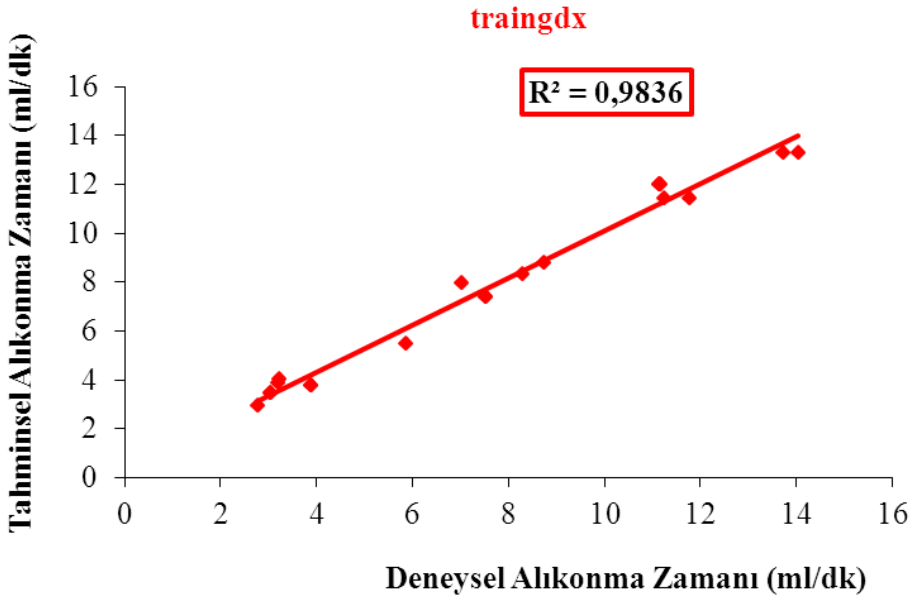
Şekil 3.33 Traingd (Gradient Descent Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



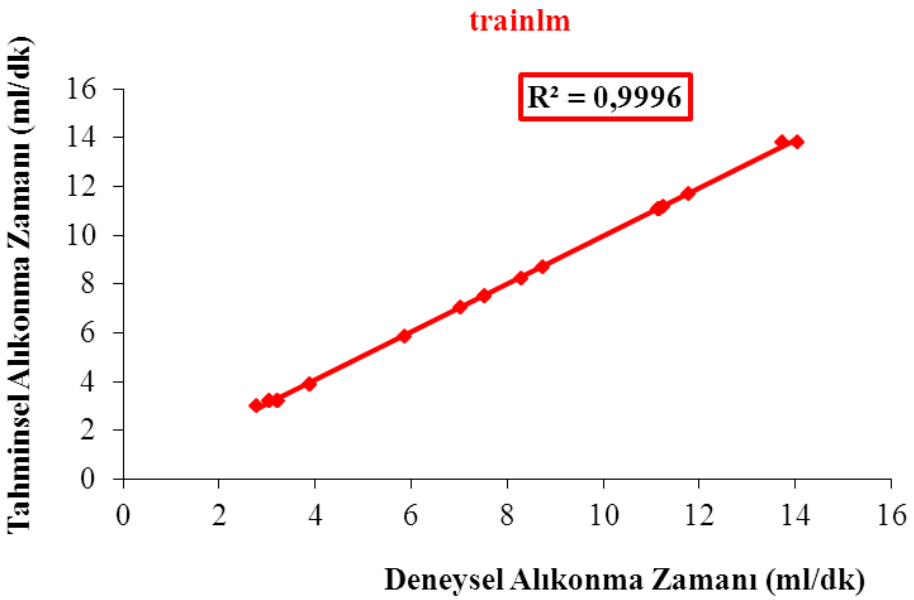
Şekil 3.34 Traingdm (Gradient descent with momentum Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



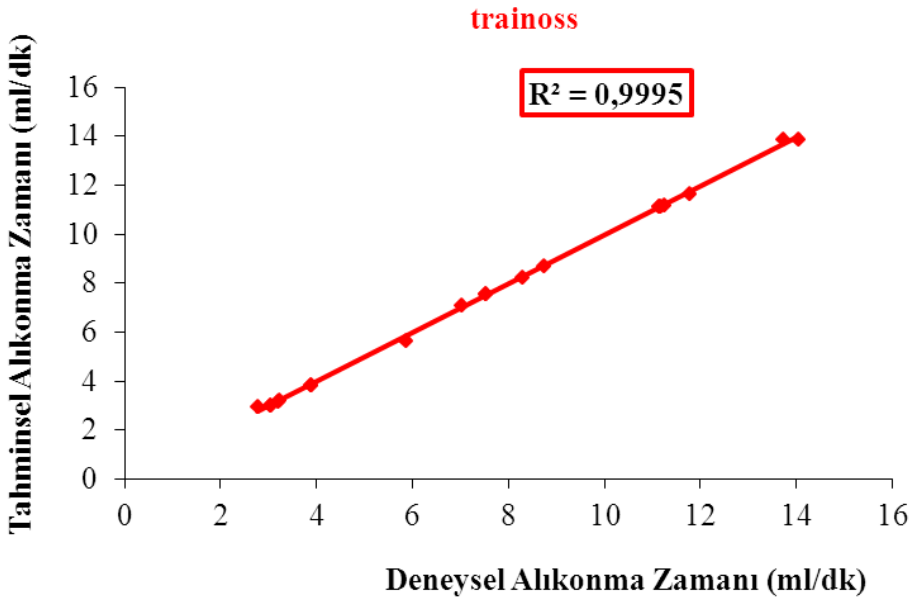
Şekil 3.35 Traingda (Gradient Descent with Adaptive Learning Rate Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



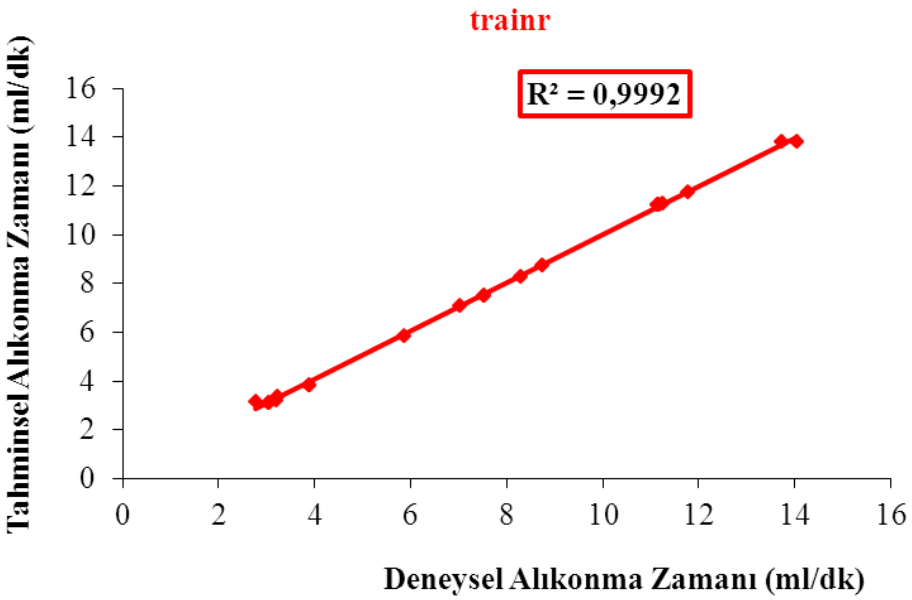
Şekil 3.36 Traingdx (Gradient Descent with Momentum and Adaptive Learning Rate Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



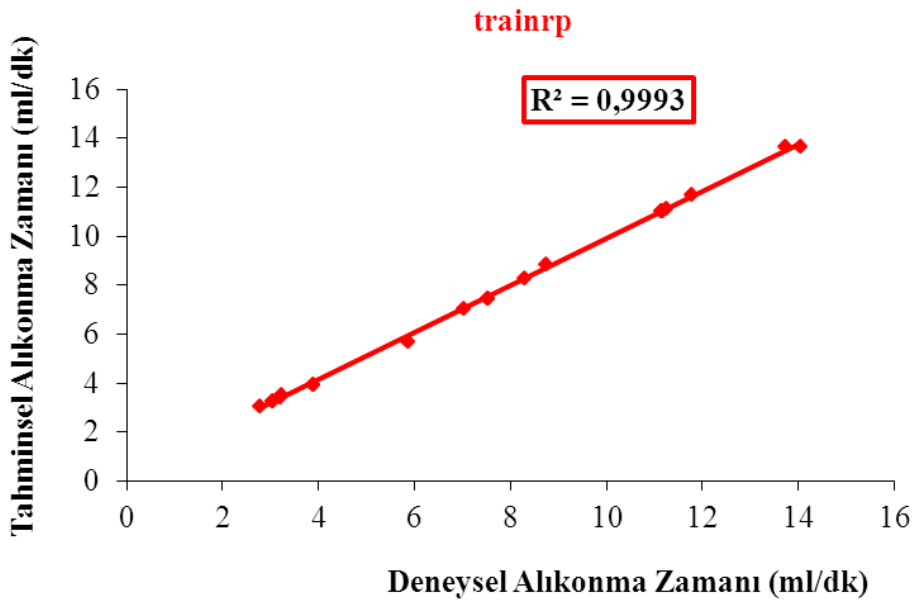
Şekil 3.37 Trainlm (Levenberg-Marquardt Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



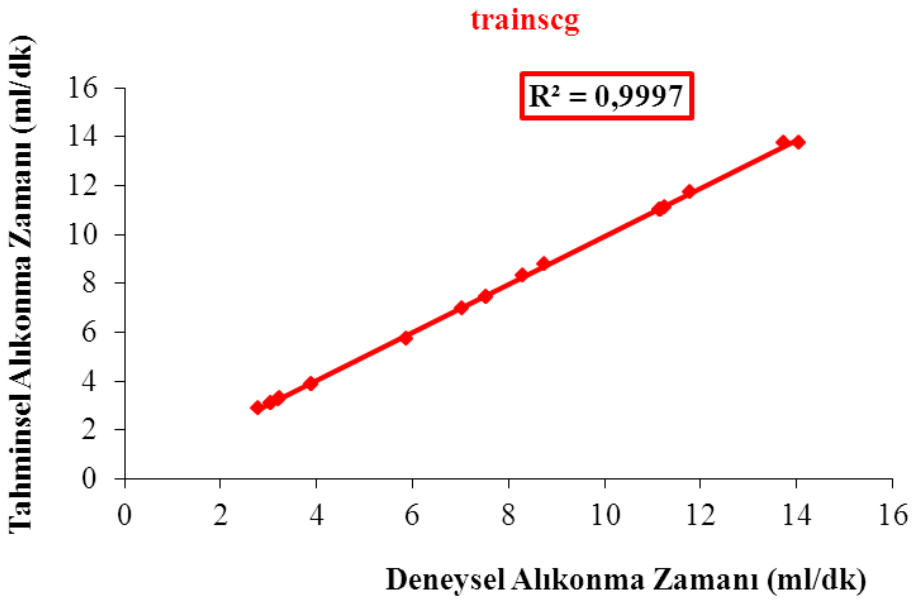
Şekil 3.38 Trainoss (One Step Secant Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



Şekil 3.39 Trainr (Random Order Incremental Training with Learning Functions) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



Şekil 3.40 Trainrp (Resilient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik



Şekil 3.41 Trainscg (Scaled Conjugate Gradient Backpropagation) algoritması kullanarak elde edilen tahmini değerlere ilişkin grafik

Tablo 3.3 Farklı algoritmalar kullanarak örnek giriş verileri için elde edilen tahmini alıkonma zamanları

	Alıkonma Zamanları (dakika)							
		YSA Algoritmaları						
Sıra	Deneysel	trainbfg	trainbr	traincgb	traincgf	traincgp	traingd	traingdm
1	3,219	3,285	3,126	3,323	3,358	3,091	3,566	3,249
2	2,779	2,920	2,873	3,015	2,950	2,894	2,954	3,370
3	3,206	3,239	3,219	3,290	3,263	3,145	3,333	3,246
4	3,050	3,154	3,039	3,215	3,108	3,034	2,924	3,231
5	3,051	3,154	3,039	3,215	3,108	3,034	2,924	3,231
6	3,884	3,724	3,972	3,674	3,772	3,781	3,607	3,769
7	3,883	3,724	3,972	3,674	3,772	3,781	3,607	3,769
8	7,523	7,423	7,562	7,551	7,489	7,332	7,487	9,382
9	7,522	7,423	7,562	7,551	7,489	7,332	7,487	9,382
10	5,861	5,779	5,841	5,908	5,930	5,831	5,593	5,171
11	7,040	7,152	7,049	7,312	7,109	6,970	6,976	9,031
12	13,735	13,810	13,780	13,587	13,339	13,680	13,463	12,599
13	14,042	13,810	13,780	13,587	13,339	13,680	13,463	12,599
14	8,750	8,780	8,848	8,749	8,855	8,871	8,728	9,823
15	8,300	8,240	8,409	8,214	8,262	8,345	8,181	9,921
16	11,775	11,716	11,748	11,638	11,747	11,822	11,794	12,552
17	11,246	11,098	11,204	11,175	11,239	11,247	11,097	11,562
18	11,155	10,986	11,241	11,197	11,016	11,195	10,732	11,327
19	11,159	10,986	11,241	11,197	11,016	11,195	10,732	11,327
20	11,157	10,986	11,241	11,197	11,016	11,195	10,732	11,327

Tablo 3.3 Farklı algoritmalar kullanarak örnek giriş verileri için elde edilen tahmini alıkonma zamanları (devamı)

	Alıkonma Zamanları (dakika)							
		YSA Algoritmaları						
Sıra	Deneysel	traingda	traingdx	trainlm	trainoss	trainr	trainrp	trainscg
1	3,219	3,317	4,007	3,225	3,218	3,333	3,524	3,285
2	2,779	3,224	2,951	2,993	2,959	3,177	3,062	2,877
3	3,206	3,509	3,891	3,205	3,152	3,198	3,430	3,252
4	3,050	2,667	3,458	3,211	3,019	3,101	3,269	3,119
5	3,051	2,667	3,458	3,211	3,019	3,101	3,269	3,119
6	3,884	3,803	3,759	3,852	3,834	3,848	3,931	3,885
7	3,883	3,803	3,759	3,852	3,834	3,848	3,931	3,885
8	7,523	7,506	7,369	7,482	7,524	7,510	7,449	7,463
9	7,522	7,506	7,369	7,482	7,524	7,510	7,449	7,463
10	5,861	5,707	5,479	5,858	5,656	5,847	5,709	5,762
11	7,040	8,558	7,941	7,042	7,103	7,091	7,012	6,991
12	13,735	12,438	13,306	13,805	13,870	13,802	13,654	13,766
13	14,042	12,438	13,306	13,805	13,870	13,802	13,654	13,766
14	8,750	9,567	8,782	8,690	8,706	8,726	8,837	8,767
15	8,300	8,675	8,319	8,205	8,237	8,256	8,293	8,304
16	11,775	11,750	11,408	11,707	11,659	11,729	11,674	11,734
17	11,246	10,546	11,443	11,149	11,144	11,248	11,122	11,140
18	11,155	10,766	11,971	11,080	11,100	11,236	10,994	10,997
19	11,159	10,766	11,971	11,080	11,100	11,236	10,994	10,997
20	11,157	10,766	11,971	11,080	11,100	11,236	10,994	10,997

3.5 Duyarlılık Testlerine İlişkin Veriler

Tablo 3.4'teki doğrulama MSE değerleri incelendiğinde alıkonma zamanına en çok etki eden iki parametrenin mobil faz ve akış hızı olduğu görülmektedir. p1+p3+p4 ve p2+p3 için doğrulama MSE değerlerinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. Mobil faz bileşen-1, akış hızı ve sıcaklığın ayrıca mobil faz bileşen-2 ve akış hızının ortak etkilerinin en fazla olduğu görülmektedir. Düşük MSE değerleri incelendiğinde p3'ün – yani akış hızının – bulunduğunun görülmesi; alıkonma zamanında akış hızının etkisinin fazla olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.4 Duyarlılık testlerine ilişkin MSE ve R^2 değerleri (p_1=mobil faz bileşen-1, p_2=mobil faz bileşen-2, p_3=akış hızı, $p4$=sıcaklık)

	R^2				Hata Kareler Ortalaması (MSE)				En İyi	
	Öğrenme	Doğrulama	Test	Tümü	Öğrenme	Doğrulama	Test	Döngü Sayıları	MSE	Döngü
p1	0,990	0,989	0,987	0,989	0,232	0,256	0,285	3	0,256	2
p2	0,988	0,991	0,990	0,989	0,279	0,332	0,195	4	0,332	2
p3	0,151	0,179	0,118	0,141	11,186	11,500	10,946	3	11,500	3
p4	0,054	0,047	0,039	0,043	11,930	13,315	10,017	4	13,315	1
p1+p2	0,988	0,990	0,990	0,989	0,255	0,334	0,229	4	0,334	4
p1+p3	0,999	0,999	0,998	0,998	0,045	0,019	0,045	10	0,019	4
p1+p4	0,989	0,995	0,988	0,989	0,251	0,110	0,334	13	0,101	7
p1+p2+p3	0,999	0,999	0,999	0,999	0,024	0,023	0,031	18	0,023	12
p1+p2+p4	0,988	0,993	0,989	0,988	0,278	0,141	0,253	10	0,141	4
p1+p3+p4	0,999	0,999	0,999	0,999	0,014	0,010	0,021	16	0,010	10
p2+p3	0,999	1,000	0,998	0,999	0,016	0,011	0,050	22	0,010	16
p2+p4	0,989	0,993	0,987	0,988	0,237	0,184	0,338	16	0,184	10
p3+p4	0,072	0,150	0,105	0,088	11,244	16,328	11,534	7	16,329	1
p2+p3+p4	0,999	0,999	0,999	0,999	0,022	0,016	0,019	15	0,016	9
p1+p2+p3+p4	0,999	0,999	1,000	0,999	0,020	0,017	0,010	39	0,017	33

BÖLÜM DÖRT
TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Diğer antihistaminikler ve analjeziklerle beraber kullanılan; ağrı kesici, ağrı hafifletici, öksürük bloke edici özelliklere sahip olan kodeinin; farmakolojik ve toksikolojik özellikleri nedeniyle biyolojik örneklerde tespiti önemlidir (M. Bhandari, A. Bhandari ve A. Bhandari, 2011; Liu, Woo, Holmes ve Koh, 2000; Pereira ve diğer, 2014). Ağrı kesici etkisini nörotransmitter madde salınımını engelleyerek gerçekleştirir (Jordan ve Devi, 1998). Bu özellikleri nedeniyle kodeinin hızlı ve duyarlı tespitini sağlayacak etkili analiz metotları oluşturulmuştur. Mevcut yöntemler arasında Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi oldukça hassas bir metot olmasında rağmen karmaşık yapısı ve pahalı oluşunun yanı sıra türevlendirmedeki dezavantajı nedeniyle yaygın kullanım alanı bulamamaktadır (Pascual ve Sanagustin, 1998). Analizlerin hassas olması yanında pratik ve ekonomik olması da oldukça önemlidir. Kodeinin doğal floresan özelliği, floresan detektöre sahip HPLC ile analizinin yapılabilmesine, 254 nm'deki absorbansı da UV dedektörle teşhisine olanak sağlamaktadır (Freiermuth ve Plase, 1996; Pascual ve Sanagustin, 1999). HPLC analizinden daha pratik ve ekonomik yöntemler de mevcuttur. Ancak bu yöntemlerle hassas ölçümler yapabilmek mümkün değildir.

Yapay zeka ürünü olan YSA beynin bazı durumlarda izlediği yollardaki tecrübeleri taklit ederek tahmine dayalı analizler yapabilmeye olanak tanır (Agatonovic-Kustrin ve Beresford, 2000; Marengo, Gennaro ve Angelino, 1998; Zupan, 1994). YSA bu tahmini sonuçları güdümlü öğrenme modeli ile yani giriş verileri ile çıkış verilerinin sisteme tanıtılmasının ardından nöronlar arası bağlantı kuvvetini matematiksel büyüklüklerle ayarlayarak verir (Agatonovic-Kustrin, Demir ve diğer, 2012, Zecevic ve Zivanovic, 1999; Jan ve diğer, 1999).

Sınıflandırma, modelleme, ilişkilendirme ve haritalandırma gibi birçok alanda kullanılan YSA hızlı ve etkili sonuç verir. Esnek ve oldukça güçlü bir matematiksel tahmin aracı oluşu nedeniyle ilaç endüstrisinden askeri alana kadar birçok yerde kullanılmaktadır. Sharp, Avon, American Express, Texaco gibi şirketler YSA'nı

kullanmaktadır. Aminoasit sekansları, ECG ve EEG dalgalarının sınıflandırılması, petrol rafineri proses kontrolü, petrol aramaları gibi sayısız kullanım alanı mevcuttur (Marengo, Gennaro ve Angelino, 1998; Zupan, 1994; Widrow, Rumelhart ve Lehr, 1994).

Laboratuvar analizlerinde hızlı zamanda hassas ölçümler almanın yanında kimyasal sarfiyatının da düşük olması hedeflenir. Kimyasal sarfiyatı maddi anlamda ciddi boyutta yük oluşturmaktadır. Hassas ölçüm alınabilecek cihazlar zaten oldukça pahalı iken kimyasallara da bu denli yüksek fiyatlar ödenmesi araştırmaların maliyetini artırmaktadır. Bu noktada matematiksel araçların kullanılması araştırmalara ışık tutmakta, varılacak noktaya hangi yollardan gidilebileceğini belirlemekte etkili olmaktadır.

Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde kodeinin alıkonma zamanının mobil faz kompozisyonuna ve mobil fazın akış hızına bağlı olduğu görülmektedir. Sıcaklığın alıkonma zamanı üzerinde genelleştirilebilecek bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Kodeinden önce kolonu terk eden molekülü de içeren çalışmalarda piklerin birbirine girişim yapması olasılığı nedeniyle yüksek akış hızı ve maksimum mobil faz konsantrasyonu ile çalışmak riskli olabilir.

YSA Kromatografik yapı-alıkonma endeksi arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için kullanılmıştır (Fatemi, 2002; Gao ve diğer, 2003). Biz çalışmamızda kodeinin HPLC tayininde sıcaklık, akış hızı ve mobil faz parametrelerini değiştirerek elde ettiğimiz alıkonma zamanlarını kullanarak kurduğumuz YSA modeli ile oldukça doğru tahmini veriler aldığımızı gördük. Özellikle Levenberg-Marquardt ve Scaled Conjugate Gradient Backpropagation ile 0,9997 R^2 değerine sahip doğruluğa kadar etkili sonuçlar aldık. Kurduğumuz modelle hangi akış hızı, mobil faz kompozisyonu ve sıcaklığa sahip şartlarda hangi alıkonma zamanında kodeini elde edeceğimizi duyarlı bir şekilde tespit ettik.

YSA modelinin optimizasyonu için Levenberg-Marquardt algoritması ile çalışıldı ve nöron sayısının 30'dan yüksek olduğu durumlarda MSE'nin arttığı tespit edildi. 6-

9 nöron sayısı aralığı en düşük MSE'ye sahip olan, çalışılması en uygun olan nöron sayı aralığıdır. 9 nöron sayısı ile en düşük MSE değeri olan 0,0056854 elde edilmiştir. Performans testleri incelendiğinde alıkonma zamanını belirleyen en etkili parametrelerin mobil faz ile akış hızı olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

Acevedo-Martinez, J., Escalona-Arranz, J.C.,Villar-Rojas, A., Tellez-Palmero, F., Perez-Roses, R., Gonzalez, L. ve diğer. (2006). Quantitiative study of the structure-retention time relationship in the imine family. *Journal of Chromatography A, 1102*, 238-244.

Agatonovic-Kustrin, S. ve Beresford, R. (2000). Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 22*, 717-727.

Agatonovic-Kustrin, S., Zecevic, M., Zivanovic, Lj. ve Tucker, I.G. (1998). Application of neural networks for response surface modeling in HPLC optimization. *Analytica Chimica Acta*, *364*, 265-273.

Agatonovic-Kustrin, S., Zecevic, M. ve Zivanovic, Lj. (1999). Use of ANN modeling in structure-retention relationships of diuretics in RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 21*, 95-103.

Aguilar, M.-I. (2004). HPLC of peptides and proteins –*Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, 251*, 9-21.

Al-Hasani, R. ve Bruchas, M.R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependant signaling and behavior. *Anesthesiology, 115* (6), 1363-1381.

Barnett, N.W., Hindson, B.J., Lewis, S.W. ve Purcell, S.D. (1998). Determination of codeine, 6-methoxycodeine and thebaine using capillary electrophoresis with tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium (II) chemiluminescence detection. *Analytical Communications, 35*, 321-324.

Bhandari, M., Bhandari, A. ve Bhandari, A. (2011). Recent updates on codeine. *Pharmaceutical Methods*, *2*, 3-8.

Bos, M., Bos, A. ve van der Linden, W.E. (1990). Processing of signals from an ion-selective electrode array by a neural network. *Analytica Chimica Acta*, *233*, 31-39.

Bruner, B. (2014). *Bob Bruner's chemistry and molecular biology resources*, 17 Şubat 2014, http://bbruner.org/orgbioq/fig/mor_cod.gif.

Cavas, L., Karabay, Z., Alyuruk, H., Dogan, H. ve Demir, G.K. (2011). Thomas and artificial neural network models for the fixed-bed adsorption of methylene blue by a beach waste *Posidonia oceanica* (L.) dead leaves. *Chemical Engineering Journal*, 557-562.

Chen, Y., McCall, T.W., Baichwal, A.R. ve Meyer, M.C. (1999). The application of an artificial neural network and pharmacokinetic simulations in the design of controlled-release dosage forms. *Journal of Controlled Release*, *59*, 33-41.

Codeine, (b.t). 17 Şubat 2014, http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/winder/codeine_2d.gif.

Demir, G.K., Dural, M.U., Alyuruk, H. ve Cavas, L. (2012). Artificial neural network model for biosorption of methylene blue by *Posidonia oceanica* (L.) delile dead leaves. *Neural Network World*, *5/12*, 1-16.

Eccles, R. (1996). Codeine, cough and upper respiratory infection. *Pulmonary Pharmacology*, *9*, 293-297.

Fatemi, M.H. (2002). Simultaneous modeling of the Kovats retention indices on OV-1 and SE-54 stationary phases using artificial neural networks. *Journal of Chromatography A*, *955*, 273-280.

Freiermuth, M. ve Plasse, J-C. (1997). Determination of morphine and codeine in plasma by HPLC following solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *15*, 759-764.

Gao, Y., Wang, Y., Yao, X., Zhang, X., Liu, M., Hu, Z. ve diğer. (2003). The prediction study for gas chromatographic retention index of disulfides on stationary phases of different polarity. *Talanta*, *59*, 229-237.

Ghaffari, A., Abdollahi, H., Khoshayand, M.R., Bozchalooi I.S., Dadgar, A. ve Rafiee-Tehrani, M. (2006). Performance comparison of neural network training algorithms in modeling of bimodal drug delivery. *International Journal of Pharmaceuticals*, *126*-138.

Guo, W., Lu, Y. ve Zheng, X.M. (2000). The prediction study for chromatographic retention index of saturated alcohols by MLR and ANN. *Talanta, 51*, 479-488.

Hanaee, J. (1997). Simultaneous determination of acetaminophen and codeine in pharmaceutical preparations by derivative spectrophotometry. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, *72*, 239-241.

Havel, J., Pena, E.M., Rojas-Hernandez, A., Doucet, J.-P. ve Panaye, A. (1998). Neural network for optimization of high-performance capillary zone electrophoresis methods: A new method using a combination of experimental design and artificial neural network. *Journal of Chromatography A, 793*, 317-329.

Jalali-Heravi, M. ve Fatemi, M.H. (2000). Simulation of mass spectra of noncyclic alkanes and alkenes using artificial neural network. *Analytica Chimica Acta*, *415*, 95-103.

Jordan, B. ve Devi, L.A. (1998). Molecular mechanism of opioid receptor signal transduction. *British Journal of Anasthesia*, *81*, 12-19.

Khodadoust, S. (2012). Application of artificial neural network for prediction of retention time for some pesticides in liquid chromatography. *Indian Journal of Science and Technology, 5, (2),* 2001-2008.

Liu, S.Y., Woo, S-O., Holmes, M.J. ve Koh, H-L. (2000). LC and LC-MS-MS analyses of undeclared codeine in antiasthmatic Chinese proprietary medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 22,* 481-486.

Loukas, Y.L. (2000). Artificial neural networks in liquid chromatography: efficient and improved quantitative structure-retention relationship models. *Journal of Chromatography A, 904,* 119-129.

Marengo, E., Gennaro, M.C. ve Angelino, S. (1998). Neural network and experimental design to investigate the effect of five factors in ion-interaction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A, 799,* 47-55.

Marengo, E., Gianotti V., Angioi, S. ve Gennaro, M.C. (2004). Optimization by experimental design and artificial neural networks of the ion-interaction reversed-phase liquid chromatographic seperation of twenty cosmetic preservatives. *Journal of Chromatography A, 1029,* 57-65.

Mert, N., Topcam, G. ve Cavas, L. (2014). RP-HPLC optimization of econea by using artificial neural networks and its antifouling performance on the Turkish coastline. *Progress in Organic Coatings, 77,* 627-635.

Metting, H.J. ve Coenegracht, P.M.J. (1996). Neural Networks in high-performance liquid chromatography optimization: response surface modeling. *Journal of Chromatography A, 728,* 47-53.

Paolino, P. (1990). Codeine. 17 Şubat 2014. http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/codeine.htm.

Pascual, J.A. ve Sanagustin, J. (1999). Fully automated analytical method for codeine quantification in human plasma using on-line solid-phase extraction and hig-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B, 724*, 295-302.

Pereira, P.F., Marra, M.C., Cunha, R.R., da Silva, W.P., Munoz, R.A.A. ve Richter, E.M. (2014). Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *713*, 32-38.

Popa, D-S., Oprean, R., Curea, E. ve Preda, N. (1998). TLC-UV densitometric and GC-MSD methods for simultaneous quantification of morphine and codeine in poppy capsules. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *18*, 645-650.

Raffa, R.B., Netter, F.H. Rawls, S.M. ve Beyzarov, E.P. (2004). *Netter's Illustrated Pharmacology*. 19 Şubat 2014. http://www.netterimages.com/image/11129.htm.

Skoog, D., Holler, F.J. ve Nieman, T. (1998). *Principles of Instrumental Analysis* (5th Edition). Philadelphia: Saunders College Publishing.

Snyder, L.R. ve Kirkland, J.J. (1979). *Introduction to modern liquid chromatography* (2. Baskı). Amerika Birleşik Devletleri.

Taj Pharmaceuticals Limited. (2009). *Codeine base CAS No. : 50-98-6*. (16 Şubat 2104). http://www.tajapi.com/pdf2011/Codeine%20base.pdf.

Takahama, K., Wakuda, I., Fukushima, H., Isohama, Y., Kai, H. ve Miyata, T. (1997). Differential effect of codeine on coughs caused by mechanical stimulation of two different sites in the airway of guinea pigs. *European Journal of Pharmacology*, *329*, 93-97.

Takahara, J., Takayama, K. ve Nagai, T. (1997). Multi-objective simultaneous optimization technique based on an artificial neural network in sustained release formulations. *Journal of Controlled Release, 49,* 11-20.

Tham, S.Y. ve Agatonovic-Kustrin, S. (2002). Application of the artificial neural network in quantitative structure-gradient elution retention relationship of phenylthiocarbamyl amino acids derivatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28,* 581-590.

Tsina, I.W., Fass, M., Debban, J.A. ve Matin, S.B. (1982). Liquid chromatography of codeine in plasma with florescence detection. *Clinical Chemistry, 28/5*, 1137-1139.

Vasiljevic, T., Onjia, A., Cokesa, D. ve Lausevic, M. (2004). Optimization of artificial neural network for retention modeling in high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 785-790.

Volmer, M., Wolthers, B.G., Metting, H.J., de Haan, T.H.Y., Coenegracht, P.M.J. ve van der Slik, W. (1994). Artificial neural network predictions of urinary calculus compositions analyzed with infrared spectroscopy. *Clinical Chemistry, 40/9*, 1692-1697.

Weingarten, B., Wang, H-Y. ve Roberts, D.M. (1995). Determination of codeine in human plasma by high-performance liquid chromatography with florescence detection. *Journal of Chromatography A, 696*, 83-92.

Widrow, B., Rumelhart, D.E. ve Lehr, M.A. (1994). Neural Networks: Application in Industry, Business and Science. *Communications of the Association for Computing Machinery (Acm), 37,* 93-105.

Yaksh, T. (2013). *Opioid analgesics*. 14 Mayıs 2014. http://pharmacology.ucsd.edu/graduate/courseinfo/BIOM255-SP13-yaksh-REVISED - Opiate%20Analgesics%202013-TY.pdf

Yan, A., Jiao, G., Hu, Z. ve Fan, B.T. (2000). Use of artificial neural Networks to predict the gas chromatographic retention index data of alkylbenzenes on carbowax-20M. *Computers & Chemistry*, *24*, 171-179.

Yu, H. ve Wilamowski, B.M. (2010). Levenberg-Marquardt training. *Intelligent Systems*, *12*, 1-15.

Zhao, R.H., Yue, B.F., Ni, J.Y.,Zhou H.F. ve Zhang, Y.K. (1999). Application of an artifical neural network in chromatography – retention behaviour prediction and pattern recognition. *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems*, *45*, 163-170.

Zupan, J. (1994). Introduction of artificial neural network (ANN) methods: What they are and how to use them. *Acta Chimica Slovenica*, 41, (3), 327-352.