



**BOYLU ARDIÇ (JUNIPERUS EXCELSA) MEYVELERİNDEN
SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT EKSTRAKSİYONU İLE İLAÇ ETKEN
MADDELERİNİN ÖZÜTLENMESİ**

Esra Merih HİMMETOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2020

Esra Merih HİMMETOĞLU tarafından hazırlanan “BOYLU ARDIÇ (*JUNIPERUS EXCELSA*) MEYVELERİNDEN SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT EKSTRAKSİYONU İLE İLAÇ ETKEN MADDELERİN ÖZÜTLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Metin GÜRÜ

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Doç. Dr. Fatih AKKURT

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Hacer İÇEN

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 17.02.2020

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esra Merih HİMMETOĞLU

17.02.2020

BOYLU ARDIÇ (*JUNIPERUS EXCELSA*) MEYVELERİNDEN SÜPERKRİTİK
KARBONDİOKSİT EKSTRAKSİYONU İLE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN
ÖZÜTLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Esra Merih HİMMETOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2020

ÖZET

Ardıç (*Juniperus*) bitkisi ihtiva ettiği değerli kimyasallar nedeniyle antik çağlardan beri tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Sayısız çalışmaya konu olan bitkinin idrar söktürücü, iltihap önleyici, mantar önleyici, ağrı kesici, karaciğeri koruyucu, antioksidan, kolesterol azaltıcı, antimikrobiyal, antibakteriyal ve nöron koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Ardıcın sağlığa faydalı bu etkileri içerdiği flavonoid ve fenolik bileşiklerden ileri gelmektedir. Bitkilerin ikincil metabolitleri olarak bilinen yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan bu bileşikler ayrıca antimikrobiyal, antiviral ve antienflamatuar gibi diğer biyolojik işlevler de göstermektedir. Yapılan tez çalışmasının amacı ardıç meyvelerinden çevre dostu süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemiyle kuersetin, kemferol, apigenin, taksifolin, silibinin ilaç etken maddelerinin özütlenmesi ve bu etken maddelerin miktarını maksimize eden optimum çalışma şartlarının araştırılmasıdır. Ekstraksiyon işleminde polar bileşikleri özütleyebilmek için yardımcı çözücü (kosolvent) olarak etanol kullanılmıştır. Optimize edilmek istenen bağımsız parametreler sıcaklık, basınç, özütleme süresi ve karbondioksit akış hızı olarak belirlenmiştir. Deneysel çalışma algoritması belirlenirken yüzey cevap metodu, yüz-merkezli merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen özütlerin içerisindeki ilaç etken maddelerinin kalitatif ve kantitatif analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır. Design Expert 12 programı kullanılarak bağımsız parametrelerin özütleme sürecine etkileri araştırılmış ve özütteki her bir ilaç etken maddesinin miktarını veren matematiksel modeller geliştirilmiştir. Geliştirilen modellerin öngördüğü optimum çalışma şartları ile deneysel sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Optimum çalışma koşullarında yapılan deneyler sonucu kuersetin miktarı 1,777 µg/g, kemferol miktarı 5,143 µg/g, silibinin miktarı 21,017 µg/g, taksifolin miktarı 9,304 µg/g ve apigenin miktarı 1,347 µg/g olarak bulunmuştur.

Bilim Kodu : 91202
Anahtar Kelimeler : Boylu ardıç, Süperkritik karbondioksit, Ekstraksiyon, Kuersetin, Kemferol, Apigenin, Silibinin, Taksifolin, Yüzey cevap metodu
Sayfa Adedi : 98
Danışman : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

EXTRACTION OF PHARMACEUTICAL ACTIVE COMPOUNDS FROM JUNIPERUS
EXCELSA FRUITS BY SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION

(M. Sc. Thesis)

Esra Merih HİMMETOĞLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2020

ABSTRACT

Juniper (*Juniperus*) plant has been used for treatment purposes since ancient times because of the valuable chemicals it has. It is known that this plant, which has been subject to numerous studies, has diuretic, anti-inflammatory, antifungal, analgesic, liver protection, antioxidant, cholesterol-reducing, antimicrobial, antibacterial and neuron protective effects. These beneficial health effects are caused by flavonoid and phenolic compounds contained in juniper. These compounds are known as secondary metabolites of plants with high antioxidant capacity also exhibit other biological functions such as antimicrobial, antiviral and anti-inflammatory. This thesis study aims to extract the pharmaceutical compounds of quercetin, kaempferol, apigenin, taxifolin and silibinin from juniper fruits by eco-friendly supercritical carbon dioxide extraction technique and to investigate the optimum working conditions that maximize the amount of these active substances. Ethanol was used as the co-solvent to extract polar compounds at the extraction process. The independent parameters to be optimized were determined as temperature, pressure, extraction time and carbon dioxide flow rate. To determine the experimental study algorithm face-centered central composite design of response surface methodology was used. Qualitative and quantitative analyses of the pharmaceutical compounds in the extracts were performed by using high performance liquid chromatography (HPLC). The effects of independent parameters on the extraction process were investigated by using the Design Expert 12 program and the mathematical models giving the amount of each active ingredient in the extract were developed. It was found that the optimum working conditions predicted by developed models were compatible with the experimental results. Under the optimum working conditions, experimental results of quercetin, kaempferol, silibinin, taxifolin, and apigenin amounts were respectively as 1.777 µg/g, 5.143 µg/g, 21.017 µg/g, 9.304 µg/g and 1.347 µg/g.

Science Code : 91202

Key Words : Juniperus excelsa, Supercritical carbon dioxide, Extraction, Quercetin, Kaempferol, Apigenin, Silibinin, Taxifolin, Response surface methodology

Page Number : 98

Supervisor : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

TEŞEKKÜR

Engin bilgi birikimi ve akademik bilgisini esirgemeyip çalışmalarına ışık tutan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Metin GÜRÜ'ye, tez çalışmam süresince kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Öğr. Gör. Dr. Levent NURALIN'a, deneysel çalışmalarımın HPLC analizlerinde desteğini esirgemeyen Gamze ÇİFTÇİ'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca anlayılışını esirgemeyip, değerli akademik tecrübelerini benimle paylaşarak yol gösteren TÜBİTAK birim amirim Dr. V. Sinan TANDOĞAN'a ve çalışma arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Bani yüreklendirerek her türlü konuda yardımcı olan değerli Deniz YILMAZ'a ve canım arkadaşım Gözde Güney DOĞAN'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi fedakârlıklarıyla bugünlere gelmemde en büyük payı olan annem Pınar HİMMETOĞLU'na ve babam Tayfun HİMMETOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca özveri ve desteğini esirgemeyip her zaman yanımda olan sevgili kardeşim Özge HİMMETOĞLU'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ardıç (Juniperus ssp.) Bitkisi.....	3
2.2. Flavonoidler.....	7
2.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu.....	13
2.3.1. Süperkritik akışkanlar ve fiziksel özellikleri.....	14
2.3.2. Süperkritik akışkan özütlenmesinin avantaj ve dezavantajları.....	16
2.3.3. Süperkritik akışkanın seçimi ve kosolvent kullanımı.....	16
2.3.4. İşletme parametrelerinin etkileri.....	18
2.4. Yüzey Cevap Metodu.....	21
3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	25
3.1. Ardıç Bitkisi Bileşiklerinin Özütlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	25
3.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ile Yapılan Çalışmalar.....	29
4. MATERYAL VE METOT.....	35

4.1. Kullanılan Kimyasallar.....	35
4.2. Kullanılan Cihazlar.....	36
4.3. Çalışma Parametreleri ve Deneysel Tasarım Yöntemi	40
5. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	43
5.1. Yüzey Cevap Metodu Kullanılarak Yapılan Deney Tasarımı.....	43
5.2. Kuersetin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi.....	45
5.2.1. Sıcaklık ve basıncın özütlenen kuersetin miktarına etkisi.....	48
5.2.2. CO ₂ akış hızının özütlenen kuersetin miktarına etkisi.....	50
5.2.3. Sürenin özütlenen kuersetin miktarına etkisi.....	51
5.3. Kemferol Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi.....	52
5.3.1. Sıcaklık ve CO ₂ akış hızının özütlenen kemferol miktarına etkisi.....	55
5.3.2. Sürenin özütlenen kemferol miktarına etkisi.....	57
5.4. Silibinin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi.....	59
5.4.1. Sıcaklık ve CO ₂ akış hızının özütlenen silibinin miktarına etkisi	62
5.4.2. Basınç ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi	64
5.4.3. CO ₂ akış hızı ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi	65
5.5. Taksifolin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi.....	66
5.5.1. CO ₂ akış hızı ve sıcaklığın özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	69
5.5.2. Basınç ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi	70
5.5.3. CO ₂ akış hızı ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	72
5.5.4. Sıcaklık ve özütleme süresinin özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	72
5.5.5. CO ₂ akış hızı ve basıncın özütlenen taksifolin miktarına etkisi	73

	Sayfa
5.6. Apigenin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi.....	74
5.6.1. Basınç ve sıcaklığın özütlenen apigenin miktarına etkisi.....	78
5.7. Yüzey Cevap Metodu Optimizasyon Sonuçları.....	79
5.8. Deneysel Sonuçların Sokslet Ekstraksiyonu ile Karşılaştırması.....	81
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER.....	83
KAYNAKLAR	87
EKLER.....	93
EK-1. Standartların kalibrasyon eğrileri.....	94
ÖZGEÇMİŞ	98

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Büyük kozalaklı ardıç (<i>Juniperus macrocarpa</i>) bitkisinde bulunan polifenolik bileşikler	5
Çizelge 2.2. Flavonoidlerin ana sınıfları, besin kaynakları, temsili bileşikleri ve sağlığa faydaları.....	8
Çizelge 2.3. Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri.....	15
Çizelge 2.4. Merkezi kompozit tasarımın analitik kimyadaki bazı uygulamaları.....	22
Çizelge 3.1. Süperkritik CO ₂ ekstraksiyonu ile yapılmış diğer çalışmalar.....	33
Çizelge 4.1. Gradient çalışma programı.....	39
Çizelge 5.1. Bağımsız değişkenler ve kodlanmış düzeyleri.....	43
Çizelge 5.2. Yüz-merkezli kompozit tasarım deneysel çalışma algoritması.....	44
Çizelge 5.3. Deneysel çalışma sonucu bulunan kuersetin miktarları.....	45
Çizelge 5.4. Kuersetin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları...	46
Çizelge 5.5. Deneysel çalışma sonucu bulunan kemferol miktarları.....	52
Çizelge 5.6. Kemferol miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları....	53
Çizelge 5.7. Deneysel çalışma sonucu bulunan silibinin miktarları.....	59
Çizelge 5.8. Silibinin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları.....	60
Çizelge 5.9. Deneysel çalışma sonucu bulunan taksifolin miktarları.....	66
Çizelge 5.10. Taksifolin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları..	67
Çizelge 5.11. Deneysel çalışma sonucu bulunan apigenin miktarları.....	75
Çizelge 5.12. Apigenin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları....	76
Çizelge 5.13. Model tarafından belirlenen optimum koşullar ile deneysel sonuçların karşılaştırması.....	80

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Flavonoid sınıfları ve kimyasal yapıları.....	7
Şekil 2.2. Kuersetinin molekül yapısı.....	9
Şekil 2.3. Kemferolün molekül yapısı.....	10
Şekil 2.4. Apigenin molekül yapısı.....	11
Şekil 2.5. Taksifolin molekül yapısı.....	12
Şekil 2.6. Silibinin molekül yapısı.....	13
Şekil 2.7. Saf bir akışkanın P-T faz diyagramında mikroskobik davranışının gösterimi.....	15
Şekil 2.8. Süperkritik ekstraksiyonda kullanılan yardımcı çözümler.....	17
Şekil 2.9. Karbondioksit için basınç-sıcaklık-yoğunluk diyagramı.....	19
Şekil 4.1. Deneysel çalışma aşamaları.....	35
Şekil 4.2. Süperkritik karbondioksit özütlenme prosesinin akış diyagramı.....	38
Şekil 5.1. Kuersetin veriminin yüksek olduğu 19. deneyin HPLC kromatogramı.....	46
Şekil 5.2. Kuersetin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerin ilişkisi.....	47
Şekil 5.3. Sıcaklık ve basıncın özütlenen kuersetin miktarına etkisi.....	49
Şekil 5.4. CO ₂ akış hızının özütlenen kuersetin miktarına etkisi.....	50
Şekil 5.5. Sürenin özütlenen kuersetin miktarına etkisi.....	51
Şekil 5.6. Kemferol veriminin yüksek olduğu 3. deneyin HPLC kromatogramı.....	53
Şekil 5.7. Kemferol miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerin ilişkisi.....	54
Şekil 5.8. Sıcaklık ve CO ₂ akış hızının özütlenen kemferol miktarına etkisi.....	56
Şekil 5.9. CO ₂ akış hızının özütlenen kemferol miktarına etkisi.....	57
Şekil 5.10. Sürenin özütlenen kemferol miktarına etkisi.....	58

Şekil	Sayfa
Şekil 5.11. Silibinin veriminin yüksek olduğu 21. deneyin HPLC kromatogramı.....	60
Şekil 5.12. Silibinin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerin ilişkisi.....	61
Şekil 5.13. Sıcaklık ve CO ₂ akış hızının özütlenen silibinin miktarına etkisi.....	63
Şekil 5.14. Basınç ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi.....	64
Şekil 5.15. CO ₂ akış hızı ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi.....	65
Şekil 5.16. Taksifolin veriminin yüksek olduğu 5. deneyin HPLC kromatogramı.....	67
Şekil 5.17. Taksifolin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerin ilişkisi.....	68
Şekil 5.18. CO ₂ akış hızı ve sıcaklığın özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	70
Şekil 5.19. Basınç ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	71
Şekil 5.20. CO ₂ akış hızı ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	72
Şekil 5.21. Sıcaklık ve özütleme sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	73
Şekil 5.22. CO ₂ akış hızı ve basıncın özütlenen taksifolin miktarına etkisi.....	74
Şekil 5.23. Apigenin veriminin yüksek olduğu 6. deneyin HPLC kromatogramı.....	76
Şekil 5.24. Apigenin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerin ilişkisi.....	77
Şekil 5.25. Basınç ve sıcaklığın özütlenen apigenin miktarına etkisi.....	78

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Boylu ardıç a) meyvesi b) ağacı.....	4
Resim 4.1. Retsch marka öğütücü.....	36
Resim 4.2. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon cihazı ve deney düzeneği.....	37
Resim 4.3. HPLC cihazı.....	39
Resim 4.4. 25 ppm'lik standart madde içeren çözeltinin HPLC kromatogramı.....	40



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

CP	Kritik nokta
D	Difüzyon katsayısı (cm ² /s)
P	Basınç (bar, MPa)
T	Sıcaklık (°C, K)
t	Zaman (min)
η	Viskozite (kg.m/s)
ρ	Yoğunluk (g/cm ³)

Kısaltmalar

Açıklamalar

ABTS	Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi
ANFIS	Adaptif Nöro Bulanık Arayüz Sistemleri
ANN	Yapay Sinir Ağı
ANOVA	Varyans Analizi Metodu
BCB	β-karoten Ağartma
CO₂	Karbondioksit
DPPH	Difenil-1 Pikrilhidrazil Radikali
FRAP	Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü Metodu
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GC-FID	Gaz Kromatografisi - Alev İyonizasyonu
GC-MS	Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometresi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
OFAT	Tek seferde tek faktör
ROT	Reaktif Oksijen Türü

Kısaltmalar**Açıklamalar****SAE**

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu

SK-CO₂

Süperkritik Karbondioksit

TBA

Tiyobarbitürik asit

UPLC

Ultra Performans Sıvı Kromatografi

UV

Ultraviyole

YCM

Yüzey Cevap Metodu

YM-MKT

Yüz-Merkezli Merkezi Kompozit Tasarım



1. GİRİŞ

İnsan sağlığına yönelik gelişmeler ve tedavi yöntemleri gün geçtikçe artarken sentetik malzemelerin endüstri, tıp ve tarımda kullanımının insan sağlığını ve çevreyi tehdit edici etkileri gün yüzüne çıkmaktadır. Ancak sentetik malzemelerin kullanımından kaynaklı kanser dahil birçok hastalıkla mücadelede doğal ürünlere dönüş henüz yeterli düzeyde değildir. Kanser dünyanın ve ülkemizin önemli sağlık problemlerinden birisidir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan küresel kanser verilerine göre 2018 yılında dünya genelinde 18,1 milyon yeni kanser vakasının geliştiği ve kanser kaynaklı ölüm sayısının 9,6 milyon olduğu tahmin edilmektedir (Ferlay ve diğerleri, 2019). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2017 yılı kanser istatistiklerine göre Türkiye'de ise 163,417 kanser vakası ile karşılaşılmıştır.

Biyoaktif bileşiklere sahip olan bitkiler tıpta, nutrastiklerde, fonksiyonel gıda takviyelerinde, farmasötik ara ürünlerde ve sentetik ilaçlar için kimyasal oluşturmada potansiyel kullanıma sahiptir (Ben Salah ve Allouche, 2019). Bu bileşikler, bitkilerin ikincil metabolitleri olup onlara tedavi edici özellik kazandırırılar. Son yıllarda yapılan araştırmalar, polifenollerin antioksidan etkileri sayesinde özellikle kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıkların nlenmesindeki rolünü destekleyici niteliktedir (Tsao, 2010).

Bitkilerden biyoaktif bileşiklerin özütlenmesi, ayrılması ve saflaştırılması üzerine yapılan araştırmalar akademide ve endüstride büyük ilgi görmektedir. Geleneksel yöntemlerin düşük ekstraksiyon verimi sağlaması, yüksek ekstraksiyon süresi gerektirmesi, üründe zehirli çözücü kalıntısı bırakması ve ısıya karşı hassas bileşiklerin işlem sonucu bozunması gibi sakıncaları olduğundan yenilikçi ve evre dostu özütleme proseslerine ihtiyaç duyulmuştur (Ben Salah ve Allouche, 2019). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yüksek endüstriyel potansiyeli olan doğal maddelerin bitkisel matrisler gibi yenilenebilir kaynaklardan ekolojik olarak uyumlu şekilde üretimi için geliştirilmiş yeni bir teknolojidir. Süperkritik şarttaki karbondioksit (CO₂) düşük sıcaklık değerlerinde çalışma imkânı sağlaması, yanıcı ve patlayıcı olmaması, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, özüt içerisinde kalıntı bırakmaması ve seçiciliğinin kontrol edilebilir olması gibi avantajları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Sovova ve Stateva, 2011).

Dünyada 70'e yakın türü olduğu bilinen *Juniperus* (Ardıç) cinsi, *Cupressaceae* (Servigiller) ailesine ait bir bitkidir. Ardıç türleri genelde kuzey yarım kürede dağılım gösteren, yaprak dökmeyen, küçük veya çalı biçiminde ağaçlardır. Kimyasal içeriğinde yer alan flavonoidler, uçucu yağlar, kumarinler ve bisiklik diterpenler sayesinde antik çağlardan beri bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Sayısız çalışmaya konu olan bitkinin idrar söktürücü, iltihap önleyici, mantar önleyici, ağrı kesici, antidiyabetik ve antihiperlipidemik, karaciğeri koruyucu, antioksidan, kolesterol azaltıcı, antimikrobiyal, antibakteriyal ve nöron koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Bais, Gill, Rana ve Shandil, 2014). Ardıç ormanları bakımından zengin olan ülkemizde 2 sekson altında 6 farklı ardıç türü (*J.excelsa*, *J.foetidissima* Willd., *J.communis* L., *J.oxycedrus* L., *J.phoenicea* L. ve *J.sabina*) doğal olarak yetişmektedir (Tümen, 2010). Literatür incelendiğinde *Juniperus excelsa* (Boylu Ardıç) meyvelerinden flavonoidlerin süperkritik CO₂ ile özütlenmesi üzerine çalışma yapılmadığı görülmüştür. Yüksek lisans tez çalışması kapsamında *Juniperus excelsa* (Boylu ardıç) meyvelerinden kuersetin, apigenin, kempferol, silibinin ve taksifolin ilaç etken maddelerinin miktarını maksimize eden süperkritik CO₂ ekstraksiyonu optimum çalışma şartlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda Isparta Akkeçili köyü yamaçlarından toplanan boylu ardıç meyveleri ekstraksiyon işlemine hazır hale getirilmek için öncelikle öğütülmüştür. Ardından içeriğindeki nemi uzaklaştırmak amacıyla kurutulup belirlenen boyut aralığında sınıflandırması yapılmıştır. Ekstraksiyon işleminde akışkan olarak süperkritik CO₂ ve polar bileşikleri özütleyebilmek için yardımcı çözücü (kosolvent) olarak etanol kullanılmıştır. Optimize edilmek istenen çalışma parametreleri sıcaklık, basınç, ekstraksiyon süresi ve CO₂ akış hızı olarak belirlenmiştir. Her bir parametrenin çalışma aralığı belirlenirken literatürden faydalanılmış ayrıca süperkritik akışkan ekstraksiyon cihazının sorunsuz olarak çalışabileceği maksimum ve minimum şartlar dikkate alınmıştır. "Design Expert 12" Programında Yüzey Cevap Metodu (YCM) seçilerek 21 deneyin sıcaklık, basınç, ekstraksiyon süresi ve CO₂ akış hızı değerleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen özütlerin içerisindeki ilaç etken maddelerinin (kuersetin, apigenin, kempferol, silibinin ve taksifolin) kalitatif ve kantitatif analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır. HPLC analizi sonucu özütlerde yer alan her bir ilaç etken maddesinin miktarı (μg flavonoid/ g bitki) "Design Expert 12" Programının yanıt fonksiyonu olarak girilmiş ve çalışma parametrelerindeki değişimin özütlenen ilaç etken miktarlarını nasıl etkilediği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ardıç (*Juniperus ssp.*) Bitkisi

Kuzey yarım kürenin dağlık ve ılıman bölgelerinde kolaylıkla yetişen ardıç ağacının güney yarım küredeki yayılımı Kenya'ya kadar uzanmaktadır. Servigiller (*Cupressaceae*) ailesine ait ardıç cinsinin dünya genelinde 70'e yakın türü olduğu bilinmektedir. Toplamda 3 sekson (*Caryocedrus*, *Oxycedrus* ve *Sabina*) altında çeşitlilik gösteren ardıç cinsinin ülkemizde 2 seksona (*Oxycedrus* ve *Sabina*) ait 6 türü (*J.excelsa*, *J.foetidissima* Willd., *J.communis* L., *J.oxycedrus* L., *J.phoenicea* L. ve *J.sabina*) yetişmektedir (Tümen, 2010). Özellikle boylu ardıç dünya genelinde en geniş yayılımını Anadolu'da yapmakta olup sabina seksonuna aittir (Asili, Emami, Rahimizadeh, Fazly-Bazzaz ve Hassanzadeh, 2008). Boylu ardıç meyvesi ve ağacı Resim 1'de verilmiştir.

Ülkemiz ormanlarının %4,58'ini oluşturan saf ardıç ormanları özellikle Akdeniz bölgesinde olmak üzere geniş yayılım alanı göstermektedir. Ardıç ağaçlarının diğer türlerin barınmadığı alanlarda yetiştirilerek ormanların devamlılığını sağlama ve toprak erozyonuna karşı koruma gibi önemli fonksiyonları vardır. Ülkemizdeki ardıç ormanları içerisinde Boylu ardıç (*Juniperus excelsa*) ve Kokulu ardıç (*Juniperus foetidissima* Willd.) kapladığı alan bakımından büyük paya sahiptir. Özellikle boylu ardıç meşcereler kurabilen ve geniş alanlar halinde görülebilen bir türdür. Boylu ardıç, 15 – 20 m'ye kadar boy ve 80 cm'e kadar çapa ulaşabilen bir ağaçtır. Ortalama 500 – 2500 m yüksekliklerde, deniz iklimi etkilerinin azalmaya başladığı, dağların iç kısmında step sınırına kadar uzanır. İlıman iklim ağacı olup; sıcağa, soğuğa ve kuraklığa karşı oldukça dayanıklıdır (Carus, 2004). Resim 2.1'de boylu ardıç ağacı ve meyvelerinin fotoğrafları sunulmuştur.

Ardıç bitkisi meyve, yaprak ve odunlarında ihtiva ettiği değerli yağ ve kimyasallar nedeniyle antik çağlardan beri özellikle tıp ve farmakognozi alanları olmak üzere gıda, kozmetik ve peyzaj gibi farklı birçok alanda kullanılmaktadır. Çoğunlukla meyve ve yaprakları kullanılarak hazırlanan ürünlerin üst solunum yolu enfeksiyonları, cilt hastalıkları, şeker hastalığı, sindirim yolu hastalıkları, metabolizma bozuklukları, jinekolojik hastalıklar, hemoroit, baş ağrısı ve soğuk algınlığına karşı iyi geldiği bilinmektedir. *Juniperus oxycedrus* L. türünden elde edilen katran (Pix Juniperi adıyla

Türk Kodeksinde kayıtlı) sedef hastalığı ve saçlı derideki kepeklenme probleminin tedavisinde kullanılmaktadır (Tümen, 2010; Tümen ve Hafizoğlu, 2003).



Resim 2.1. Boylu ardıç a) meyvesi b) ağacı

Ardıç bitkisinden elde edilen ekstraktların biyolojik aktivitelerini tespit etmek üzere yapılan çalışmalar bitkinin antioksidan (Loizzo ve diğerleri, 2007), antifungal (Soković, Ristić ve Grubišić, 2004), antidiyabetik (Orhan, Aslan, Demirci ve Ergun, 2012), antiviral (Loizzo ve diğerleri, 2008), antifertilite (doğum kontrolü), iltihap önleyici (Akkol, Güvenç ve Yesilada, 2009), diüretik, antimikrobiyal (Topçu ve diğerleri, 2005; Asili ve diğerleri, 2008), antibakteriyel, sitotoksik (Sadeghi, Emami, Saeidi, Sadeghi ve Jafarian, 2009) lipoksigenaz inhibitör, antifeedant, ağrı kesici, antihiperlipidemik, karaciğeri koruyucu, kolesterol azaltıcı ve nöron koruyucu (Tavares ve diğerleri, 2012) etkileri olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalar bitkinin ekstraktlarında flavonoidler, uçucu yağlar, kumarinler ve bisiklik diterpenler gibi kimyasal bileşenlerin bulunduğunu, meyvesinde bulunan flavonoidlerin ise kateşin, epigallokateşin, apigenin, rutin, kuersetin glikozitleri, kemferol glikozitleri, luteolin, nepetin, amentoflavon ve bilobetin olduğunu göstermiştir (Bais ve diğerleri, 2014; Seca ve Silva, 2006; Yaglioglu ve Eser, 2017). Çizelge 2.1’de Büyük kozalaklı ardıç (*Juniperus macrocarpa*) bitkisinde bulunan polifenolik bileşikler gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Büyük kozalaklı ardıç (*Juniperus macrocarpa*) bitkisinde bulunan polifenolik bileşikler (Lesjak ve diğerleri, 2014)

Polifenolik Bileşikler	Moleküler Formül
Fenolik asitler	
p-Hidroksibenzoik asit	$C_7H_6O_3$
2,5-Dihidroksibenzoik asit	$C_7H_6O_4$
Protokatekuik asit	$C_7H_6O_4$
Vanilik asit	$C_8H_8O_4$
Gallik Asit	$C_7H_6O_5$
Siringik asit	$C_9H_{10}O_5$
Sinnamik asit	$C_9H_8O_2$
p-Kumarik Asit	$C_9H_8O_3$
Kafeik Asit	$C_9H_8O_4$
Ferulik Asit	$C_{10}H_{10}O_4$
5-O-kafeoil kinik asit	$C_{16}H_{18}O_9$
Flavonoidler	
Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$
Apigenin-7-O-glikozit	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Amentoflavon	$C_{30}H_{18}O_{10}$
İzorhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$
Kemferol	$C_{15}H_{10}O_6$
Kemferol-3-O-glikozit	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Krizoeriol	$C_{16}H_{12}O_6$
Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$
Luteolin-7-O-glikozit	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Kuersetin	$C_{15}H_{10}O_7$
Kuersitrin	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Kuersetin-3-O-glikozit	$C_{21}H_{20}O_{12}$
Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$
Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$
Epikateşin	$C_{15}H_{14}O_6$
Kateşin	$C_{15}H_{14}O_6$
Kumarinler	
Umbeliferon	$C_9H_6O_3$
Aeskuletin	$C_9H_6O_4$
Lignanlar	
Materesinol	$C_{20}H_{22}O_6$
Sekoizolarikiresinol	$C_{20}H_{26}O_6$

Literatürde ardıç meyvelerinin bulunduğu coğrafi yere, yüksekliğe, olgunluk derecesine ve diğer faktörlere bağlı olarak % 0,2-3,42 uçucu yağ içerdiği belirtilmektedir. Ticari olarak temin edilebilir ardıç meyvesi uçucu yağlarının bileşimi % 58–85 oranda monoterpenler (α -pinen (% 10-76), sabinen (% 1-28), β -pinen, β -myrcen, limonen ve terpinen-4-ol); % 2-10 oranda seskiterpenler; alkoller ve diğer oksijenli bileşiklerden oluşmaktadır (Barjaktarovic, Sovilj ve Knez, 2005).

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler biyoaktif fonksiyonları nedeniyle son yıllarda araştırmacıların ilgisini üzerine çekmektedir. Bu bileşenler bitkilerin ikincil metabolitleri olarak bilinir ve yüksek antioksidan kapasiteleri ile birlikte antimikrobiyal, antiviral ve antienflamatuar gibi biyolojik işlevlere sahiptir (Ignat, Volf ve Popa, 2011).

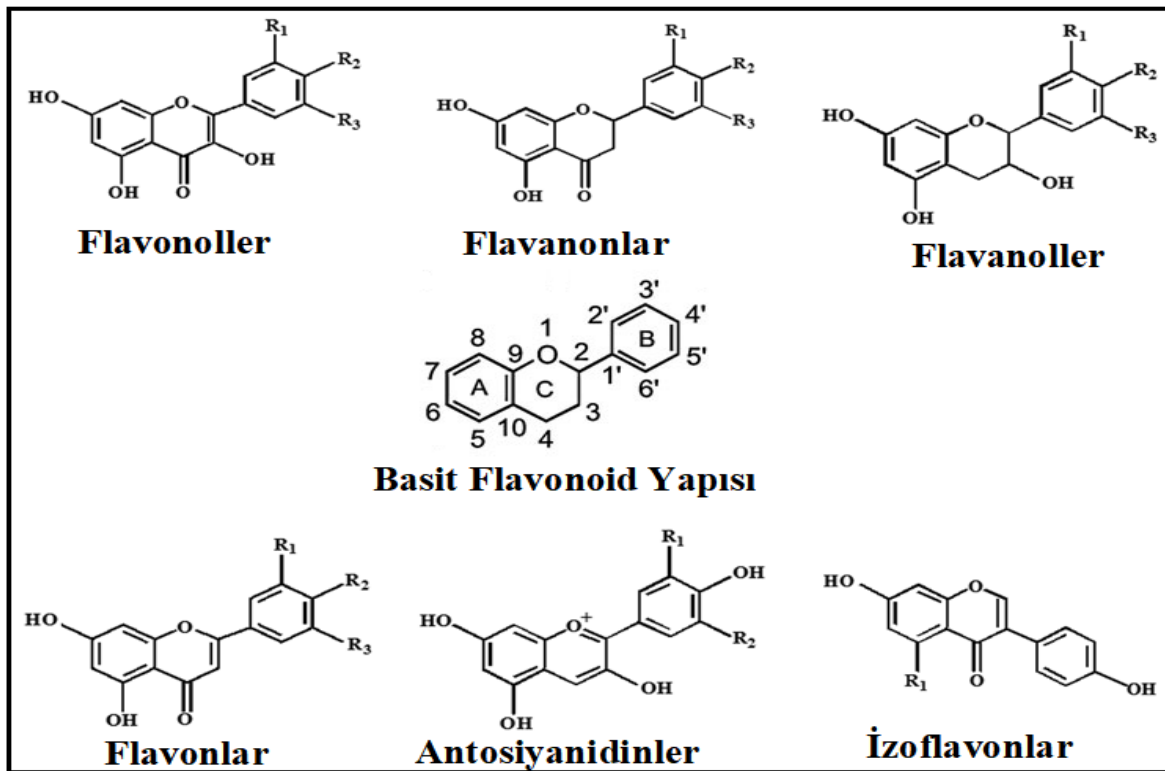
Fenolik bileşikler fitokimyasalların en yaygın gruplarından biri olup meyve, sebze ve bitkilerin duysal ve besinsel kalitesinin önemli belirleyicileridir. Ayrıca bitkilerin fizyolojik ve morfolojik yapısını da belirlerler. Fenolikler bitki büyümesinde ve üremesinde önemli rol oynarken, meyve ve sebzelerin renk ve duysal özelliklerine katkıda bulunmasının yanı sıra, antioksidan özellik göstermekte, UV ışığına, patojenlere ve avcılara karşı etkili bir koruma sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde gıda sektöründe doğal renklendirici ve koruyucu olarak veya boya, kâğıt ve kozmetik gibi birçok endüstriyel uygulamada kullanılabilir (Ignat ve diğerleri, 2011).

Polifenoller içerdikleri fenol halkası sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elemanlara göre birkaç sınıfa ayrılır. Polifenollerin ana grupları; flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilbenler ve lignanlardır.

İnsan sağlığına olan faydaları nedeniyle doğal polifenoller diyetisyenler, gıda araştırmacıları ve tüketiciler tarafından büyük ilgi görmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar ve ilgili meta-analizler kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, osteoporoz ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine karşı korunmada bitki polifenollerini bakımından zengin besinlerin uzun süreli tüketimini kuvvetle önermektedir (Pandey ve Rizvi, 2009).

2.2. Flavonoidler

Bilinen 8000'den fazla polifenol bileşiğin bugüne kadar 4000'den fazlası flavonoid olarak tanımlanmış halen daha bu sayı giderek artmaktadır. Flavonoidler antosiyanidinler, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, flavonoller ve flavanoller olmak üzere 6 ana sınıfa ayrılmaktadır (Ignat ve diğerleri, 2011). Flavonoid sınıfları ve kimyasal yapıları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Flavonoid sınıfları ve kimyasal yapıları (Pandey ve Rizvi, 2009)

Flavonoidler C6–C3–C6 konfigürasyonunda, 15 karbon atomundan oluşan, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Basit yapıları A ve B olarak iki aromatik halka ve bunları bir köprü görevi üstlenerek birleştiren 3 karbonlu heterosiklik yapıdaki C halkasından oluşmaktadır. C halkasında meydana gelen değişiklikler ana flavonoid sınıflarını oluşturur; bunlardan en yaygın şekilde meydana gelenleri flavonlar ve flavonollerdir. A ve B halkalarında meydana gelen yer değişimleri ise her flavonoid sınıfı içerisinde farklı bileşiklere yol açmaktadır. Özellikle yapılarında bulundurdukları –OH grupları sayesinde kolayca glikozitlenirler ve şekerlerle glikozit bağı oluştururlar (Ignat ve diğerleri, 2011).

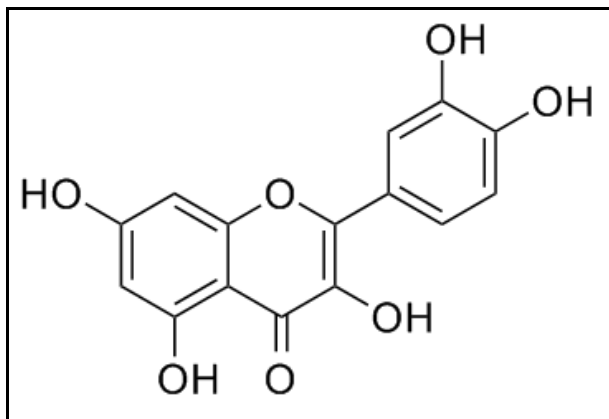
Flavonoidler, reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu oksidatif strese karşı bir savunma olarak vitaminlerin ve enzimlerin fonksiyonlarını tamamlayan ve işlevlerine katkıda bulunan güçlü antioksidanlardır. Bu bileşikler; antioksidan özelliklerini serbest radikalleri bağlayarak, metal şelatlayıcı özellik göstererek, hidrojen ve elektron donörü olarak, indirgeyici ajan olarak veya oksijen tutucu mekanizmaları yoluyla gösterirler (Ignat ve diğerleri, 2011). Çizelge 2.2’de her flavonoid sınıfının temsili bileşikleri, besin kaynakları ve sağlığa olan faydaları gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Flavonoidlerin ana sınıfları, besin kaynakları, temsili bileşikleri ve sağlığa faydaları (Kolaç, Gürbüz ve Yetiş, 2017; Tsao, 2010)

Flavonoid ana sınıfları	Besin kaynakları	Temsili flavonoidler	Sağlığa Faydası
Flavonoller	Elma, fasulye, yaban mersini, karabuğday, kızcılık, hindiba, pırasa, marul, soğan, zeytin, biber, domates	Kemferol Kuersetin Rutin İzorhamnetin Mirisetin Ramnetin	> Antioksidan etki > DNA oksidatif hasarını önlemede yardımcı > Prostat, yumurtalık, meme, mide ve barsak kanseri riskini azaltma > Gut hastalığında etkili > Antienflamatuvar
Flavonlar	Turunçgiller, kereviz, maydanoz, ıspanak	Apigenin Luteolin Vogonin Baicalein	> Lösemi tedavisinde etkili > Kas gevşetici, sakinleştirici ve anksiyolitik etki
İzoflavonlar	Soya fasulyesi, kuru baklagiller	Daidzein Genistein Glisitein	> Klimakterik semptomları hafifletme > Endometrium ve meme kanseri riskini azaltıcı
Flavanonlar/ flavanonol	Turunçgiller	Naringenin Hesperidin Eriodiktol Taksifolin	> Fibril oluşumuna yardımcı > Antioksidan > Antienflamatuvar > Yumurtalık kanserinde faydalı
Antosiyanidinler	Yabanmersini, siyah ve kırmızı kuş üzümü, kiraz, yabani acı kiraz, üzüm, çilek	Pelargonidin Siyanidin Delfinidin Peonidin Petunidin Malvidin	> Kronik kalp hastalığı riskini azaltma > Görsel aktiviteyi iyileştirme > Antiviral etki > Antioksidan etki
Flavanoller	Elma, yaban mersini, üzüm, soğan, marul	Kateşin Epikateşin	> Yanık iyileştirmede > Mukoza ve üst solunum yolu ilihapları > Gastroenteritte faydalı

Flavonoller: Flavonoller mantar ve algler dışındaki çoğu bitkide bulunmaktadır. Yaygın olarak glikozit formunda bulunan flavonollerden bazıları kemferol, kuersetin, izorhamnetin ve mirisetindir. Flavonoidlerin aglikon (şekerle bağ yapmamış) formları sınırlı olsa da, kemferolün 200'den fazla şeker konjugatı vardır. Tüketilen çoğu meyve, sebze ve içeceğin flavonol içeriğinde yerel yetiştirme koşulları, mevsimsel değişimler, depolama ve çeşitlilik farkları nedeniyle büyük farklılıklar oluşabilmektedir (Del Rio ve diğerleri, 2013).

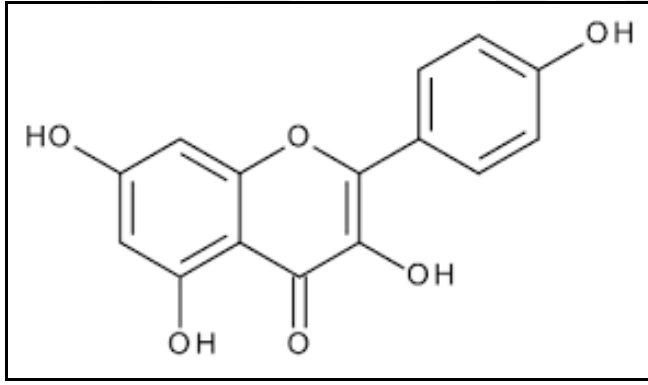
Tez çalışması kapsamında boylu ardiç meyvelerinde varlığı aranan kuersetin flavonol sınıfında yer almaktadır. Kuersetin beslenmede en yaygın bulunan flavonollerden birisidir. Çeşitli meyve ve sebzelerde bulunmakla birlikte ne yüksek konsantrasyonları soğanda görülmektedir (Erlund, 2004). Özellikle sarı ve kırmızı soğanlar (*Allium cepa*) zengin flavonol kaynağı olup yüksek konsantrasyonda kuersetin-4'-O-glikozit ve kuersetin-3,4'-O-diglikozit içerirler (Del Rio ve diğerleri, 2013). Ayrıca çay, şarap ve elma farklı coğrafi koşullar ve tüketim sıklığına bağlı olarak ana kuersetin kaynakları arasında yer alabilmektedir. Kuersetin, bitkilerde rutin veya diğer adıyla kuersetin-3-rutinosit gibi birçok farklı glikozit formunda bulunur. Yapılan invitro çalışmalar kuersetinin antioksidatif, kanser önleyici, anti-inflamatuar, topaklanma önleyici ve damar genişletici etkilerini göstermiştir (Erlund, 2004). Kuersetinin moleküler kütlesi 302,2 g/mol'dür. Şekil 2.2'de kuersetinin açık molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kuersetinin molekül yapısı

Tez çalışması kapsamında boylu ardiç meyvelerinde varlığı aranan bir diğer bileşen olan kemferol de flavonol sınıfında yer alır. Özellikle çay, brokoli, elma, çilek ve fasulyede bol miktarda bulunur. Birçok çalışma diyetle kemferolün özellikle kanser olmak üzere kronik

hastalık riskini azaltmada yararlı etkilerini göstermiştir. Ayrıca epidemiyolojik çalışmalar kemferol alımı ile kanser arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Kemferol ayrıca serbest radikallere karşı vücudun antioksidan savunmasını artırmada yardımcı rol üstlenmektedir (Chen ve Chen, 2013). Sekiguchi ve diğerleri (2019) kemferolün sistemik sklerozda cilt fibrozu üzerinde inhibe edici etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada kemferolün oksidatif stresi baskılayarak, inflamasyonu ve oksidatif hücresel hasarı azaltarak bleomisin kaynaklı fibrozu iyileştirebildiği ve sistemik sklerozda cilt fibrozu tedavisi için alternatif bir uygulama olabileceği gösterilmiştir (Sekiguchi ve diğerleri, 2019). Kemferolün moleküler kütlesi 286,23 g/mol'dür. Şekil 2.3'te kemferolün açık molekül yapısı gösterilmiştir.

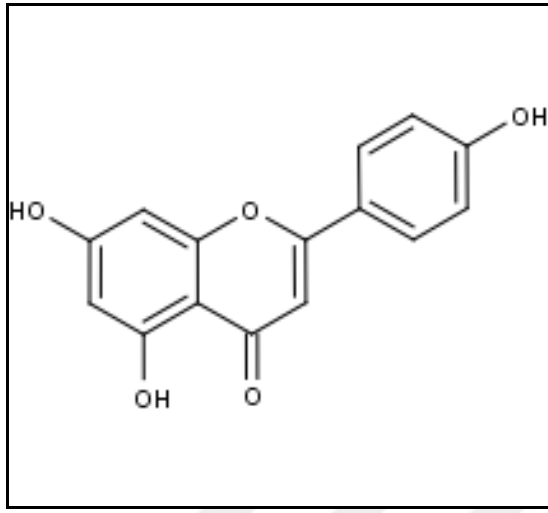


Şekil 2.3. Kemferolün molekül yapısı

Flavonlar: Flavonlar yapıları itibariyle genel olarak flavonollere benzer ancak 3 numaralı C atomunda hidroksil grubu içermezler. Apigenin, luteolin, vagonin ve baicalein flavonlardan bazılarıdır. Flavonların geniş bir dağılımı olmasa da kereviz (*Apium graveolens*), maydanoz (*Petroselinum hortense*) ve bazı bitkilerde önemli miktarlar tespit edilmiştir. Pek çok flavon 7-O-glikozit olarak bulunmasına rağmen kafeinsiz bir içecek olan roibos çayı az miktarda apigenin ve luteolin 8-C ve 6-C glikozitlerini içerir (Del Rio ve diğerleri, 2013).

Tez çalışması kapsamında boylu ardıç meyvelerinde varlığı aranan apigenin flavon sınıfında yer alır. Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) glikosile olarak sebzelerde (maydanoz, kereviz, soğan) meyvelerde (portakal), bitkilerde (papatya, kekik, kekik, fesleğen) ve bitki bazlı içeceklerde (çay, bira ve şarap) önemli miktarda bulunur. Literatürde yer alan araştırmalar apigeninin birçok farklı farmakolojik aktiviteye ve

nutrasötik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu bilinen apigenin ayrıca iltihaplanma, otoimmün, nörodejeneratif hastalıklar ve hatta çeşitli kanser türleri gibi hastalıkların üstesinden gelmek için terapötik bir ajan olarak kullanılabilir. Ek olarak, apigenin düşük iç toksisiteye ve antioksidatif potansiyele sahiptir (Salehi ve diğerleri, 2019). Apigeninin moleküler kütlesi 270,4 g/mol'dür. Şekil 2.4'te apigeninin açık molekül yapısı gösterilmiştir.



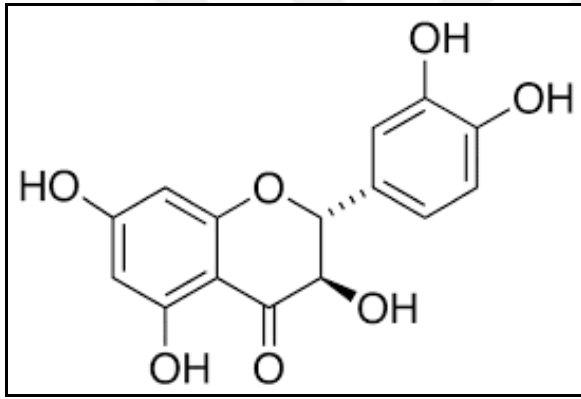
Şekil 2.4. Apigenin molekül yapısı

İzoflavonlar: İzoflavonların B aromatik halkası C2 yerine C3 pozisyonuna bağlı olan bileşiklerdir. Baklagillerde önemli miktarda daidzein, soya fasulyesinde ise genistein bulunur. Fermente edilmiş soya ürünleri, glikozitlerin hidrolizinin bir sonucu olarak aglikonlar bakımından zengindir ancak soya sütü ve tofu gibi üretimi ısıtmayı içeren ürünler daidzein ve genistein glikozitleri formunda düşük miktarda da olsa izoflavon içerir. Östrojene olan yapısal benzerlikleri nedeniyle izoflavonlar, fitoöstrojenler olarak adlandırılır ve tahıl tanelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Del Rio ve diğerleri, 2013). Damar sertliği (ateroskleroz) veya kanser gibi hastalıkların önlenmesi veya tedavisinde kullanılması tavsiye edilmektedir (Ignat ve diğerleri, 2011).

Flavanonlar: Flavanonlar, C4'te doymuş üç karbon zinciri ve bir oksijen atomunun varlığı ile karakterize edilir. Genellikle C7'deki bir disakarit ile glikosile edilirler. Flavanonlar turunçgil meyvelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ayrıca domates ve nane gibi bazı aromatik bitkilerde de bulunurlar. Başlıca aglikonları greyliftta naringenin, portakalda hesperidin ve limonda eriodiktol'dür. Son 15 yılda tanımlanan flavanonların ve

bunların 3-hidroksi türevlerinin (dihidroflavonol olarak da adlandırılan flavanonoller) sayısı önemli ölçüde artmıştır (Del Rio ve diğerleri, 2013; Tsao, 2010).

Tez çalışması kapsamında boylu ardiç meyvelerinde varlığı aranan taksifolin flavanonol sınıfında yer alır ve turunçgillerden elde edilir. Taksifolin diğer adıyla dihydroquercetin soğan, devedikeni, Silybum cinsinin tohumları ve çam kabuğunda da bulunmaktadır. Güçlü antioksidan aktiviteye ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir ve geleneksel antibiyotiklerin etkinliğini artırır. Taksifolin bu özellikleri nedeniyle, gıda katkı maddeleri, sağlıklı gıda, ilaç ve diğer ilgili ürünlerin üretimde oldukça geniş kullanıma sahiptir (Ghoreishi, Hedayati ve Mohammadi, 2016b). Şekil 2.5'te taksifolinin açık molekül yapısı gösterilmiştir. Taksifolinin moleküler kütlesi 304,25 g/mol'dür.



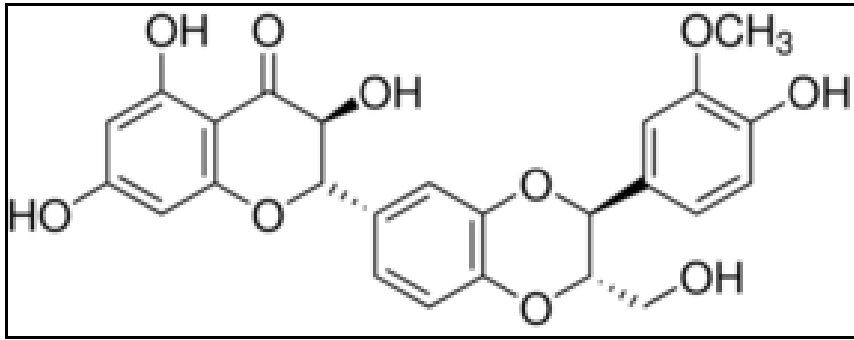
Şekil 2.5. Taksifolin molekül yapısı

Antosiyanidinler: Antosiyanidinler, antosiyaninlerin temel yapılarıdır. En yaygın antosiyanidin aglikonları pelargonidin, siyanidin, delfinidin, peonidin, petunidin ve malvidindir. Çeşitli antosiyaninler üretmek üzere şeker ve organik asitlerle konjugatlar oluştururlar. pH'a bağlı olarak turuncu, kırmızı, mavi ve mora kadar değişen renklere meyvelerde ve çiçeklerde kolayca görülürler (Del Rio ve diğerleri, 2013).

Antosiyaninler ve diğer fenolikler reaktif radikallere yüksek oranda hidrojen verip daha fazla radikal oluşumunu önleyerek antioksidanlar gibi davranabilmektedir. Antioksidan potansiyelleri, hidroksil gruplarının sayısına ve düzenlenmesine; yapısal konjugasyonun kapsamına ayrıca halka yapısında elektron veren ve elektron çeken ikame edicilerin varlığına bağlıdır. Antosiyaninler iyi bilinen farmakolojik özelliklere ve anti-enflamatuvar ve antioksidan aktiviteler gibi güçlü biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Tsao, 2010).

Flavanoller (Kateşinler): Flavanoller diğer flavonoidlerden farklı olarak bitkilerde glikozit formda görölmezler. Bunlar basit monomerlerden, kondanse tanenler olarak da bilinen oligomerik ve polimerik proantosiyanidinlere kadar değişen karmaşık flavonoid alt sınıfıdır. (+) -kateşin ve (-) -epikateşin'in doğada yaygın olarak bulunurken (-)-epiafzeleşin gibi diğerleri daha sınırlı bir dağılıma sahiptir. Yeşil çay (*Camellia sinensis*) yüksek seviyede flavanol monomerleri içerir (Del Rio ve diğerleri, 2013).

Tez çalışması kapsamında boylu ardıç meyvelerinde varlığı aranan bir diğer bileşen silibinin'dir ve flavanolignan sınıfında yer alır. Silymarin, dört izomerik flavanolignan içeren (silibin, silidiyanin, izosilbinin ve silikristin) devedikeni bitkisi tohumlarından ve meyvelerinden elde edilir. Bu bileşenler arasında, ana biyolojik olarak aktif bileşen silibinin (silybin) yaklaşık 1:1 oranında iki diastereomer A ve B'nin karışımıdır ve anti-kanser, antioksidan, antiinflamatuvar, hipokolesterolemik, kardiyoprotektif, nöroprotektif etkileri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Silibinin, gastrointestinal rahatsızlık dışında herhangi bir olumsuz etki yaratmadığından güvenli olarak kabul edilir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından karaciğer hastalıklarının tedavi etmek için kullanılabileceği onaylanmıştır (Takke ve Shende, 2019). Silibininin moleküler kütlesi 482,44 g/mol'dür. Şekil 2.6'da silibininin açık moleköl yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Silibinin moleköl yapısı

2.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Günümüzde kimyasal ürünlerin tasarımı ve üretiminde zararlı materyallerin kullanımını sınırlayan yenilikçi teknolojiler tercih edilmektedir. Yenilenebilir kaynakların insan sağlığı ve çevre gereksinimlerine uygun, sürdürülebilir bir şekilde kullanımı yeşil teknolojilerin tasarlanması, optimizasyonu ve uygulanmasıyla mümkündür. Süperkritik akışkan

ekstraksiyonu (SAE), bitkisel matrisler gibi yenilenebilir kaynaklardan endüstriyel potansiyeli olan doğal maddelerin ekolojik olarak uyumlu üretimi için yeni bir teknoloji örneğidir (Sovova ve Stateva, 2011).

Süperkritik akışkanlar, yoğunluklarına bağlı çözücü güçleri nedeniyle geleneksel (sıvı) çözücülere yeni bir boyut kazandırmıştır. Süperkritik akışkanların yoğunluğu, proses gereksinimlerine göre sıcaklık, basınç ve/veya bileşiminde yapılabilecek değişikliklerle kolayca ayarlanabilmektedir.

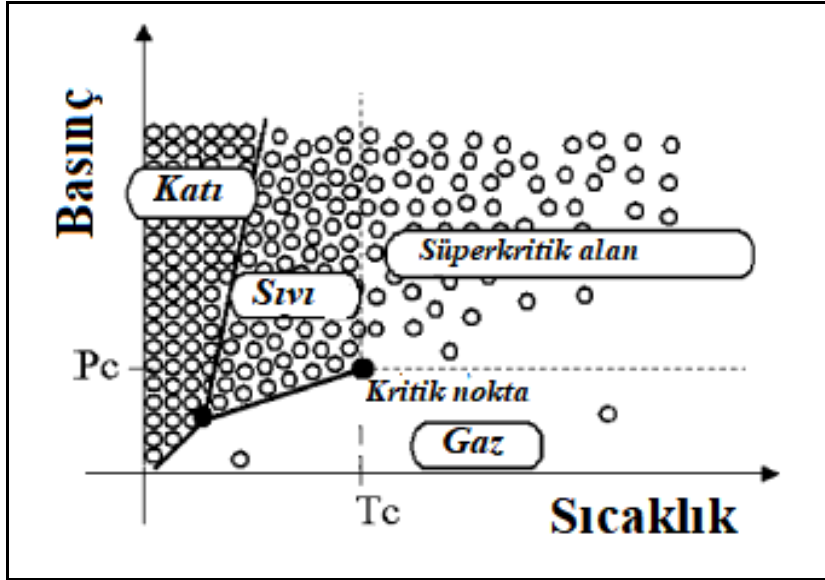
Süperkritik akışkan uygulamaları temel olarak gıda ürünleri (kahve ve çay), gıda katkı maddeleri (şerbetçiotu, aromalar, renklendiriciler, vitaminler ve doymamış yağ asitleri) ve nutrasötikler/ fitofarmasötikler için katı malzemelerden ekstraksiyona odaklanmaktadır. Diğer endüstriyel uygulama alanları aşağıda listelenmiştir:

- Seramik üretimi: Yeni nesil inorganik çapraz akışlı membranların hazırlanması,
- Reaksiyonlar: Kompleks organik moleküllerin sentezi,
- Hazırlık ölçeği süperkritik akışkan kromatografisi: Benzer bileşiklerin özellikle lipidlerin damıtılması,
- Köpük ve aerojellerin hazırlanması: Özellikle mikro-elektronik endüstrisindeki uygulamalar için çeşitli nano sistemler veya nanoyapılı malzemeler,
- Polimer işleme: Emdirme, kalıntıların çıkarılması (sıyırma), morfolojik modifikasyonlar (köpükler, partiküller ve lifler) ve partikül kaplama (Pasquali, 2007),
- İnce parçacık sentezi: Partikül çekirdeklenmesi ve büyümesini sağlamak için fiziksel formasyon yöntemleri olarak hızlı genleşen süperkritik çözeltiler (RESS) ve süperkritik anti-çözücülerin (SAS) kullanımı (Cansell, Aymonier ve Loppinet-Serani, 2003).

2.3.1. Süperkritik akışkanlar ve fiziksel özellikleri

Süperkritik akışkanlar, kritik basınç ve kritik sıcaklık değerlerinin üzerindeki maddelerdir. Özellikleri sıvı ve gazlar arasında değişir. Moleküller arası etkileşimin olmadığı sıkıştırılabilir sıvı ve yoğun bir gaza benzetilebilirler (Sovova ve Stateva, 2011).

Saf bir akışkana ait faz diyagramı Şekil 2.7’de verilmiştir. Kritik koşullara yakın bir bölgede, sistem özellikleri basınca ve sıcaklığa karşı oldukça duyarlıdır. Genellikle süperkritik akışkanlar çözücü olarak, kritik değerine yakın bir sıcaklıkta ve kritik değerinden yeterince yüksek bir basınçta uygulanır.



Şekil 2.7. Saf bir akışkanın P-T faz diyagramında mikroskobik davranışının gösterimi

Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanların fizikokimyasal özelliklerinin karşılaştırması Çizelge 2.3’te verilmiştir. Süperkritik akışkanlar gaz benzeri düşük viskozite ve yüksek difüzyon kabiliyetleri nedeniyle bitki materyallerine kolayca nüfuz edebilirler.

Çizelge 2.3. Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri (Khaw, Parat, Shawve Falconer, 2017)

Faz	Yoğunluk x 10 ² (kg.m ⁻³)	Difüzyon katsayısı x 10 ⁻³ (cm ² .s ⁻¹)	Viskozite x 10 ⁻⁴ (kg.m.s ⁻¹)
Sıvı	6–16	<0,005	2–30
Süperkritik akışkan	2–5	0,7	0,1–0,3
Gaz	0,006–0,02	0,1–0,4	0,1–0,3

Süperkritik akışkanların basınç ve sıcaklıkta yapılan değişikliklerle yoğunluğu ayarlanabilmekte ve çözme gücü artırılabilir. Genel olarak, kritik bölgedeki fiziksel özellikleri kütle ve ısı transferini artırır.

2.3.2. Süperkritik akışkan özütlemesinin avantaj ve dezavantajları

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, geleneksel ekstraksiyon tekniklerine kıyasla önemli avantajlara sahiptir. Bunlardan bazıları; çözücü gücünün ve seçiciliğinin ayarlanabilmesi nedeniyle esnek bir proses olması, ekstraksiyon süresinin kısa olması, çözücü giderimi gibi ileri proseslere ihtiyaç duyulmaması ayrıca kirletici organik çözücülerin az miktarda kullanılması veya hiç kullanılmamasıdır (Reverchon ve De Marco, 2006).

Büyük ölçekli süperkritik akışkan ekstraksiyonu teknolojisinin geleneksel yöntemlere kıyasla temel dezavantajı ise yüksek basınca dayanıklı ekipman gerektirmesi nedeniyle maliyetli oluşudur. Ancak bu dezavantaj çoğu zaman üstün ürün özelliklerinin sağlanması, düşük işletme maliyetleri ve birkaç teknolojik adımın entegrasyonu ile göz ardı edilebilmektedir (Sovova ve Stateva, 2011).

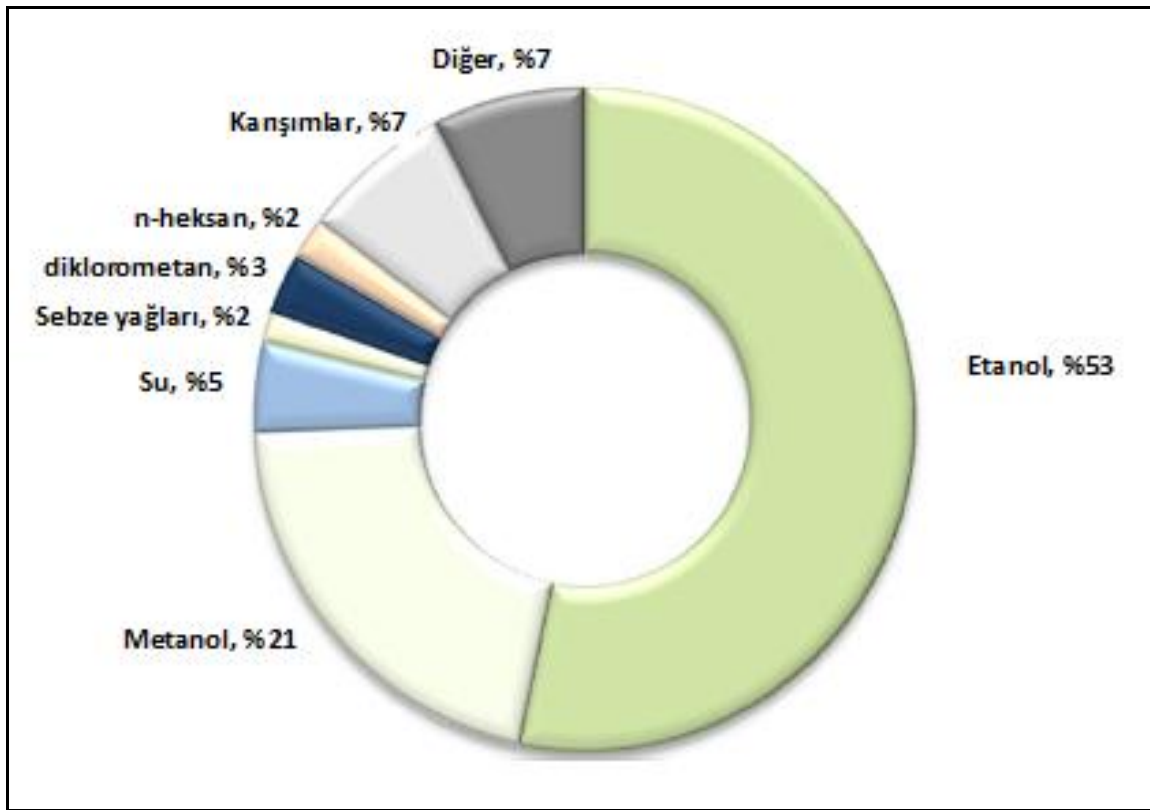
2.3.3. Süperkritik akışkanın seçimi ve kosolvent kullanımı

Heksan, pentan ve bütan gibi hidrokarbonlar ile azot oksit, kükürt heksaflorür ve florinli hidrokarbonlar süperkritik akışkan olarak incelenmiştir. Ancak birkaç pratik nedenden dolayı çoğu süperkritik akışkan ekstraksiyonu işleminde karbondioksit tercih edilmiştir. Karbondioksit nispeten düşük kritik basınç (73,8 bar) ve sıcaklığa (31,1°C) sahip olmasının yanı sıra toksik değildir, yanıcı değildir, düşük bir maliyetle yüksek saflıkta temin edilebilir ve ekstraktan kolayca uzaklaştırılır. Karbondioksitin düşük kritik sıcaklığa sahip olmasının bir avantajı da termal olarak kararsız bileşikler bozulmadan özütleyebilmesidir. Süperkritik durumda olan CO₂ sıvı pentan ile karşılaştırılabilir bir polariteye sahiptir ve bu nedenle lipofilik bileşikler için en uygun olandır. Karbondioksitin ana dezavantajı ise polar analitlerin özütlenmesi için yeterli polariteye sahip olmamasıdır (Pourmortazavi ve Hajimirsadeghi, 2007).

Akışkan yoğunluğunun uygun şekilde ayarlanmasıyla veya yeterli kosolvent (yardımcı çözücü) kullanılarak düşük çözünürlüğün üstesinden gelinebilir. Kosolventler çözücü fazın polaritesini çözünen lehine değiştirir böylece çözücü gücünü artırırlar (Pasquali, 2007). Genellikle metanol, etanol, su ve diğer polar sıvıların küçük miktarlarda eklenmesiyle

süperkritik karbondioksitin (SK-CO₂) polaritesini artırmak mümkündür (Sovova ve Stateva, 2011).

Şekil 2.8’de araştırmacıların süperkritik ekstraksiyonda kullandığı kosolventler ve tercih yüzdeleri gösterilmektedir. De Melo ve diğeri yapmış oldukları çalışmada araştırmacıların kosolvent olarak daha çok etanolü tercih ettiğini görmüşlerdir.



Şekil 2.8. Süperkritik ekstraksiyonda kullanılan yardımcı çözenler (De Melo, Silvestre ve Silva, 2014).

Etanol SK-CO₂ gibi insan sağlığına ve çevreye zararsız bir çözücü olması nedeniyle özellikle gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde daha çok kullanılmaktadır. Ayrıca etanol önemli derecede polar bir (1.69 D) çözücüdür ve küçük miktarda eklenmesi süperkritik çözeltilinin polaritesini ciddi anlamda artırabilir. Metanol etanole kıyasla daha polar olsa da insan sağlığına karşı tehlikeleri nedeniyle tercih edilmemektedir (De Melo, Silvestre ve Silva, 2014).

2.3.4. İşletme parametrelerinin etkileri

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu dört aşamalı bir işlem olarak kabul edilmektedir: (1) bileşiğin matristen desorpsiyonu (2) çözücünün matris içine difüzyonu, (3) analitin süperkritik akışkan tarafından çözülmesi ve (4) ekstraksiyon hücresinden akışkanın çıkarılmasıdır (Pourmortazavi ve Hajimirsadeghi, 2007).

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunu doğru şekilde gerçekleştirmek için termodinamik (çözünürlük) ve kinetik (kütle transferi) özellikler arasındaki karmaşık etkileşimin anlaşılması gerekir.

Ekstraksiyon verimliliği ve ürünlerin özellikleri, besleme maddesinin partikül büyüklüğü ve nem içeriği, ekstraksiyon sıcaklığı ve basıncı, çözücü akış hızı, ekstraksiyon süresi ve yardımcı çözücü kullanımı gibi çeşitli parametrelerden etkilenir (Martinez, 2007).

Partikül boyutunun etkisi

Süperkritik akışkan ekstraksiyon verimini arttırmak için akışkan ile numune materyali temasını en üst düzeye çıkarmak önemlidir. Genel olarak partikül boyutunun küçültülmesi daha fazla dış yüzey alanı yaratır ayrıca katı matristeki difüzyon yolları kısalmış ve çözücü difüzyonuna karşı daha küçük bir partikül içi direnç sağlanmış olur. Böylece ekstraksiyon veriminde artış görülür. Ancak partikül boyutunu fazla küçültmek öğütme işlemi sırasında numune kaybına ayrıca ekstraksiyon sürecinde reaktör içerisinde kanallaşma sorunlarına sebep olabilmektedir. Hücre içerisindeki kanallaşma akışkanın materyal ile temasını engeller bu da ekstraksiyon veriminde azalmaya neden olur (Pourmortazavi ve Hajimirsadeghi, 2007; Reverchon ve De Marco, 2006).

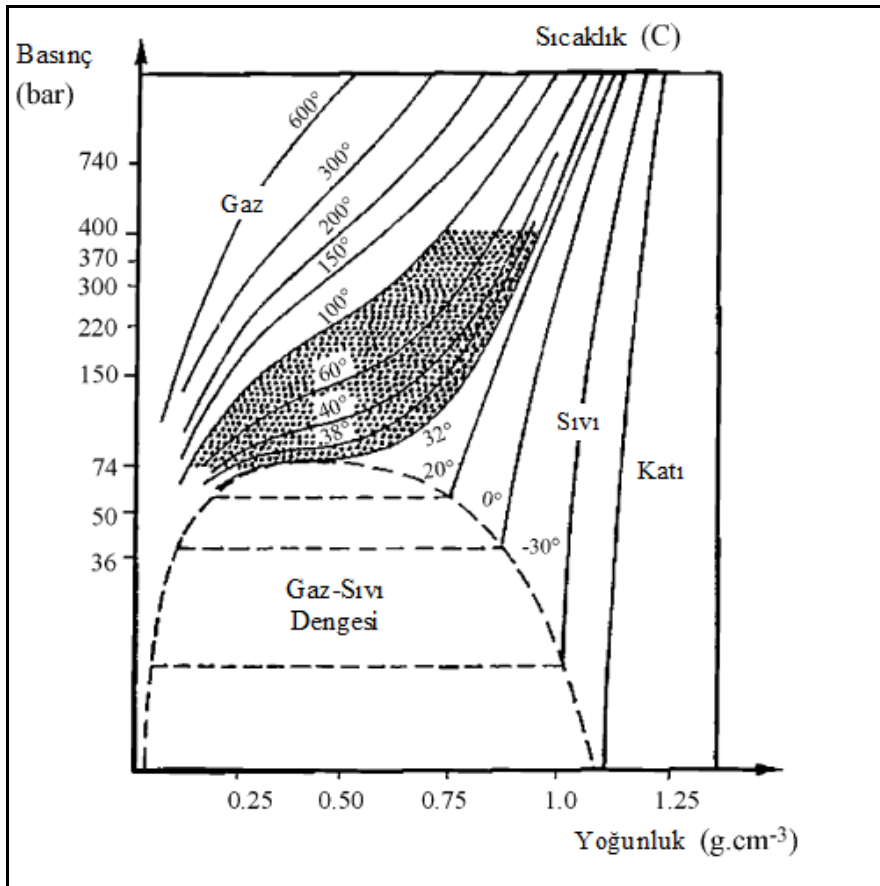
Nem oranının etkisi

Nem özütleme işlemeine önemli bir etkiye sahiptir. Numune materyali nem miktarı ile genişlediğinden materyalin daha geçirgen bir hücre zarı ile sonuçlanmasına hem yağın hem de CO₂'in daha kolay geçişine izin verir. Bununla birlikte, fazla nem yağın difüzyonunu engelleyebilir ve erişilebilirliği üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir.

Ayrıca ekstrakte edilen yağda yüksek bir su seviyesi istenmez, çünkü stabilitesini olumsuz etkiler. Nem sadece ekstraksiyon verimini değil aynı zamanda materyalin fiziksel yapısını da etkiler. (Martinez, 2007)

Sıcaklık ve basıncın etkisi

Basınç ve sıcaklık, süperkritik akışkan ekstraksiyon işlemini kontrol eden anahtar parametrelerdir; basınçtaki artış akışkan yoğunluğunda artışa böylece çözme gücünün artmasına neden olur. Bu etki karbondioksit için Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Karbondioksit için basınç-sıcaklık-yoğunluk diyagramı

Bununla birlikte, belirli bir noktadan sonra basıncın artırılması, akışkanın difüzyon kabiliyetini azaltabilir ve ham madde içindeki gözeneklerle temasın azalmasına böylece çözünmenin potansiyel olarak azalmasına neden olabilmektedir. Ayrıca bazı durumlarda, basınçtaki artış katı matrisin sıkıştırılmasına ve boşluk kesrinin düşmesiyle elverişsiz ekstraksiyon sonuçlarına yol açmasına neden olabilir (Khaw ve diğerleri, 2017).

Sıcaklığın etkisini tahmin etmek numunenin doğasına da bağlı olduğundan daha zordur. Yüksek sıcaklık akışkanın enerjisini, difüzyon kabiliyetini ve görünür hacmi artırırken yoğunluğunda azalmaya (daha düşük çözünürlük) sebep olur. Diğer yandan özütlenmek istenen maddelerin buhar basıncında artışa (daha yüksek çözünürlük) neden olur. Çözünürlük üzerine bu çift etkiyi dikkate alarak doğru sıcaklık seçimi yapmak ve bu iki karşıt etkinin dengesini kurmak gerekir (Pourmortazavi ve Hajimirsadeghi, 2007).

Akışkan besleme hızının etkisi

Sıcaklık ve basınç, termodinamik (yoğunluk ve çözünürlük) ve taşınım (vizkosite ve difüzyon kabiliyeti) özelliklerini etkilerken akış hızı aksel yayılımı, kütle transfer katsayısını ve yığın birikimini etkileyen bağımsız bir değişkendir. Ekstraksiyon veriminin yüksek olması için film direncinin düşük olması gerekir. Dış film difüzyon katsayısı (k_f) ve itici kuvvet arttıkça, ekstraksiyon verimi üzerinde olumlu bir etki elde edilir.

Düşük akış hızı ile çalışıldığı durumlarda film direnci veya yığın içindeki birikme, partikül içi difüzyon direnci ve çözünürlüğe baskın gelir, akışkan matrikse daha iyi nüfus eder ancak ekstraksiyon hızı azalır. Diğer yandan yüksek akış hızlarında çözünürlük ve partikül içi difüzyon direnci ekstraksiyon verimini sınırlayıcı etki gösterir. Ayrıca ekstraksiyon hücresinde basınç düşüşüne ve hücre çıkışında analit kaybına sebep olması nedenleriyle verimi azaltıcı etkisi görülmektedir (De Melo, Pourmortazavi ve Hajimirsadeghi, 2007; Silvestre ve Silva, 2014). Ancak akış hızının artması ekstraktör içerisinde türbülansa ve film kalınlığının azalmasına neden olarak verimi artırıcı bir etki de gösterebilir.

Kosolvent kullanımının etkisi

Yardımcı çözücülerin sürükleyici olarak işlev gördüğü belirtilmektedir. Sürükleyici etki, akışkanın çözücü gücü kosolvent ilave edilerek artırılırken bu akışkanın seçiciliğinin korunması veya artırılması olayı olarak tanımlanmıştır. Birçok çalışmada, artırılmış çözünürlükler, hidrojen bağı veya dipol-dipol etkileşimleri gibi çözünen-kosolvent etkileşimlerine atfedilmiştir (Martinez, 2007).

Her ne kadar kosolvent kullanımı, çözünürlüğü arttırmak açısından faydalı olsa da kullanımlarına dikkatli bir şekilde karar verilmelidir, çünkü süreç tasarımının

karmaşıklığını artırabilir. Kosolvent yüklemesindeki artış, istenmeyen bileşenlerin de özütlenmesine neden olabilir. Ayrıca, kosolventlerin kullanılması kütle transferini etkileyebilir, işleme maliyetlerini büyük ölçüde artırabilir ve istenen ekstraktın bozulmasına neden olabilir (Martinez, 2007).

Ekstraksiyon süresinin etkisi

Ekstraksiyon süresi numunenin gözenek yapısına, materyalin türüne, partikül boyutuna, matriks içerisindeki hedeflenen bileşenlerin konsantrasyonuna, süperkritik akışkandaki çözünürlüğüne, akışkanın hızına ve diğer işlem koşullarına göre değişir. Örneğin büyük partikül boyutlarında çalışmak daha düşük yüzey alanı sebebiyle ekstraksiyon süresinin uzamasına neden olur (Atanur, 2008).

2.4. Yüzey Cevap Metodu

Yüzey cevap metodu özellikle karmaşık prosesler içeren mühendislik ve gıda bilimlerinde maliyet, zaman ve emek sarfiyatını en aza indirmek için tercih edilmektedir.

Yüzey cevap metodu ampirik bir çalışmada sistem optimizasyonu için kullanılan bir grup matematiksel ve istatistikî teknikten oluşur. Bu ampirik çalışma özütlenen ilaç etken madde miktarı gibi bir veya daha fazla ölçülen *cevap* ile basınç ve sıcaklık gibi bir dizi girdi değişkeni (*faktörler*) arasındaki ilişki olabilir. YCM'nun amacı; belirli bir sistem için optimum çalışma koşullarını veya ilgi alanı içerisindeki cevabın bir dizi değişkenden etkilenme şeklini bulmaktır (García, Rodríguez ve Revenga, 2000).

Cevap yüzeylerinin yerleştirilmesi ve analiz edilmesi deneysel tasarımın doğru seçimi ile büyük ölçüde kolaylaşır. Deneysel tasarım ikinci dereceden bir modele uyacak şekilde her faktörün en az üç seviyesine sahip olmalıdır (García ve diğerleri, 2000).

Literatür incelendiğinde özellikle analitik prosedürlerin optimizasyonunda Box-Wilson tarafından geliştirilen Merkezi Kompozit Tasarım (MKT)'in tercih edildiği görülmüştür (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar ve Escalera, 2008).

Çizelge 2.4'te merkezi kompozit tasarımın analitik kimyadaki bazı uygulamaları örneklendirilmiştir.

Çizelge 2.4. Merkezi kompozit tasarımın analitik kimyadaki bazı uygulamaları (Bezerra, ve diğerleri, 2008)

Analit	Örnek	Analitiksel teknik	Çalışmanın amacı
Klorobenzenler	Çevresel su	HPLC	Bu maddelerin eser miktarlarının belirlenmesi için oda sıcaklığında iyonik sıvı kullanılarak Tepe Boşluğu Tek Damla Mikroekstraksiyon prosedürünün geliştirilmesi
İnsan immünoglobulin G	Yapay protein karışımı	Afinite HPLC	Proteinlerin karışımdan saflaştırılmasını optimize etmek
Organoklorlu pestisitler ve poliklorlu bifeniller	İnsan serumu	GC	Tepe boşluğu katı faz kullanarak bu maddelerin belirlenmesi için prosedür geliştirilmesi
Tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve doksisisiklin	İlaçlar	Kapiler elektroforez	Analitlerin ayrılmasında elektrolit bileşimi, pH, konsantrasyon, sıcaklık ve uygulanan voltajın etkisinin araştırılması
Uçucu bileşikler	Sirke	GC	Analitler için karıştırma çubuğu sorpsiyon ekstraksiyonunun ekstraksiyon ve desorpsiyon analitik koşullarının optimize edilmesi
Polibromlu difenil eterler, polibromlu bifeniller ve polikromlu naftalinler	Toru örnekleri	GC-MS	Mikrodalga destekli ekstraksiyon ve büyük hacimli enjeksiyon içeren yöntem için deneysel koşulların optimizasyonu
Amlodipin, nitrendipin, felodipin, lakidipin ve lerkandipin	İnsan plazması	HPLC	Bu analitlerin tayini için organik çözücü olarak dietil eterin kullanıldığı sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin geliştirilmesi
Nikel	Petrol	GF AAS	Katı örnekleme stratejisi kullanarak nikelin doğrudan belirlenmesi için prosedür geliştirilmesi
Alüminyum	Meyve suları ve meşrubat	GF AAS	Ultrason destekli yapay parçalamaya dayalı hazırlama yöntemi geliştirme
Cıva	Benzin	CV AAS	Mikroemülsiyon ortamında metalin doğrudan sulu sodyum borhidrür indirgenmesi için yöntem optimize edilmesi
Hidroksimetilfurfural	Bal	Amperometri	Fotolitografik tekniklerle oluşturulan ve Pt mikroelettrot çipine dayanan mikrobiyosensörlerin geliştirilmesi

Araştırmacılar 2 ana başlık altında 4 farklı deneysel tasarım çeşidi geliştirilmiştir. Bunlar;

- 1) Box-Wilson Merkezi Kompozit Tasarım
 - a) İlgi Alanını Dıştan Çevreleyen Tasarım
 - b) İlgi Alanını İçten Çevreleyen Tasarım
 - c) Yüz Merkezli Tasarım
- 2) Box-Behnken Tasarım (Değirmencioğlu ve Yazgı, 2006)

Yüzey cevap metodu uygulamasında izlenmesi gerekli aşamalar aşağıdaki gibidir.

- 1) Çalışmanın amacına ve araştırmacının deneyimine göre tarama çalışmaları ve deneysel bölgenin sınırlandırılması yoluyla sistemi etkileyen ana bağımsız değişkenlerin seçimi,
- 2) Deney tasarımının seçimi ve seçilen deney matrisine göre deneylerin yapılması,
- 3) Elde edilen deneysel verilerin bir polinom fonksiyonuna uygun olarak matematiksel - istatistiksel ifadesi,
- 4) Modelin uygunluğunun değerlendirilmesi,
- 5) Optimal bölgeye doğru bir yer değiştirme yapmanın gerekliliğinin ve olasılığının doğrulanması,
- 6) Çalışılan her değişken için optimum değerlerin elde edilmesi (Bezerra ve diğerleri, 2008).

Yüzey cevap metodunun ilk adımı bağımlı değişkenler (cevap) ile bağımsız değişkenler (faktörler) arasında doğru bir fonksiyonel ilişki için uygun bir yaklaşım bulmaktır. Cevap yüzeyinin şekli ile ilgili bilgi yetersizse genellikle ilk denemeler cevap değerlerine birinci dereceden bir model uygulayarak şekli yaklaştırmak için yapılır. Bununla birlikte birinci dereceden model, yüzey eğriliğinin varlığından kaynaklanan uyumsuzluklar için yetersiz kalabilir bu durumda daha yüksek dereceli terimler eklenerek model yükseltilir. Bir sonraki yüksek dereceli model ikinci dereceden modeldir ve aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.1)$$

Burada;

x_1, x_2, \dots, x_k : Girdi değişkenleri,

y : Sistemin yanıtı,

β_0 : Model sabiti,

$\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$: Değişken katsayıları,

ε : Rastgele hata olarak ifade edilir.

En küçük kareler yöntemi ile polinomdaki katsayılar kolayca tahmin edilebilmektedir. Ardından belirli bir yüzey için yüzey cevap analizi uygulanır. Verilerin toplanması için uygun deneysel tasarımlar kullanıldığında model katsayıları en etkin şekilde tahmin edilebilir (García ve diğerleri, 2000).

Merkezi kompozit tasarım 2^k faktöriyel tasarımdır. k terimi $-1, +1$ gibi kodlanmış faktör seviyelerini; n_c ($n_c > 1$) sıfır ile kodlanmış merkez noktalarını ifade eder. Her tasarım değişkenin ekseninde yer alan iki aksenel nokta ($\pm\alpha$) ise tasarım merkezinden uzaklığı gösterir. Tasarım noktalarının toplam sayısı $N = 2^k + 2k + n_c$ formülü ile hesaplanır. *Yüz-merkezli merkezi kompozit tasarım* α 'nın 1'e eşit olduğu MKT'nin bir varyasyonudur (García ve diğerleri, 2000).

3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Literatür araştırmasının birinci bölümünde ardıçla ilgili yapılmış çalışmalara değinilmiştir. Yer verilen çalışmaların özellikle süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemini içermesi tercih edilmiştir. Bunun yanında bitkinin toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin araştırıldığı ayrıca biyolojik aktivitesinin incelendiği çalışmalar da bu bölümde bulunmaktadır.

Literatür araştırmasının ikinci bölümünde farklı bitkilerden süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile biyoaktif bileşiklerin özütlenmesi çalışmalarına yer verilmiştir. Seçilen çalışmaların yüzey cevap metodu ile optimizasyon içermesine dikkat edilmiştir.

3.1. Ardıç Bitkisi Bileşiklerinin Özütlenmesine Yönelik Çalışmalar

Larkeche, Zermanea, Meniaia, Crampon ve Badens (2015) tarafından yapılan çalışmada Cezayir’de yetişen adi ardıç ağacı (*Juniperus communis* L.) dikenlerinden SK-CO₂ ekstraksiyonu ile esansiyel yağlar özütlenmiştir. Ekstraksiyon işlemi 1 saat boyunca 10-30 MPa basınç ve 308-328 K sıcaklık aralığında, 0,42 kg/h sabit CO₂ akış hızında, 0,5 mm ile 0,315 mm çaplı partiküller ile gerçekleştirilmiştir. Yağ ekstratları n-hekzan içinde alınarak dondurucuda (255 K) depolanmıştır. Her 15 dakikada bir alınan numunelerin uçucu yağ kütlesi ekstraksiyon hücresinin iki kez tartılmasıyla belirlenmiştir. Maksimum yağ kazanımını sağlayan basınç ve sıcaklık parametrelerinin optimizasyonu Nemrod-W yazılımı kullanılarak YCM ile yapılmıştır. Başlangıçtaki kuru partikül kütlesine göre ağırlıkça maksimum yağ kazanımı % 6,55 olarak 328 K sıcaklık, 30 MPa basınç ve 0,315 mm’den küçük partiküllerle çalışıldığı durumda elde edilmiştir. Ekstrakt analizi gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak yapılmıştır ve özütlerin ana bileşenlerinin seskiterpenler olduğu görülmüştür. En baskın konsantrasyona sahip seskiterpen bileşikler germakren D ve 1-octadecene olarak tespit edilmiştir.

Barjaktarovic ve diğerleri (2005) tarafından yapılan çalışmada adi ardıç ağacı meyvelerinin süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yapılmış, özütlenen kimyasalların hangi basınç ve sürelerde elde edildiği incelenmiştir. 0,250 – 0,400 mm arasında partikül büyüklüğüne sahip 20 g ardıç meyvesi 80, 90 ve 100 bar basınçta, 40 °C sıcaklıkta, 0,2 kg/h sabit CO₂ akış hızında

ekstrakte edilmiştir. Ağırlıkça verim % 0,65 – 4,00 arası bulunmuştur. Özütlerin gaz kromatografisi - alev iyonizasyonu (GC-FID) ve gaz kromatografisi - kütle spektrometresi (GC-MS) analizleri yapılmış ve içeriğinde 200'den fazla bileşen tespit edilerek bunlardan 50 tanesi tanımlanmıştır. Verim yüzdesine bağlı olarak monoterpen, seskiterpen, oksijenli monoterpen ve oksijenli seskiterpen hidrokarbon gruplarının ekstraksiyon süresi araştırılmış ve her bir terpen grubunun verimini destekleyen koşullar incelenmiştir. Buna göre ilk 0,6 saat içerisinde tüm basınç değerlerinde monoterpenlerin tamamı ekstrakte edilebilmiştir. Oksijenli monoterpenler ise 100 ve 90 bar basınçlarında çalışıldığında sırasıyla 0,5 ve 1,2 saatte ekstrakte edilebilmiştir. 80 bar basınçta 4 saat süreyle çalışıldığında ise 100 bar basınçta ekstrakte edilebilen miktarın ancak % 75'ine ulaşılmıştır. Seskiterpenlerin ise ilk 0,5 saat içerisinde ekstrakte edilebilen miktarları çalışılan basınç arttıkça artmaktadır. Oksijenli seskiterpenlerin aynı ekstraksiyon oranına sırasıyla 1, 2 ve 3 saatte 100 ve 90 bar basınçta ulaşılmıştır.

Marongiu ve diğerleri (2004) tarafından yapılan çalışmada finike ardıcından (*Juniperus phoenicea*) uçucu yağların SK-CO₂ ekstraksiyonu yapılmış ve biyoaktivitesi incelenmiştir. 90 bar basınç, 50 °C sıcaklık, 1 kg/h CO₂ akış hızı ve 4 saat boyunca yapılan süperkritik ekstraksiyon ile ağırlıkça % 0,2 yağ özütlenmiştir. Ayrıca Clevenger aparatıyla 5 saat boyunca yapılan hidrodistilasyon sonucu elde edilen özüt miktarı karşılaştırılmıştır. Buna göre hidrodistilasyon yöntemiyle ağırlıkça % 0,3 yağ elde edilmiştir. Özütlerin GS-MS ile analizi yapılmış her iki özütte bulunan ana bileşikler α -pinen (SK-CO₂ ile % 18,4; HD ile % 13,9), germakren D (SK-CO₂ ile % 14,3; HD ile % 8,1), β -kariofilen (SK-CO₂ ile % 8,7; HD ile % 5,4) olarak belirlenmiştir. SK-CO₂ özütlerinin monoterpenlerce daha zengin, seskiterpenler ve diterpenlerce daha fakir olduğu görülmüştür. Farklı basınçlarda elde edilen ekstraktların antiviral, antiproliferatif (kansere hücrelerinin çoğalmasını engelleyici) ve antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Sonuçlar, 200 ve 300 bar'da elde edilen ekstraktların, farklı hücre dizilerine karşı sitotoksik olduğunu ve tek zincirli bir RNA + virüsüne karşı aktif olduğunu göstermiştir. En fazla sitotoksik etki gösteren özütlerin ayrıca antiproliferatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivite ise göstermemişlerdir.

Liu, Li, Wang, Wang, Meng ve Wang (2016) tarafından yapılan çalışmada rigida ardıcı (*Juniperus rigida*) diken, gövde ve meyvelerinin SK-CO₂ ekstraksiyonu yöntemiyle esansiyel yağları özütlenmiş, kimyasal bileşenleri GC-MS ile analiz edilmiştir. 0,37 – 0,9

mm arasında boyutlandırması yapıldıktan sonra 10 g kuru numune, 20 L/h sabit CO₂ akış hızında ekstrakte edilmiştir. YCM, Box-Behnken tasarımı ile esansiyel yağ verimini etkileyen sıcaklık (35-45 °C), basınç (16-20 MPa) ve özütleme süresi (90-150 min) parametrelerini incelemişlerdir. 18 MPa basınç, 40 °C sıcaklık ve 120 min özütleme süresinin ardıç gövdesinden (% 2,5) ve meyvelerinden (% 1,0) maksimum yağ verimi elde etmek için optimum çalışma şartları olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca metanol ile ekstrakte ettikleri özütlerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarını belirlemişlerdir. Buna göre ardıç bitkisi dikenlerinin en yüksek fenolik içeriğe (19,43 ± 0,85 mmol gallik asit/100 g) sahip olduğu, bitki gövdesinin ise en yüksek flavonoid içeriğe (0,33 ± 0,02 mmol quercetin/100 g) sahip olduğu bulunmuştur. Ardından metanol ekstraktlarının RP-HPLC analizi yapmış ve ardıç meyveleri içerisinde kumarik asit, rutin, podofilotoksin, amentoflavon, formononetin, galangal olduğu gösterilmiştir. Antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için üç in-vitro yöntem (DPPH, ABTS ve FRAP) kullanılmıştır. Bitkinin gövde kısmından özütlenen uçucu yağlar ve diken kısmının metanol ekstraktı diğerlerine göre güçlü antioksidan aktivite sergilemiştir.

Miceli ve diğerleri (2009) tarafından yapılan çalışmada ardıcın Türkiye'den temin edilen iki farklı türündeki (*Juniperus communis* L. var. *communis* (Jcc) ve *Juniperus communis* L. var. *saxatilis*. Pall.(Jcs)) flavonoid içerikleri, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Ardıç meyveleri oda sıcaklığında kurutulduktan sonra öğütülmüştür. 20 gram numune karanlık odada, 50 °C sıcaklıkta, 8 saat boyunca, 200 ml metanol içerisinde sürekli olarak çalkalanarak (700 rpm/min) maserasyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. Ardından filtreden geçirilip 40 °C'de döner buharlaştırıcıda kurutulmuştur. Özütlerin Folin-Ciocalteu metodu ile toplam fenolik madde içeriği incelenmiştir. Jcc türünde (59,17 ± 1,65 mg GAE/g özüt) Jcs (17,64 ± 0,09 mg GAE/g özüt) türünün 3 katı kadar fenolik miktar bulunmuştur. Flavonoid ve biflavonoid içerikleri HPLC-DAD-ESI-MS analizi ile irdelenmiştir. Buna göre toplam flavonoid miktarı rutin cinsinden ve toplam biflavonoid miktarı amentoflavon cinsinden Jcc için sırasıyla 25947 ± 0,86 ve 4346 ± 3,95 µg/g özüt, Jcs için sırasıyla 5387 ± 34,88 ve 1944 ± 26,88 µg/g özüt olarak bulunmuştur. Jcc özütünün içerdiği 16 flavonoid tanımlanmış bunlardan en yoğun olanları hypolaetin-7-pentoside ve quercetin-hexoside olarak tespit edilmiştir. Jcs özütü içeriğinde ise 8 flavonoid tanımlanmış, quercetin-hexoside ve isoscutellarein-8-O-hexoside en yoğun bulunan bileşiklerdir. Özütlerin in vitro antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş buna göre Jcc özütleri DPPH testi, indirgeyici kuvvet analizi ve antilipid peroksidasyon aktivitesi

(Tiyobarbitürik asit – TBA) testlerine göre Jcs özütlerinden daha aktif, Jcs özütlerinin ise Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasiteleri daha yüksek bulunmuştur. Ekstraktların ayrıca antimikrobiyal potansiyelleri çalışılmış, sadece Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal kapasite göstermişlerdir.

Yaglioglu ve Eser (2017) tarafından yapılan çalışmada 4 farklı ardıç türü (diken ardıç, kokulu ardıç, boylu ardıç ve adi ardıç) özütlerinin fenolik içerikleri ve antiproliferatif (kansere hücrelerinin çoğalmasını engelleyici) aktiviteleri incelenmiştir. Bitkinin tohum ve diken kısımları öğütüldükten sonra 50 gram numune 500 ml'lik metanol maserasyonuna tabi tutulmuştur. Özütleme prosedürü iki kere uygulanmış olup her biri 7 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. 14 günlük ekstraksiyon işleminin sonunda filtre edilip metanol (MeOH) düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Özütlerin fenolik içerikleri HPLC-TOF/MS ile analiz edilmiştir. Kateşin ve rutin ardıç türleri içerisinde bulunan ana fenolik bileşik olarak tespit edilmiştir. Özütlerin antiproliferatif aktiviteleri insan serviks kanseri (HeLa) ve fare beyin tümörü (C6) hücre dizilimlerine karşı incelenmiştir. Bitkinin diken kısımlarına ait özütlerin tohumlarına göre daha iyi antiproliferatif aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda ardıç bitkisinin antikanser bileşik kaynağı olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Chatzopoulou, De Haan ve Katsiotis (2002) tarafından yapılan çalışmada adi ardıç (*Juniperus communis*) bitkisi meyvelerinden süperkritik CO_2 ekstraksiyonu ve hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağ bileşiklerini özütlenmiştir. Bu iki yöntem yağ içeriği ve kazanımı yönünden karşılaştırılmıştır. SK- CO_2 ekstraksiyonu öncesinde meyveler 1 mm'den küçük ve 1-2 mm aralığında olacak şekilde iki ayrı boyuta öğütülmüştür. 50 gram numune 40, 50 °C sıcaklık 90, 125 bar basınçta 0,3-0,9 kg/h arasında tutulan sabit CO_2 akış hızında, 1 saat boyunca SK- CO_2 ile özütlenmiştir. Toplanan özüt pentan içerisinde çözülmüş ve GS analizi yapılmıştır. Hidrodistilasyon işlemi Clevenger aparatında yapılmıştır. 20 gram öğütülmüş ardıç meyvesi 340 ml deiyonize su ile 2 saat boyunca 3-3,5 ml/min hızla distile edilmiştir. Özütlenen yağ sodyum sülfat ile kurutulmuş, - 20 °C kapalı kap içerisinde saklanmış ve GC-MS analizi yapılmıştır. SK- CO_2 ekstraksiyonu sonucu küçük boyutlarda olan numuneden daha fazla özüt elde edildiği, sadece sıcaklık ve sadece basınç artışı olduğu durumlarda özüt miktarında artış olduğu, basınçtaki artışın özütleme verimini sıcaklığa oranla daha çok artırdığı görülmüştür. Ayrıca özüt içeriğindeki ana grubun monoterpenler olduğu (α -

pinen), partikül boyutundaki küçülmenin özütteki monoterpenlerin oranını azalttığı görülmüştür. Meyvelerin dış yüzeylerinde bulunan yüksek moleküler ağırlıklı, yağlar veya balmumları gibi istenmeyen bileşenlerin büyük partiküllü meyvelerden daha çok özütlendiğini belirtmişlerdir. SK-CO₂ özütlerinde hidrodistilasyona göre daha fazla oranda seskiterpen grubu varken, monoterpen gruplarının daha az olduğu görülmüştür. SK-CO₂ ekstraksiyonu ile yüksek molekül ağırlığına ve kaynama noktasına sahip bileşiklerin daha çok özütlendiğini belirtmişlerdir.

Aliev, Radjabov ve Musaev (2015) tarafından yapılan çalışmada ardıç bitkilerinden biyolojik aktivite gösteren maddelerin SK-CO₂ ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada 40 °C sabit sıcaklık ve 1,5 kg/h sabit CO₂ akış hızında çalışılmıştır. Basıncıdaki değişimlerin (100, 200, 300 bar) özüt içerisinde yer alan bileşik gruplarını ne yönde değiştirdiği incelenmiştir. Ayrıca Clevenger aparatı ile 100 °C 'de 3 saat boyunca buhar distilasyonu yapılarak iki yöntem karşılaştırılmıştır. Özüt bileşenlerinin analizi GC-MS cihazı ile yapılmıştır. Buna göre 100 bar ile yapılan çalışmada elde edilen esansiyel yağ içeriğinin buhar distilasyonu ile hemen hemen aynı olduğu (α -pinene, sabinene, myrcene, limonene, β -elemene, β -cubebene, γ -elemene, germacrene D, δ -cadinene), basıncın artırıldığı çalışmalarda molekül ağırlığı daha fazla olan maddelerin ekstraksiyon miktarının arttığı görülmüş. Bunda artan basıncın çözünürlüğü artırmasına ek olarak hücre içine daha iyi nüfus etmesinin etkisinin olduğu belirtilmiştir.

3.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ile Yapılan Çalışmalar

Ruan ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada çin porsuğu (*Taxus chinensis*) bitkisinden amentoflavon, kuersetin ve ginkgetinin SK-CO₂ ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Özütleme süresi, sıcaklık, basınç ve kosolvent olarak etanol konsantrasyonu YCM ile optimize edilecek parametreler olarak belirlenmiştir. Merkezi Kompozit Tasarımın (MKT) uygulandığı modelde dört parametre için beş seviye belirlenmiştir. Ekstraktların kalitatif ve kantitatif analizi UPLC (Ultra Performans Sıvı Kromatografi) cihazı ile yapılmıştır. Buna göre 4,47 mg/g amentoflavon için optimum çalışma şartları 48°C sıcaklık, 24 MPa basınç, 2,02 saat özütleme süresi ve % 78,5 etanol olarak bulunmuştur. 3,73 mg/g kuersetin için optimum çalışma şartları 46°C sıcaklık, 24 MPa basınç, 2,3 saat özütleme süresi ve % 82 etanol konsantrasyonu olarak bulunmuştur. 3,47 mg/g ginkgetin için optimum çalışma şartları 48°C sıcaklık, 20 MPa basınç, 2,38 saat özütleme süresi ve %82 etanol

konsantrasyonu olarak bulunmuştur. Oluşturulan model doğrultusunda kuarsetin kazanımına özütlenme süresi, sıcaklık ve basıncın pozitif etkisi görülürken etanol konsantrasyonunun negatif etkisi görülmüştür. Ayrıca metanol ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonu ile etanol ile modifiye edilmiş SK-CO₂ ekstraksiyonunun karşılaştırması yapılmıştır. Buna göre süperkritik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen özütlerin içerisinde amentoflavon, kuarsetin ve ginkgetinin miktarının Soxhlet'e göre daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Bimacr ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmada kıvrıcık nane yapraklarından (*Mentha spicata* L.) biyoaktif flavonoidlerin SK-CO₂ ekstraksiyonu ve YCM ile optimizasyonu yapılmıştır. Basınç (100, 200, 300 bar), sıcaklık (40, 50, 60 °C) ve etanol kosolvent miktarını (3, 6 ve 9 g/min) optimize etmek için yüz-merkezli kompozit tasarım kullanılmıştır. Deneyler 15 g/min CO₂ akış hızında ve 30 dakika statik, 60 dakika dinamik özütlenme süresinde gerçekleştirilmiştir. Maksimum biyoaktif flavonoid veriminin elde edildiği optimal koşullar 209,39 bar basınç, 50 °C sıcaklık ve 7,39 g/min kosolvent akışı olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktın HPLC analizi yapılmıştır. Ekstakt içerisinde yer alan 7 ana biyoaktif flavonoid kateşin, epikateşin, rutin, luteolin, myrisetin, apigenin ve naringenin olarak tanımlanmıştır. Optimum koşulda özütlenen apigenin miktarı 0,459 mg/g olarak bulunmuştur. Artan kosolvent miktarının belli bir değere kadar özütlenme verimini artırdığı ancak fazlasının önemli bir iyileştirme sağlamadığı görülmüştür. Basınç için optimal bir değer olduğunu ve bu değer altında veya üstünde özütlenme veriminin azaldığı görülmüştür. Sabit sıcaklıkta artan basıncın süperkritik CO₂ yoğunluğunu ve çözme gücünü arttırdığı belirtilmiştir. Artan yoğunluk moleküller arası uzaklığın azalmasını böylece analit ile karbondioksit arasındaki artan etkileşim sayesinde çözünürlüğün de artmasını sağlamıştır. Basınç optimal değerinin üzerine çıktığında ise süperkritik ortamla ilgili olarak çözünenlerin difüzyon hızlarının azalmasına ve düşük ekstraksiyon verimine neden olmuştur. 50 °C'e kadar artan sıcaklığın ekstraksiyon verimini artırdığı ancak daha yüksek sıcaklıklarda flavonoidlerin termokararsızlığı nedeniyle verimin düştüğü belirtilmiştir.

Ghoreishi, Hedayati ve Mousavi (2016a) tarafından yapılan çalışmada Yağ/Isparta gülü (*Rosa damascena* Mill) bitkisinden SK-CO₂ ekstraksiyonu ile kuarsetin özütlenmiştir. Ekstraksiyon sisteminin modellenmesinde yapay sinir ağı (ANN) ve adaptif nöro bulanık arayüz sistemleri (ANFIS) kullanılmış, optimizasyonu ise Mini Tab 17 yazılımı kullanılarak

YCM ile yapmıştır. Bitkinin içerisinde yer alan toplam kuersetin bileşiği etanol çözücüsü kullanarak Soxhlet ile özütlenmiş ve HPLC analizi ile miktarı tayin edilmiştir. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu 1 ml sabit hacimde etanol kosolventi varlığında ve 0,674 mm partikül boyundaki bitkilerde yapılmıştır. Optimize edilecek parametreler çalışma sıcaklığı (35-55 °C), basıncı (10-30 MPa), özütleme süresi (40-120 min) ve CO₂ akış hızı (0,3-1,5 ml/min) olarak belirlenmiştir. Merkezi kompozit tasarım kullanılarak çalışma sistematığı belirlenmiştir. % 32'lik maksimum kuersetin kazanımının elde edildiği optimal çalışma koşullarını 25,5 MPa basınç, 46,3 °C sıcaklık, 0,7 ml/min CO₂ akış hızı ve 120 dakika olarak belirlenmiştir. Kuersetin kazanımında lineer terimlerden basınç ve özütleme süresinin yüksek derecede önemli, CO₂ akış hızı ve sıcaklığın ise önemli terimler olduğu bulunmuştur. Sıcaklık - basınç ikili etkileşimi ve sıcaklık - CO₂ akış hızı ikili etkileşimlerinin modelde yer alacak kadar anlamlı terimler olduğu bulunmuştur.

Li, Xu, Jin, Wu ve Tu (2010) tarafından yapılan çalışmada çay tohumu kekinden süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile kemferol glikozitleri özütlenmiş ve çalışma parametrelerinin verime olan etkisi incelenmiştir. İncelen çalışma parametreleri özütleme süresi (30-150 min), basınç (15-45 MPa), sıcaklık (40-80 °C) ve kosolvent olarak etanolün oranıdır (%50-90). 0,8 mm partikül boyutuna sahip 25 g numune, 2 L/min sabit CO₂ ve 0,5 ml/min sabit etanol akış hızında süperkritik ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Çalışma parametrelerinin optimizasyonu Design Expert 12 programı kullanılarak YCM ile yapılmıştır. Deneysel çalışma sistematığı küçük ölçekli merkezi kompozit tasarım ile belirlenmiştir. Özütlerin içerisinde yer alan kemferol glikozitlerinin tayini HPLC cihazı ile yapılmıştır. Buna göre özüt süresi arttıkça kemferol glikozitlerinin veriminin arttığı, tersine basınç arttıkça azaldığı görülmüştür. Ayrıca artan sıcaklığın kemferol verimini artırıcı etkisi görülmüştür. Kosolvent olarak kullanılan etanolün oranının ise %60-70 aralığında olması gerektiği görülmüştür. Buna optimum çalışma koşulları 150 min özütleme süresi, 20 MPa basınç, 80 °C sıcaklık ve %60'lık etanol çözeltisidir. Bu şartlarda çalışıldığında 11,4 mg/g kemferol glikoziti özütlenmiştir.

Uquiche, Toro ve Quevedo (2019) tarafından yapılan çalışmada *Leptocarpa rivularis* bitkisinin etanol kosolventi varlığında SK-CO₂ ekstraksiyonunu yapılmıştır. Çalışmada Box-Behnken tasarımı kullanarak sıcaklık (40-60 °C), basınç (10-20 MPa) ve kosolvent konsantrasyonu (ağırlıkça % 0-2) parametrelerinin ekstraksiyon işlemine etkisi araştırılmıştır. UV-vis spektrofotometre kullanarak kuersetin eşdeğeri cinsinden (mg

kg/g) toplam flavonoid içeriği hesaplanmıştır. HPLC-DAD cihazı ile kuersetin, kemferol ve resveratrol miktarları, GC-FID cihazı ile α -thujone, β -kariofilen ve kariofilen oksit miktarları bulunmuştur. Ekstraktın antioksidan aktivitesi DPPH radikal giderme metodu, demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemi ve β -karoten ağartma (BCB) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Ekstraksiyon verim aralığı 14,7 – 53,1 g/kg kuru bitki olarak bulunmuş, en yüksek verim 60°C, 20 MPa ve %2 etanol şartlarında çalışıldığında alınmıştır. Bu şartlarda çalışıldığında özütteki kuersetin miktarı 0,098 mg/g kemferol miktarı ise 0,166 mg/g olarak bulunmuştur. Basınç ve kosolvent konsantrasyonunun özüt kazanımında önemli etkisi olduğu görülmüş ayrıca kanonik analiz yapılarak çalışma aralığında yer almayan daha yüksek basınç ve kosolvent konsantrasyonlarında daha fazla yağ elde edileceği belirtilmiştir. Özütlerde varlığı tespit edilen biyoaktif bileşenler flavonoidlerden kuersetin, kemferol ve resveratrol; terpenlerden α -thujone, β -kariofilen ve kariofilen oksittir. Ekstraktın antioksidan aktivite gösterdiği ve şeker hastalığı (α -amilaz ve α -glukozidaz) ile bağlantılı anahtar enzimlerin inhibisyonunu sağladığı gösterilmiştir.

Çelik ve Gürü (2015) tarafından yapılan çalışmada deve dikenini tohumlarından SK-CO₂ ile yağ ve silibin bileşikleri (silibin A ve silibin B) özütlenmiştir. Özütlenme koşullarının yağ, silibin A ve silibin B bileşikleri miktarına etkisi incelenmiştir. İncelenen parametreler sıcaklık (40-80 °C), basınç (160-260 bar), CO₂ akış hızı (3, 4, 5 ml/min) ve partikül boyutu (0,3025, 0,925 ve 1,2 mm) olarak belirlenmiş özütlenme süresi 120 dakikada sabit tutulmuştur. Optimal koşullarının 40 °C sıcaklık, 180 bar basınç, 4 ml/min CO₂ akış hızı ve 0,3025 mm partikül boyutu olduğu görülmüştür. Özütteki silibin A ve silibin B bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif analizi HPLC cihazı ile yapılmıştır. Yağ asitleri içeriğini analiz etmek için GC-FID kullanılmıştır. Optimum koşullarda çalışıldığında özütteki silibin A miktarı 2,29 mg/g, silibin B miktarı 1,92 mg/g ve yağ miktarı 327 mg/g olarak belirlenmiştir.

Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile yapılan diğer çalışmalar Çizelge 3.1'de özet olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile yapılmış diğer çalışmalar

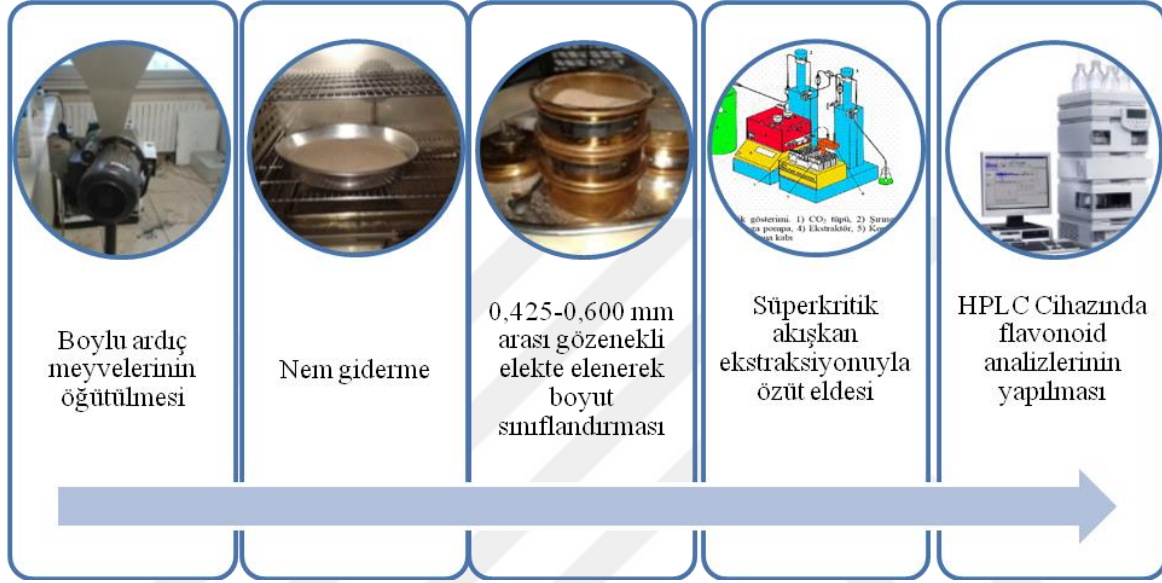
Araştırılan Bitki	Araştırmacı	Özütleme ve analiz yöntemleri, bağımsız değişkenler	Deneysel Tasarım Metodu	Optimal şartlar	Bağımlı değişkenler, bulgular
Şeftali (<i>Prunus persica</i>)	Ekinci, Gürü (2014)	SK-CO ₂ , GC-MS Sıcaklık: 35-55°C Basınç: 160-240 bar CO ₂ akış hızı: 4-8 ml/min Tanecik boyutu: 0,3-1,7 mm Özütleme süresi: 1-4 h	Tek seferde tek faktör (OFAT)	T: 40°C P: 200 bar Q: 7 ml/min D: 0,3 mm t: 3 h	Yağ: 35,3 g/100 g tohum B-sitosterol: 1220 mg/kg tohum
İğde çekirdeği	Nuralın, Tosun, Erol, Akgün ve Gürü (2017)	SK-CO ₂ , HPLC Tanecik boyutu: 0,5-1 mm Özütleme süresi: 30-120 min Sıcaklık: 33-65°C Basınç: 99-311 bar	OFAT YCM-Merkezi Kompozit Tasarım (MKT)	T: 65°C P: 311 bar Q: 5 L/min D: 0,5 mm t: 120 min	Kuersetin: 9,44 µg/100 g numune
Karaçam (<i>Pinus nigra</i>)	Ghoreishi, Hedayati ve Mohammadi (2016)	SK-CO ₂ + Etanol, Soxhlet, HPLC Sıcaklık: 40-60°C Basınç: 100-300 bar CO ₂ akış hızı: 0,4-2 ml/min Özütleme süresi: 30-150 min	YCM-MKT	T: 42,8°C P: 193 bar Q: 1,9 ml/min t: 137,9 min	Taksifolin: % 34,13 (0,32 mg/g)
Ayçiçeği tohumu	Rai, Mohanty ve Bhargava (2016)	SK-CO ₂ + Etanol, Soxhlet, GC-FID Sıcaklık: 60-100°C Basınç: 200-300 bar CO ₂ akış hızı: 5-15 g/min Partikül Boyutu: 0,5-1 mm % Kosolvent: 0-10	YCM-Küçük Yüz Merkezi MKT	T: 80°C P: 345 bar Q: 10,5 g/min D: 1 mm Kosolvent: % 7,58	Yağ: % 54,37

Çizelge 3.1. (devam) Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile yapılmış diğer çalışmalar

Araştırılan Bitki	Araştırmacı	Özütleme ve analiz yöntemleri, bağımsız değişkenler	Deneysel Tasarım Metodu	Optimal şartlar	Bağımlı değişkenler, bulgular
Moringa Oleifera çekirdeği	Nguyen ve diğerleri (2011)	SK-CO ₂ + Etanol, Soxhlet, GC Sıcaklık: 35-60 °C Basınç: 150-300 bar Partikül Boyutu: 0,16-1,12 mm	YCM-Yüz- Merkezli-MKT	T: 44,3 °C P: 289,7 bar D: 0,54 mm Q: 0,5 m ³ /min Kosolvent: %10	Yağ: %37,85
Kalahari kavunu çekirdeği	Nyam, Tan, Lai, Long ve Man (2011)	SK-CO ₂ , Soxhlet, GC-FID Sıcaklık: 40-80 °C Basınç: 200-400 bar CO ₂ akış hızı: 10-20 ml/min	YCM-Yüz- Merkezli-MKT	T: 40 °C P: 300 bar Q: 12 ml/min t: 3 h	Yağ: %76,3 Fitosterol: 836,5 mg/100 g
Propolis	De Zordi ve diğerleri (2014)	SK-CO ₂ , Ultrason Ekstraksiyonu, HPLC-MS, HPLC-DAD Sıcaklık: 31,6-48,4 °C Basınç: 82,3-317,7 bar Özütleme Süresi: 1,5-6,5 h	YCM-MKT	T: 40 °C P: 317 bar t: 4 h	Yağ: %8,5 Fenolikler: %50
Engerek otu tohumu (Echium vulgare)	Bilgiç Keleş, Şahin, Yeşilçubuk, Barla-Demirköz ve Karakaş (2019)	SK-CO ₂ , GC-FID Sıcaklık: 30, 50, 70 °C Basınç: 200, 300, 400 bar	YCM-Yüz- Merkezli-MKT	T: 62 °C P: 400 bar Q: 3 kg/h t: 120 min D: 0,425-0,85 mm	Yağ: %14,4

4. MATERYAL VE METOT

Boylu ardıç meyvelerinden ilaç etken maddesi eldesi ve analizine yönelik yürütülen deneysel çalışma beş temel aşamadan oluşmaktadır. Şekil 4.1’de bu aşamalar sırasıyla gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Deneysel çalışma aşamaları

4.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada materyal olarak kullanılan Boylu Ardıç (*Juniperus excelsa*) meyveleri Isparta/Senirkent/Akkeçili köyü yamaçlarından toplanmıştır.

HPLC analizinde standart madde olarak kullanılan kuersetin (\geq %95 saflıkta), apigenin, taksifolin ve silibinin Sigma-Aldrich firmasından kemferol ise Caymon Chemical firmasından temin edilmiştir. Mobil faz olarak kullanılan asetonitril (\geq %99,9 saflıkta) ve mobil faz katkısı olarak kullanılan analitik saflıktaki formik asit Carlo Erba firmasından temin edilmiştir.

Süperkritik ekstraksiyon işleminde kullanılan sifonlu tüpteki karbondioksit Oksan firmasından, yardımcı çözücü olarak kullanılan etanol (\geq %99,9 saflıkta) Merck firmasından temin edilmiştir.

Yıkama ve analiz işlemlerinde kullanılan bidestile saf su SGE firmasına ait ters ozmos deiyonize saf su cihazından elde edilmiştir.

4.2. Kullanılan Cihazlar

Boylu Ardiç meyveleri Resim 4.1'de gösterilen Retsch marka bitki değirmeninde öğütülmüştür. Öğütülen numune içerisindeki nemi uzaklaştırmak için Ele marka etüv kullanılmıştır. Numuneler etüvde 1 gün boyunca 30°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Kurutulan numuneler daha küçük boyutlara inebilmek için BOSCH MKM6000 marka kahve değirmeninde tekrar öğütülmüş ve istenen boyutlara inmesi sağlanmıştır.



Resim 4.1. Retsch marka öğütücü

Ardından elek seti kullanılarak numunelerin 0,425 – 0,600 mm boyut aralığında sınıflandırması yapılmıştır. Bu aralıkta kalan numuneler SK-CO₂ özütlemesinde kullanılmıştır.

Özütleme işlemleri Resim 4.2’de gösterilen laboratuvar ölçekli Amerikan Applied Separations marka süperkritik ekstraksiyon cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihaz fırın ve pompa ünitesi olmak üzere iki ana kısımdan oluşmaktadır.

Ekstraksiyon için gerekli akışkan kaynağı sifonlu karbondioksit tüpünden, akışkanın basınçlandırılması için gerekli hava ise kompresörden sağlanmıştır. Deney düzeneğinde ayrıca basınçlı havanın pompalanması esnasında oluşan ısının uzaklaştırılması için devir daim banyo sistemi ve kosolventi sisteme beslemek üzere modifiye pompa bulunmaktadır.

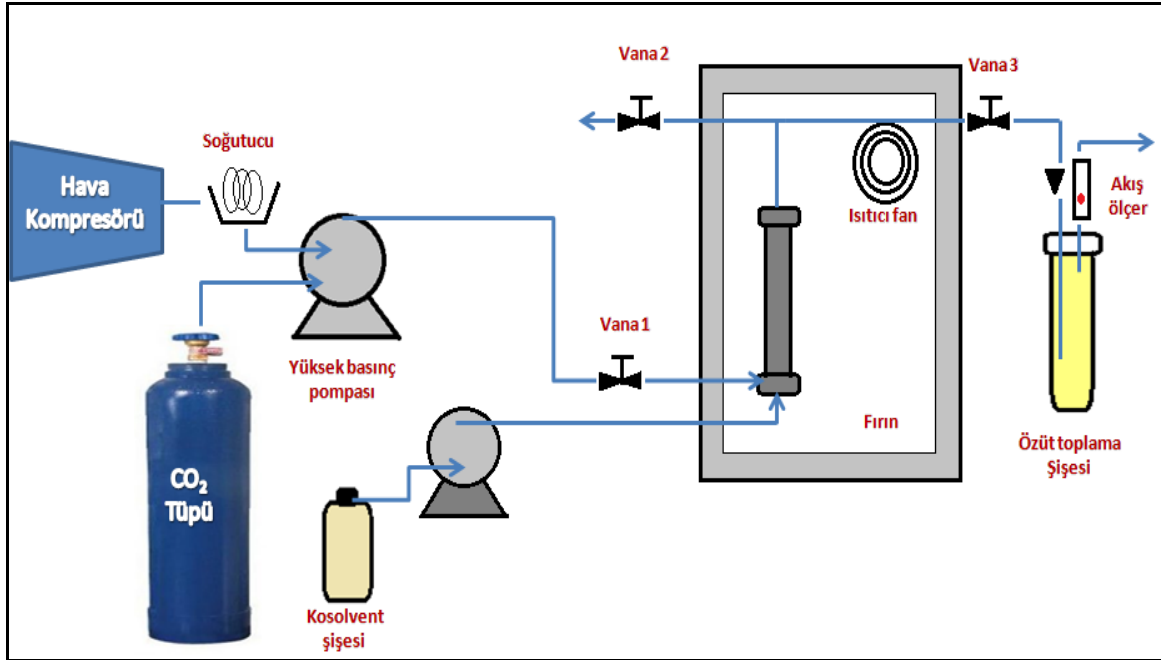


Resim 4.2. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon cihazı ve deney düzeneği

Özütleme prosesini Şekil 4.2.’de verilen akım şeması üzerinden anlatımı şöyledir:

- 0,425 – 0,600 mm aralığında boyutlandırılmış 5 g numune 24 ml’lik hacme sahip, silindirik, paslanmaz çelik hazne içerisine cam yünü yardımıyla yerleştirilmiştir.
- Ekstraksiyon işlemi süresince haznedeki sızıntı olmasını önlemek amacıyla, alt ve üst kapaklar sıcaklık ve basınca dayanıklı contalar ile sıkıca kapatılmıştır.
- Numune ile doldurulmuş hazne, fırın ünitesine bağlantı elemanları yardımıyla yerleştirilmiştir.
- Fırın, çalışılmak istenen sıcaklık değerine ayarlanarak ısıtılmıştır.

- Pompa yardımıyla basınçlandırılan karbondioksit, giriş vanası (V_1) açılarak özütleme fırınına gönderilmiştir.
- Ardından belirlenen miktarda etanol beslemesini sisteme yapacak şekilde kosolvent pompası akış hızı ayarlanmış ve çalıştırılmıştır.
- Çalışılmak istenen basınç değerine ulaşıldıktan sonra çıkış vanası (V_3) açılmış ve CO_2 hızı deney süresince akış ölçer yardımıyla sabit tutulmuştur.
- Özütler 40 ml hacimli silikon kapaklı şişelerde toplanmıştır.
- Deney bittikten sonra V_1 ve V_3 vanaları kapatılmıştır. Son olarak boşaltma vanası (V_2) açılıp sistemde kalan CO_2 'in uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 4.2. Süperkritik karbondioksit özütleme prosesinin akış diyagramı

Ekstraksiyon işlemi sonrası özüt toplama şişesinde biriken yoğun kıvamlı yağları HPLC analizine hazır hale getirmek için etanol eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Deney tüpüne aktarılan etanol ve yağ karışımındaki asılı partiküllerin HPLC kolonunda kirlilik ve tıkanma yaratmaması için Hettich Eba marka masaüstü santrifüj cihazı kullanılmıştır. Böylece asılı partiküller çöktürülmüş ve berrak bir karışım elde edilmiştir.

Özütlenen yağ içerisindeki ilaç etken maddelerinin kalitatif ve kantitatif analizi için Resim 4.3'te gösterilen Amerikan Dionex marka 680 model UVD 170U dedektörlü HPLC cihazı ve cihaza takılı ODS 3V C18 (4,6 mm x 15 cm 5 μ m) İntersil marka kolon kullanılmıştır.

Ekstraksiyon sonucu elde edilen berrak karışım, HPLC cihazına manual enjeksiyon portu ve Hamilton Microliter 710 marka 100 µl'lik enjeksiyon haznesi kullanılarak verilmiştir.



Resim 4.3. HPLC cihazı

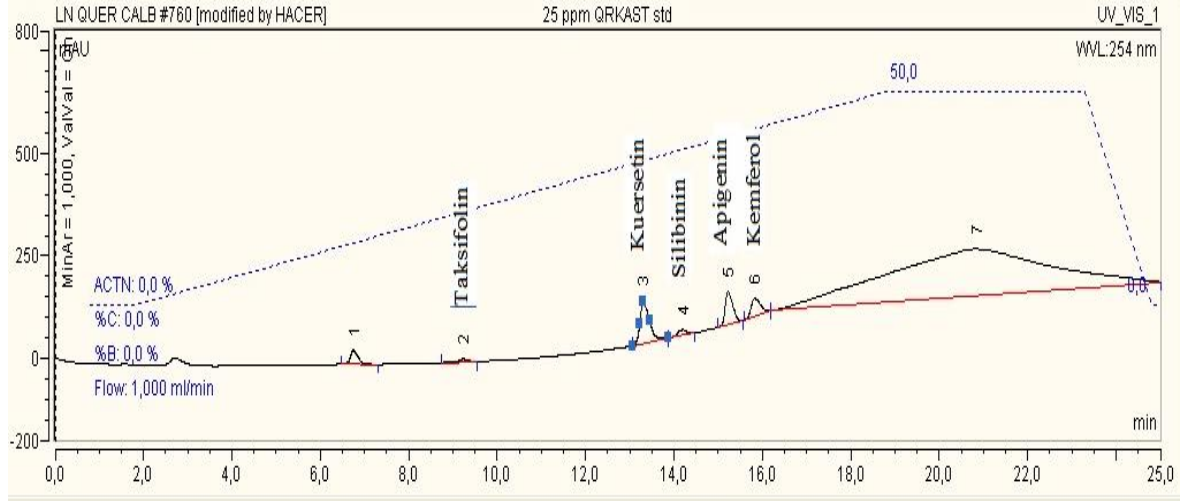
Analizde kullanılan hareketli faz A % 0,1 oranında formik asit, % 80 oranda bidestile saf su, % 20 oranda asetonitril içermektedir. B fazı için %100 asetonitril içeren karışım kullanılmıştır. Gradient çalışma programının detayları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Gradient çalışma programı

Gradient çalışma programı		
A çözücüsü	%0,1 formik asit, %80 bidestile saf su, %20 asetonitril	
B çözücüsü	%100 asetonitril	
Akış hızı	1 ml/min	
Gradient	t: 0 dakika	%100 A
	t: 18 - 22,5 dakika	%50 A - %50 B
	t: 25 dakika	%100 A
Dalga Boyu	254 nm ve 335 nm	
Kolon	4,6 mm x 15 cm boyutlarında ODS 3V C18 5 µm	

Özütlerin analizine başlamadan önce kuersetin, apigenin, taksifolin, silibinin ve kemferol standartlarının tanıtılması için 10ppm, 12,5ppm, 20ppm, 25ppm, 50ppm

konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlanmıştır ve her standart madde için kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Çizilen kalibrasyon eğrileri ekler kısmında verilmiştir. Resim 4.4'te 25 ppm'lik standart madde içeren çözeltinin HPLC kromatogramı verilmiştir.



Resim 4.4. 25 ppm'lik standart madde içeren çözeltinin HPLC kromatogramı

Her numunenin HPLC analizi iki kere yapılmış ve içeriğinde bulunan ilaç etken maddesinin alan hesabında iki analize ait sonuçların ortalaması alınmıştır. Konsantrasyonları ise kalibrasyon çalışmasından elde edilen katsayılar kullanılarak hesaplanmıştır.

Özütlerin kromatogram okumaları yapılırken apigenine ait piklerin 254 nm'de iç içe geçmiş ve kuyruklaşmış olduğu görülmüştür. Bu sebeple farklı dalga boyları incelenerek 335 nm'de apigenine ait piklerin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Apigenin okumalarının 335 nm'de yapılmasına karar verilmiş ve standardına ait kalibrasyon eğrisi 335 nm'ye göre tekrar çizilmiştir.

4.3. Çalışma Parametreleri ve Deneysel Tasarım Yöntemi

Bu tez çalışması kapsamında *Juniperus excelsa* (Boylu ardıç) meyvelerinden kuersetin, apigenin, kempferol, silibinin ve taksifolin ilaç etken maddelerinin miktarını maksimize eden SK-CO₂ ekstraksiyonu optimum çalışma şartlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda optimize edilecek bağımsız parametreler sıcaklık, basınç, özütlenme süresi ve süperkritik CO₂ akış hızı olarak belirlenmiştir. Deneyler boyunca partikül boyutu 0,425 –

0,600 mm arasında ve etanol kosolventinin CO₂ akışındaki kütlece oranı %2'de sabit tutulmuştur. Literatür araştırması sonucu bağımsız parametrelerin çalışma aralıkları ise aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

- Sıcaklık: 40 - 70°C
- Basınç: 130 – 230 bar
- Özütleme süresi: 30 – 150 dakika
- CO₂ akış hızı: 3 -7 L/min

Her bir ilaç etken maddesinin miktarını maksimize eden optimum çalışma koşullarının belirlenmesi, çalışma koşullarının birbiriyle ilişkisinin incelenmesi ve ilaç etken madde miktarı için matematiksel modelinin oluşturulmasında yüzey cevap metodu kullanılmıştır. Deneysel çalışma algoritmasının oluşturulmasında ise Yüz-Merkezli Merkezi Kompozit Tasarım (YM-MKT) kullanılmıştır.



5. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

5.1. Yüzey Cevap Metodu Kullanılarak Yapılan Deney Tasarımı

Tek seferde tek değişkenli metot gibi geleneksel optimizasyon teknikleri fazla sayıda deney gerektirmesi nedeniyle deney sürelerinin ve malzeme sarfiyatının artışına neden olmakta ayrıca işletme parametrelerinin birbiriyle olan ilişkisini incelemede yetersiz kalmaktadırlar (Ghoreishi ve diğerleri, 2016b). Bu olumsuzlukların üstesinden gelebilmek için optimizasyon tekniği olarak yüzey cevap metodu kullanılmıştır.

Çizelge 5.1'de Design Expert 12 programı tarafından Yüz-merkezli (Face-centered) Merkezi Kompozit Tasarım uygulanarak 4 bağımsız değişkene ait (sıcaklık, basınç, özütleme süresi ve SK-CO₂ akış hızı) kodlanmış düzeyler verilmiştir.

Çizelge 5.1. Bağımsız değişkenler ve kodlanmış düzeyleri

Faktör	Bağımsız değişken	Birim	Min. Değer	Max. Değer	Düşük Kod	Yüksek Kod	Orta Değer
A	Sıcaklık	°C	40	70	-1 ↔ 40,00	+1 ↔ 70,00	0 ↔ 55,00
B	Basınç	bar	130	230	-1 ↔ 130,00	+1 ↔ 230,00	0 ↔ 180,00
C	Özütleme Süresi	min	30	150	-1 ↔ 30,00	+1 ↔ 150,00	0 ↔ 90,00
D	CO ₂ akış hızı	L/min	3	7	-1 ↔ 3,00	+1 ↔ 7,00	0 ↔ 5,00

Belirlenen bu şartlarda SK-CO₂ ekstraksiyon deneyleri yapıldıktan sonra elde edilen özütlelerin HPLC analizleri yapılmıştır. HPLC analizleri sonucu her bir özütlede bulunan kuersetin, apigenin, kempferol, silibinin ve taksifolin ilaç etken maddelerinin miktarları Design Expert 12 programına yanıt fonksiyonu (bağımlı değişkeni) olarak girilmiştir. Ardından program tarafından önerilen ve sonuçların uyumluluk gösterdiği modellerin varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır.

Kübün merkez noktasında 5, eksenel noktalarda 8, faktör noktalarında 8 olmak üzere toplamda 21 deney için belirlenen çalışma şartları Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Yüz-merkezli kompozit tasarım deneysel çalışma algoritması

Deney No	A	B	C	D	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)	CO ₂ akış hızı (L/min)
1	0	0	0	0	55	180	90	5
2	0	0	0	- 1	55	180	90	3
3	0	+ 1	0	0	55	230	90	5
4	+ 1	- 1	- 1	+ 1	70	130	30	7
5	- 1	- 1	+ 1	- 1	40	130	150	3
6	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	40	230	150	7
7	- 1	+ 1	- 1	+ 1	40	230	30	7
8	0	0	- 1	0	55	180	30	5
9	0	0	0	0	55	180	90	5
10	0	0	0	0	55	180	90	5
11	- 1	- 1	- 1	- 1	40	130	30	3
12	0	0	0	0	55	180	90	5
13	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	70	230	150	3
14	- 1	0	0	0	40	180	90	5
15	0	- 1	0	0	55	130	90	5
16	+ 1	0	0	0	70	180	90	5
17	+ 1	+ 1	- 1	- 1	70	230	30	3
18	0	0	+ 1	0	55	180	150	5
19	0	0	0	+ 1	55	180	90	7
20	0	0	0	0	55	180	90	5
21	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	70	130	150	7

Üretilen modellerin istatistiksel önemini gösteren ANOVA analizinde regresyon katsayısı ve p değerleri dikkate alınır. Buna göre modeldeki terimlere ait p değerlerinin 0,05’den düşük olması bu terimlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu, 0,1’den büyük olması ise anlamsız olduğunu gösterir. Regresyon katsayısı ise yanıt fonksiyonunda gözlenen ve model tarafından tahmin edilen değişimlerin arasındaki ilişkiyi gösterir. Regresyon katsayısı 1’e ne kadar yakın olursa üretilen model o kadar kabul edilebilir demektir.

5.2. Kuersetin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi

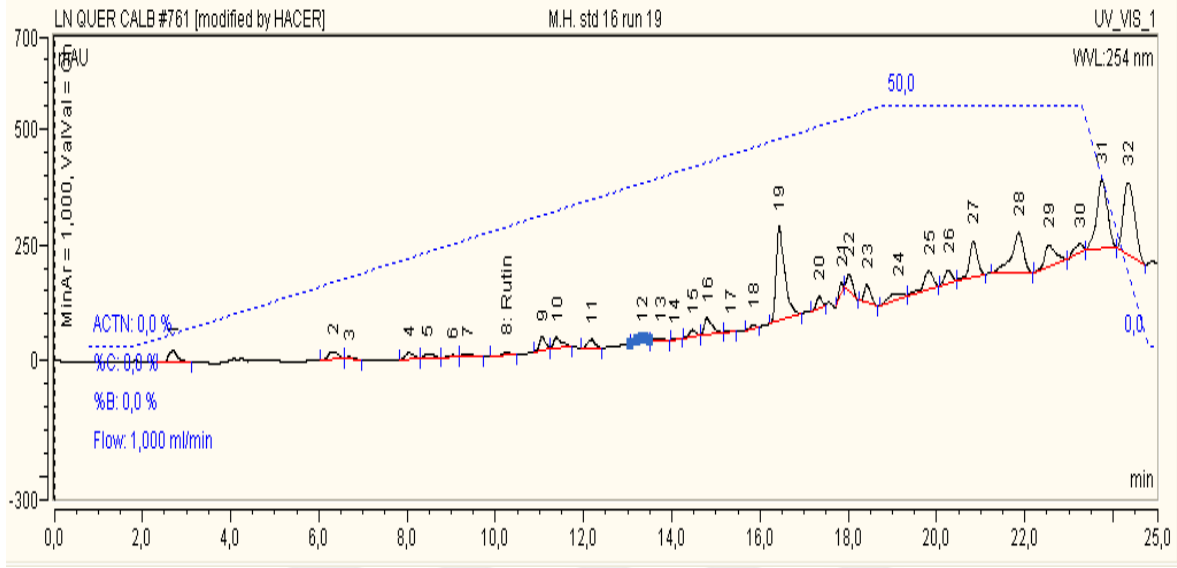
Çizelge 5.3'de boylu ardiç bitkisinin SK-CO₂ ekstraksiyonları sonucu elde edilen özütlerdeki kuersetin miktarları ve her bir deneyin çalışma şartı verilmiştir.

Çizelge 5.3. Deneysel çalışma sonucu bulunan kuersetin miktarları

Deney No	A	B	C	D	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)	CO ₂ Akış hızı (L/min)	Kuersetin (µg/g)
1	0	0	0	0	55	180	90	5	1,046
2	0	0	0	- 1	55	180	90	3	1,013
3	0	+ 1	0	0	55	230	90	5	0,689
4	+ 1	- 1	- 1	+ 1	70	130	30	7	0,096
5	- 1	- 1	+ 1	- 1	40	130	150	3	0,781
6	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	40	230	150	7	0,598
7	- 1	+ 1	- 1	+ 1	40	230	30	7	0,398
8	0	0	- 1	0	55	180	30	5	0,378
9	0	0	0	0	55	180	90	5	1,091
10	0	0	0	0	55	180	90	5	1,054
11	- 1	- 1	- 1	- 1	40	130	30	3	0,463
12	0	0	0	0	55	180	90	5	0,641
13	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	70	230	150	3	0,420
14	- 1	0	0	0	40	180	90	5	0,163
15	0	- 1	0	0	55	130	90	5	0,744
16	+ 1	0	0	0	70	180	90	5	0,373
17	+ 1	+ 1	- 1	- 1	70	230	30	3	0,422
18	0	0	+ 1	0	55	180	150	5	0,423
19	0	0	0	+ 1	55	180	90	7	1,777
20	0	0	0	0	55	180	90	5	0,892
21	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	70	130	150	7	0,429

Çizelge 5.3 incelendiğinde en yüksek kuersetin miktarına A: 55°C, B: 180 bar, C: 90 min ve D: 7 L/min şartlarında çalışılan 19. deneyde ulaşılmıştır ve bu şartlarda kuersetin miktarı 1,777 µg/g olarak bulunmuştur.

19. deneye ait HPLC kromatogramı Şekil 5.1’de verilmiştir. Program tarafından önerilen ve deneysel verilerin uyumluluk gösterdiği daraltılmış kuadratik modelin varyans analizi sonuçları ise Çizelge 5.4’te verilmiştir.



Şekil 5.1. Kuersetin veriminin yüksek olduğu 19. deneyin HPLC kromatogramı

ANOVA (varyans) analizi sonucuna göre önerilen modelin F ve p değerleri sırasıyla 11,53 ve 0,0001 olarak bulunmuştur. Bu değerler modelin geçerli olduğunu ve gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir F değeri çıkma ihtimalinin % 0,01 olduğunu göstermektedir.

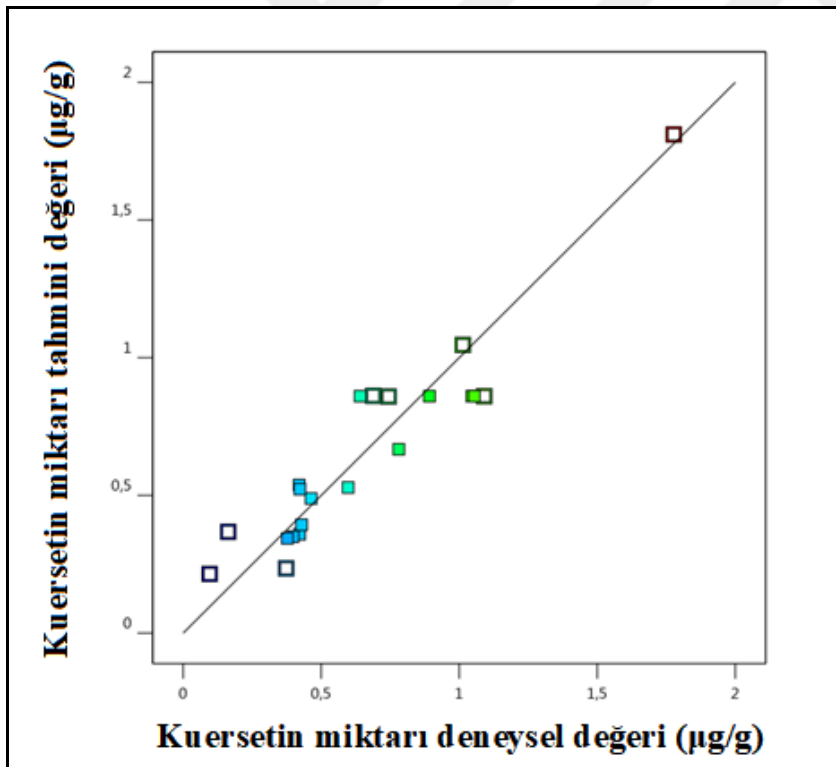
Çizelge 5.4. Kuersetin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	2,66	8	0,3320	11,53	0,0001	Önemli
A- Sıcaklık	0,0439	1	0,0439	1,53	0,2403	
B- Basınç	0,0000	1	0,0000	0,0006	0,9809	
C- Özütleme Süresi	0,0798	1	0,0798	2,77	0,1218	
D- CO ₂ akış hızı	0,2919	1	0,2919	10,14	0,0079	
AB	0,3280	1	0,3280	11,39	0,0055	
A ²	0,8636	1	0,8636	29,99	0,0001	
C ²	0,5039	1	0,5039	17,50	0,0013	
D ²	0,8919	1	0,8919	30,98	0,0001	
Artık	0,3455	12	0,0288			
Uyum Eksikliği	0,2069	8	0,0259	0,7467	0,6649	Önemli değil
Hata	0,1386	4	0,0346			
Toplam	3,00	20				

Hesaplanan uyum eksikliği p değeri ise 0,6649 olarak bulunmuştur. Bu değer model uyumsuzluğunun anlamsız olduğunu göstermektedir.

Modeldeki terimlerden p değeri 0,05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmektedir. Buna göre Program tarafından önerilen modeldeki terimlerin p değerlerini incelediğimizde CO₂ akış hızı (D), sıcaklık-basınç ilişkisi (AB), sıcaklığın karesi (A²), özütleme süresinin karesi (C²) ve CO₂ akış hızı karesinin (D²) kuersetin özütleme miktarını etkileyen önemli parametreler olduğu görülmüştür. P değeri 0,05'den büyük olan terimler anlamsız olduğu için modele dahil edilmemiştir. Sıcaklık, basınç ve özütleme süresinin p değerleri 0,05'den büyük olsa da hiyerarşiyi korumak adına çıkarılmamıştır.

Model tarafından tahmin edilen değerler ile deneysel verilerin ilişkisini gösteren grafik Şekil 5.2.'de verilmiştir.



Şekil 5.2. Kuersetin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerinin ilişkisi

Modelin uygunluğuna karar verirken regresyon katsayısına (R^2) da bakılması gerekir. Bu değer 1'e yaklaştıkça bağımlı değişkenin gerçek (deneysel) değeri ile model tarafından

tahmin edilen değerin uyumlu olduğu yorumu yapılabilir. Kuersetin miktarı için önerilen modelin Regresyon katsayısı 0,88 olarak bulunmuştur.

Kuersetin miktarını sıcaklık, basınç, özütleme süresi ve CO₂ akış hızı parametrelerinin birer fonksiyonu olarak veren modelin eşitliği gerçek ve kodlanmış değerler cinsinden Eş. 5.1 ve Eş. 5.2'de sırasıyla verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Kuersetin } (\mu\text{g/g}) = & +1,06077 + 0,160188*\text{Sıcaklık} - 0,033175*\text{Basınç} + 0,022838 \\ & *Özütleme Süresi - 1,22913*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} + 0,000604*\text{Sıcaklık}*\text{Basınç} - 0,002484 \\ & *Sıcaklık^2 - 0,000119*Özütleme Süresi^2 + 0,142013*\text{CO}_2 \text{ akış hızı}^2 \end{aligned} \quad (5.1)$$

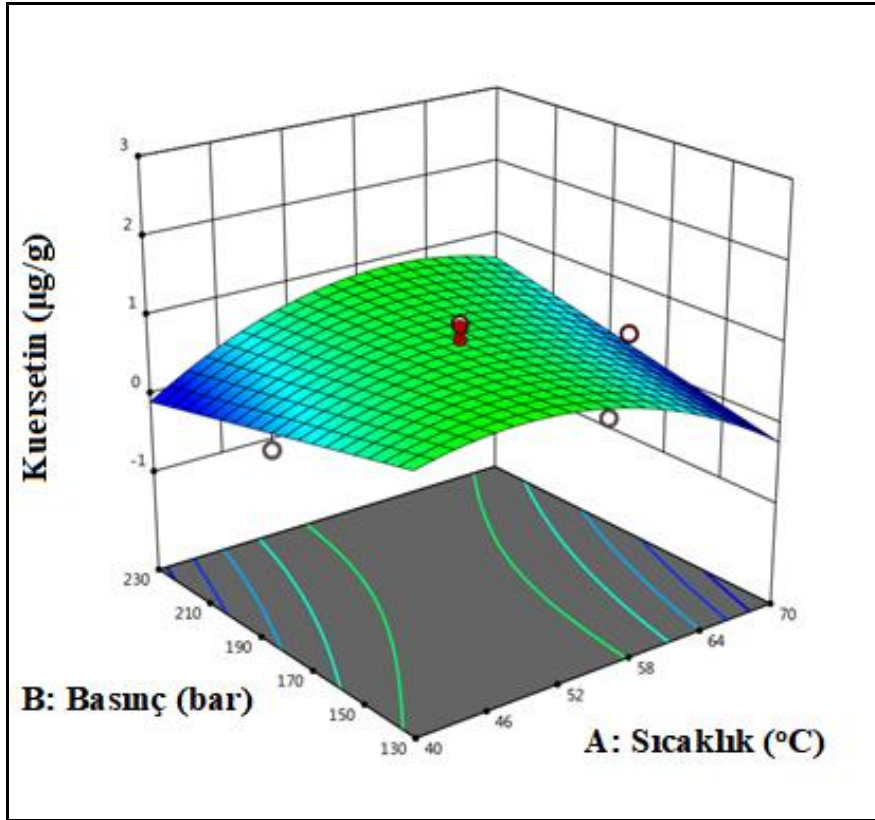
$$\begin{aligned} \text{Kuersetin } (\mu\text{g/g}) = & +0,8605 - 0,0663*A + 0,0013*B + 0,0893*C + 0,3820*D + 0,4527*AB \\ & - 0,5590*A^2 - 0,4270*C^2 + 0,5681*D^2 \end{aligned} \quad (5.2)$$

Kodlanmış faktörleri içeren ikinci denklem, her bir faktörün cevap değişkenine olan etkisini yorumlamak için kullanılabilir. Ayrıca bu denklem faktör katsayılarını karşılaştırıp faktörlerin göreceli etkisini belirlemek için de kullanışlıdır. Buna göre Eş. 5.2 incelendiğinde sıcaklıktaki artışın özütlenen kuersetin miktarını azaltıcı etkisi; basınç, özütleme süresi ve CO₂ akış hızındaki artışın ise artırıcı etkisi olduğu söylenebilir. Sıcaklık – basınç ikili etkileşiminin etkisinin gene özütlenen kuersetin miktarını artırıcı etkisi, sıcaklığın karesinin ve işlem süresinin karesinin ise kuersetin miktarını azaltıcı etkisi, CO₂ akış hızı karesinin ise artırıcı etkisi olmaktadır. İşlem parametrelerinin Eş. 5.2'deki katsayılarını karşılaştırdığımızda CO₂ akış hızındaki değişimin kuersetin miktarını etkileyen en önemli parametre olduğu söylenebilir.

5.2.1. Sıcaklık ve basıncın özütlenen kuersetin miktarına etkisi

Kuersetin için bulunan model ve çalışma parametrelerinin birbiriyle ilişkisi Design Expert 12 programı yardımıyla çizilen yüzey cevap grafikleri ile incelenmiştir. Çizilen üç boyutlu grafiklerin x ve y eksenlerinde bağımsız iki değişken yer alırken z ekseninde ise bağımlı değişkenin (kuersetin özütlenen miktarı) sonucu gösterilmektedir. Grafikte yer almayan diğer iki bağımsız değişkenler ise sıfır düzeyindeki değerlerindedir.

Şekil 5.3'te kuersetin miktarına sıcaklık ve basıncın etkisi görülmektedir. Grafik incelendiğinde düşük basınç değerlerinde çalışırken 55°C'ye kadar artan sıcaklığın kuersetin miktarını artırıcı etkisi olduğu ancak daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığında özütlenen miktarın azaldığı görülmüştür. Bunun sebebinin artan sıcaklıkla SK-CO₂'in yoğunluğunun düşmesi ve çözme gücünün de bu sebeple azalması olabileceği düşünülmektedir. Literatürde Ekinci ve Gürü (2014) tarafından yapılan çalışmada benzer eğilim bildirilmiştir.



Şekil 5.3. Sıcaklık ve basıncın özütlenen kuersetin miktarına etkisi (Özütleme süresi: 90 min, CO₂ akış hızı: 5 L/min)

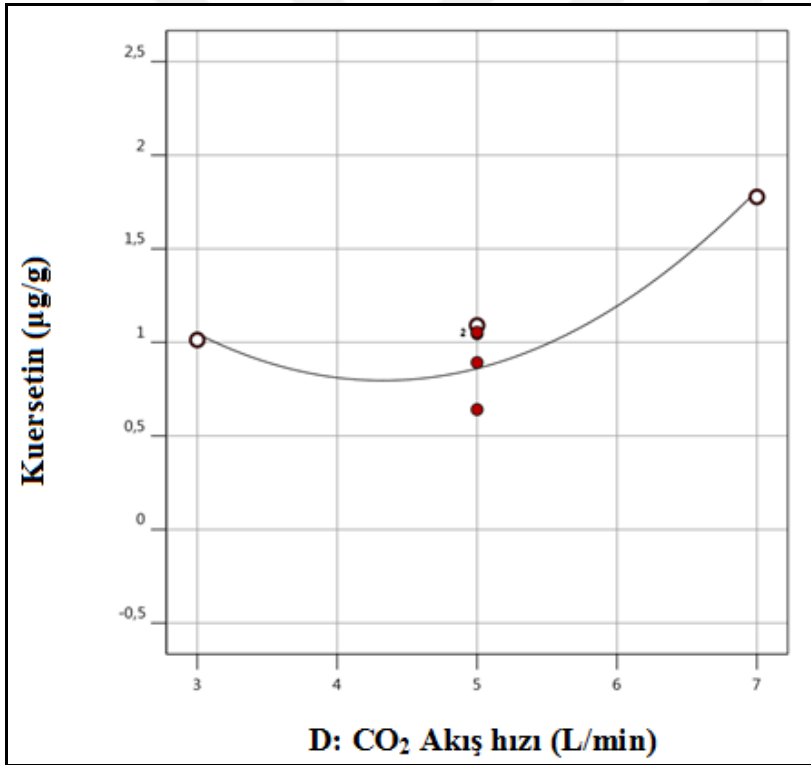
40°C gibi düşük sıcaklık değerlerinde ise basınçtaki artış özütlenen kuersetin miktarının azalmasına sebep olmuş. Yüksek basınç, düşük sıcaklıklardaki azalan özütleme miktarının SK-CO₂ yoğunluğu ile kuersetin buhar basıncı arasındaki çekişmeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu koşullarda kuersetin buhar basıncının düşük olması, SK-CO₂'in yoğunluğundaki artışa baskın geldiği düşünülmektedir.

Ruan ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada sıcaklık ve artan basıncın özütlenen kuersetin miktarını artırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Bunda basınçla artan CO₂

yoğunluğunun ve çözme gücünün etkili olduğu ayrıca yüksek sıcaklığın kuersetin buhar basıncını artırarak çözünmesini kolaylaştırdığı belirtilmiştir.

5.2.2. CO₂ akış hızının özütlenen kuersetin miktarına etkisi

Özütlenen kuersetin miktarına CO₂ akış hızındaki değişimin etkisi Şekil 5.4'te verilmiştir. CO₂ akış hızındaki artış ekstraktör içerisindeki türbülansın artmasına böylece dış film kalınlığının azalmasına neden olmaktadır. Bu durumun sonucunda ise özütlenen miktarda artış görülmektedir (Nuralın, 2018). Şekil 5.4 incelendiğinde CO₂ akış hızının 3 L/min'dan 4,3 L/min'ya çıkması halinde özütlenen kuersetin miktarı azalırken daha yüksek akış hızlarında çalışıldığında özütlenen kuersetin miktarında artış görülmektedir.

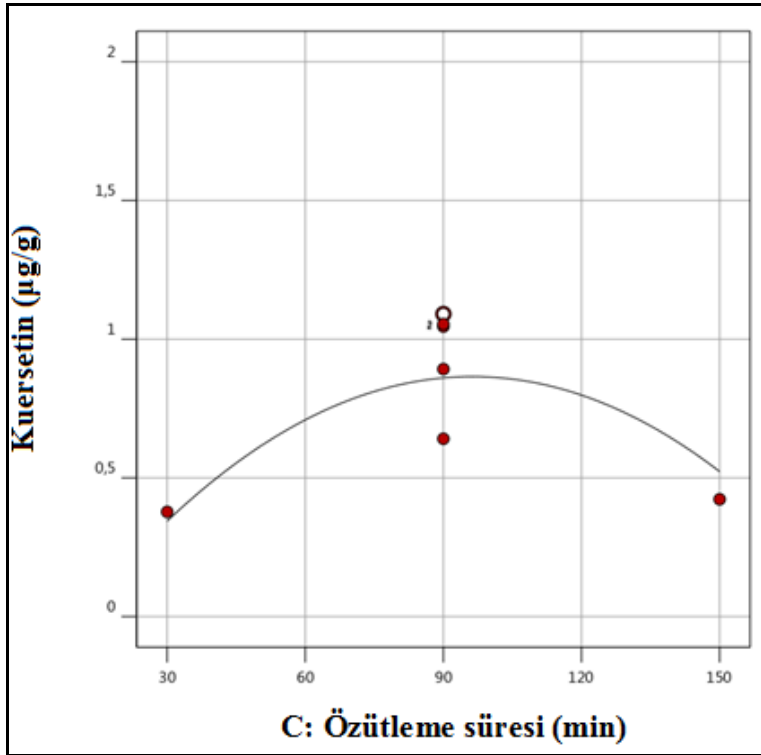


Şekil 5.4. CO₂ akış hızının özütlenen kuersetin miktarına etkisi (Sıcaklık: 55°C, Basınç: 180 bar, Özütleme Süresi: 90 min)

Eş. 5.2'de yer alan model denklemi Şekil 5.4'teki sonucu destekler niteliktedir. Sıcaklık, basınç ve özütleme süresinin sıfır ile kodlandığı seviyelerinde akış hızındaki artışın özütlenen kuersetin miktarına artırıcı etkisi olduğu görülmüştür.

5.2.3. Sürenin özütlenen kuersetin miktarına etkisi

Şekil 5.5 özütleme süresinin kuersetin kazanımı üzerindeki etkilerini göstermektedir. Ekstraksiyon işleminin başlangıcından 90 dakikaya kadar olan süre içerisinde kuersetin kazanımı artış göstermektedir. Ardıç partikülleri ile taze çözücü SK-CO₂ arasında etkili bir kütle transferi olduğu sürece bu artış devam edecektir.



Şekil 5.5. Sürenin özütlenen kuersetin miktarına etkisi (Sıcaklık: 55°C, Basınç: 180 bar, CO₂ akış hızı: 5 L/min)

Kuersetin modeline ait Eş. 5.2 incelendiğinde kuersetin kazanımı üzerinde lineer ekstraksiyon süresinin pozitif etkisi olmaktadır ancak optimum süre sonrası negatif kuadratik etki de önemli hale gelmektedir. Sonuç olarak itici güç ortadan kalktığı için özütlenen kuersetin miktarında daha fazla artış olmaz. Bu noktada difüzyonel ve partikül içi kütle transfer dirençleri mevcuttur. Literatürde diğer araştırmacılar tarafından da benzer eğilim bildirilmiştir (Ghoreishi ve diğerleri, 2016b; Larkeche ve diğerleri, 2015). Ayrıca özütleme süresinin uzun tutulmasının matriste bulunan flavonoidlerin daha uzun süre sıcaklığa maruz kalması nedeniyle bozulmasına ve özütlenen miktarın azalmasına neden olduğu düşünülmektedir.

5.3. Kemferol Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi

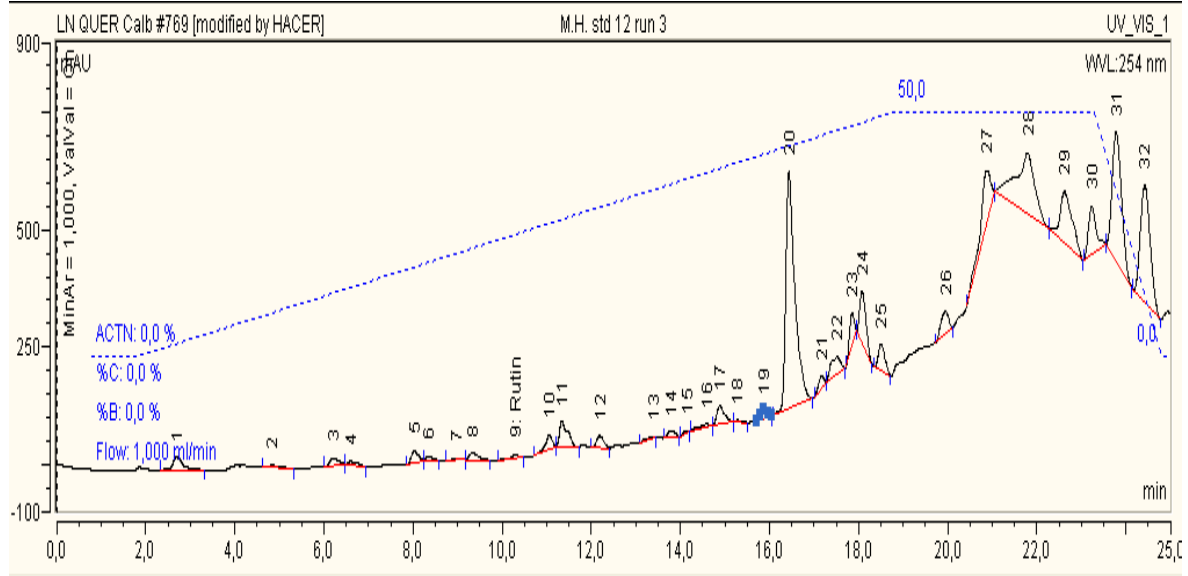
Design Expert 12 programı tarafından belirlenen çalışma algoritması izlenerek deneyler yapılmış ve Çizelge 5.5'te verilen kemferol miktarları bulunmuştur.

Çizelge 5.5. Deneysel çalışma sonucu bulunan kemferol miktarları

Deney No	A	B	C	D	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)	CO ₂ Akış hızı (L/min)	Kemferol (µg/g)
1	0	0	0	0	55	180	90	5	2,694
2	0	0	0	- 1	55	180	90	3	4,284
3	0	+ 1	0	0	55	230	90	5	5,143
4	+ 1	- 1	- 1	+ 1	70	130	30	7	0,194
5	- 1	- 1	+ 1	- 1	40	130	150	3	3,952
6	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	40	230	150	7	4,660
7	- 1	+ 1	- 1	+ 1	40	230	30	7	3,001
8	0	0	- 1	0	55	180	30	5	2,013
9	0	0	0	0	55	180	90	5	2,436
10	0	0	0	0	55	180	90	5	2,045
11	- 1	- 1	- 1	- 1	40	130	30	3	2,928
12	0	0	0	0	55	180	90	5	2,858
13	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	70	230	150	3	3,462
14	- 1	0	0	0	40	180	90	5	3,788
15	0	- 1	0	0	55	130	90	5	0,503
16	+ 1	0	0	0	70	180	90	5	2,044
17	+ 1	+ 1	- 1	- 1	70	230	30	3	2,953
18	0	0	+ 1	0	55	180	150	5	2,182
19	0	0	0	+ 1	55	180	90	7	2,927
20	0	0	0	0	55	180	90	5	2,928
21	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	70	130	150	7	1,987

Çizelge 5.5. incelendiğinde en yüksek kemferol miktarına A: 55°C, B: 230 bar, C: 90 min ve D: 5 L/min şartlarında çalışılan 3. deneyde ulaşılmış ve 5,143 µg/g olarak bulunmuştur.

Şekil 5.6’da 3. deneye ait HPLC kromatogramı verilmiştir. Program tarafından önerilen ve deneysel verilerin uyumluluk gösterdiği daraltılmış kuadratik modelin varyans analizi sonuçları Çizelge 5.6’te verilmiştir.



Şekil 5.6. Kemferol veriminin yüksek olduğu 3. deneyin HPLC kromatogramı

ANOVA (varyans) analizi sonucuna göre önerilen modelin F ve p değerleri sırasıyla 27,69 ve $< 0,0001$ olarak bulunmuştur. Bu değerler modelin geçerli olduğunu ve gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir F değeri çıkma ihtimalinin % 0,01 olduğunu göstermektedir.

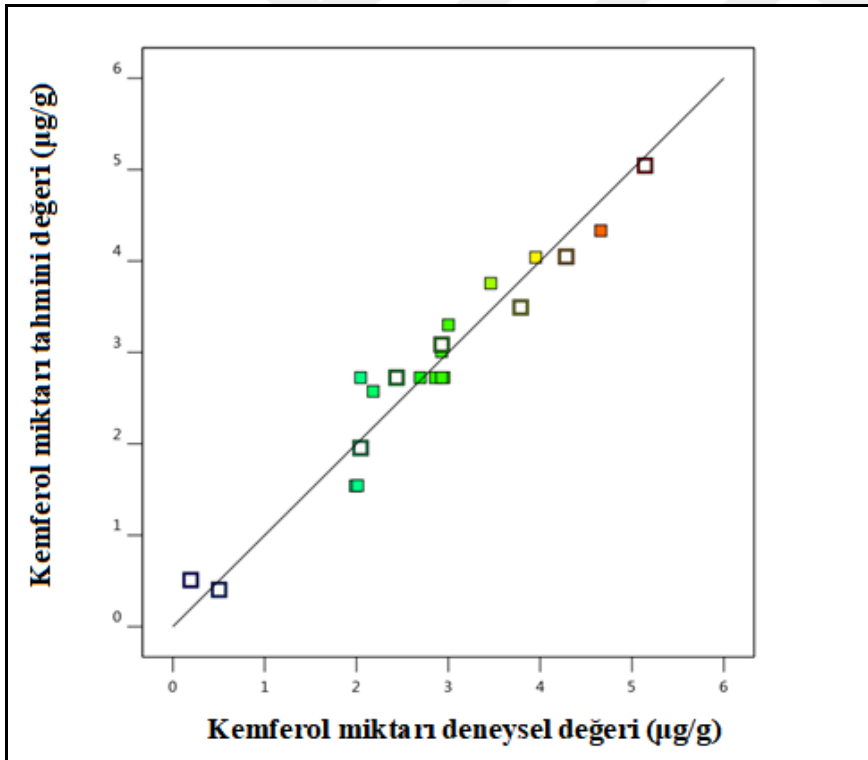
Çizelge 5.6. Kemferol miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	27,19	7	3,88	27,69	$< 0,0001$	Önemli
A-Sıcaklık	5,91	1	5,91	42,13	$< 0,0001$	
B-Basınç	10,76	1	10,76	76,71	$< 0,0001$	
C-Özütleme süresi	2,65	1	2,65	18,92	0,0008	
D-CO ₂ akış hızı	2,31	1	2,31	16,49	0,0013	
AD	4,59	1	4,59	32,68	$< 0,0001$	
C ²	1,43	1	1,43	10,20	0,0071	
D ²	2,30	1	2,30	16,38	0,0014	
Artık	1,82	13	0,1403			
Uyum Eksikliği	1,31	9	0,1451	1,12	0,4930	Önemli değil
Hata	0,5177	4	0,1294			
Toplam	29,02	20				

Hesaplanan uyum eksikliği p değeri ise 0,4930 olarak bulunmuştur. Bu değer model uyumsuzluğunun anlamsız olduğunu göstermektedir.

Modeldeki terimlerden p değeri 0,05 küçük olanlar anlamlı kabul edilmektedir. Buna göre Program tarafından önerilen modeldeki terimlerin p değerlerini incelediğimizde sıcaklık (A), basınç (B), özütleme süresi (C), CO₂ akış hızı (D), sıcaklık-CO₂ akış hızı ilişkisi (AD), özüt süresinin karesi (C²) ve CO₂ akış hızının karesi (D²) kemferol özütleme miktarını etkileyen önemli parametreler olduğu görülmüştür. P değeri 0,05'den büyük olan terimler olduğu için modele dahil edilmemiştir.

Kemferol miktarı için önerilen modelin regresyon katsayısı 0,94 olarak bulunmuştur. Buna göre model tarafından tahmin edilen değerler ile deneysel verilerin ilişkisini gösteren grafik Şekil 5.7'de verilmiştir.



Şekil 5.7. Kemferol miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerinin ilişkisi

Kemferol miktarını sıcaklık, basınç, özütleme süresi ve CO₂ akış hızı parametrelerinin birer fonksiyonu olarak veren modelin eşitliği gerçek ve kodlanmış değerler cinsinden Eş. 5.3 ve Eş. 5.4'te sırasıyla verilmiştir.

$$\text{Kemferol } (\mu\text{g/g}) = +16,9095 - 0,3334*\text{Sıcaklık} + 0,0464*\text{Basınç} + 0,0418*\text{Özütlenme Süresi} - 5,4508*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} + 0,0564*\text{Sıcaklık}*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} - 0,0002*\text{Özütlenme Süresi}^2 + 0,2107*\text{CO}_2 \text{ akış hızı}^2 \quad (5.3)$$

$$\text{Kemferol } (\mu\text{g/g}) = +2,72 - 0,7688*A + 2,32*B + 0,5153*C - 0,4809*D + 1,69*AD - 0,6650*C^2 + 0,8427*D^2 \quad (5.4.)$$

Eş. 5.4 incelendiğinde sıcaklıktaki artışın özütlenen kemferol miktarını azaltıcı etkisi; basınç ve özütlenme süresindeki artışın ise artırıcı etkisi olduğu söylenebilir. Sıcaklık – CO₂ akış hızı ikili etkileşiminin etkisinin özütlenen kemferol miktarını artırıcı etkisi, işlem süresinin karesinin kemferol miktarını azaltıcı etkisi, CO₂ akış hızı karesinin ise artırıcı etkisi olmaktadır. İşlem parametrelerinin Eş. 5.4'deki katsayılarını karşılaştırdığımızda basınca ait katsayı büyük olduğundan kemferol miktarını etkileyen en önemli parametre olduğu ve yüksek basınçlarda çalışılması halinde özütlenecek kemferol miktarının daha fazla olacağı söylenebilir. Bu noktada deneysel verilere tekrar baktığımızda en yüksek kemferol miktarına ulaşılan 3. deneyde 230 bar basınçta çalışıldığı dikkate alınarak modelin deneysel bulguyu destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

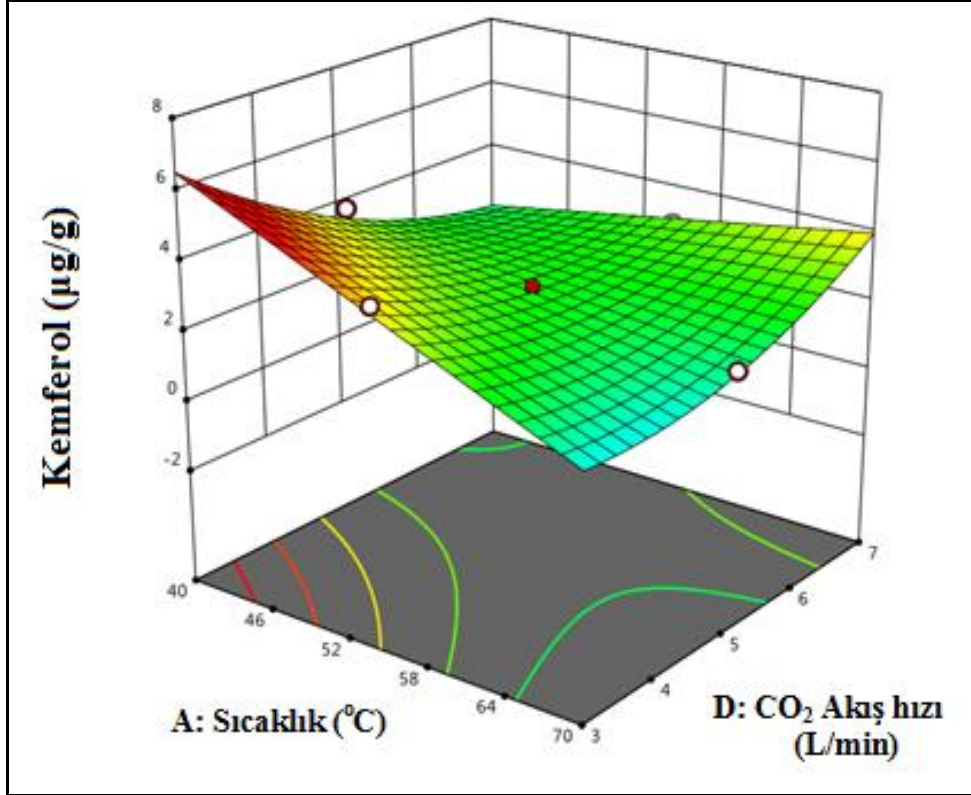
5.3.1. Sıcaklık ve CO₂ akış hızının özütlenen kemferol miktarına etkisi

Kemferol için bulunan model ve çalışma parametrelerinin birbiriyle ilişkisi Design Expert 12 programı yardımıyla çizilen yüzey cevap grafikleri ile incelenmiştir. Çizilen üç boyutlu grafiklerin x ve y eksenlerinde bağımsız iki değişken yer alırken z ekseninde ise bağımlı değişkenin (kemferol özütlenen miktarı) sonucu gösterilmektedir. Grafikte yer almayan diğer iki bağımsız değişkenler ise sıfır düzeyindeki değerlerindedir.

Şekil 5.8'i incelediğimizde düşük CO₂ akış hızlarında çalışırken azalan sıcaklığın kemferol miktarını artırıcı etkisi görülmektedir. Literatürden de bildiğimiz üzere sıcaklıktaki azalma SK-CO₂ yoğunluğunu ve çözme gücünü artırmaktadır. Dolayısıyla düşük sıcaklıklarda özütlenen flavonoid miktarında artış gözlenmiştir. Alınan bu sonuç Çelik (2014)'in deve dikeninden ilaç etken maddesi özütleme çalışmasıyla benzerlik göstermektedir.

Ancak yüksek CO₂ akış hızlarında çalışıldığında sıcaklıktaki artış özütlenen kemferol miktarını artırarak tam tersi bir etki yaratmıştır. Burada artan sıcaklıkla SK-CO₂'in

moleküler difüzyon katsayısının artmasının ve kemferol buhar basıncının artmasıyla daha iyi çözünürlüğe ulaşmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

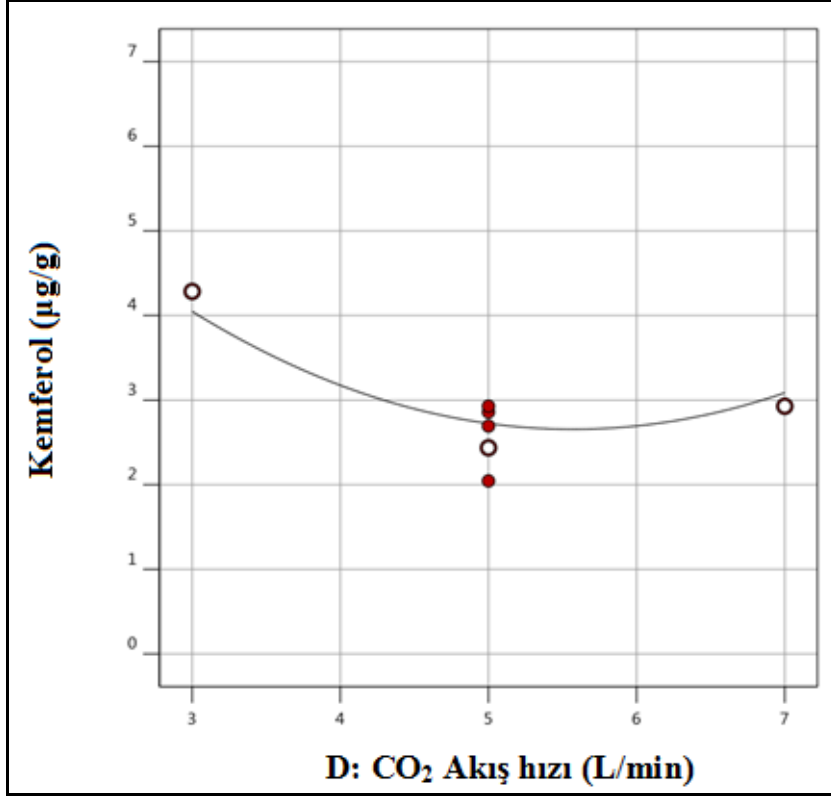


Şekil 5.8. Sıcaklık ve CO₂ akış hızının özütlenen kemferol miktarına etkisi (Özütleme süresi: 90 min, Basınç: 180 bar)

Şekil 5.8’de düşük sıcaklık değerlerinde çalışırken CO₂ akış hızındaki azalışın özütlenen kemferol miktarını artırdığı görülmüştür.

Buna destekleyici olarak kemferol modeline ait Eş. 5.4 incelendiğinde lineer CO₂ akış hızının önündeki katsayı negatif ($0 > -0,4809$), kuadratik CO₂ akış hızının önündeki katsayı pozitif ($0,8427 > 0$) olduğundan düşük seviyeli CO₂ akış hızıyla çalışıldığında özütlenen miktar artacaktır. Alınan bu sonuçta SK-CO₂ ile örnek arasındaki etkileşimin azalan akış hızıyla artmasının ve akışkanın matrisle daha iyi nüfus etmesinin etkili olduğu düşünülmektedir. Nyam ve diğerleri (2011) tarafından kavun çekirdeği ile yapılan çalışmada benzer sonuç ile karşılaşmıştır.

Şekil 5.9’da verilen grafikten de düşük CO₂ akış hızlarında çalışmanın özütlenen kemferol miktarını artırıcı etkisi olduğu görülebilir.



Şekil 5.9. CO₂ akış hızının özütlenen kemferol miktarına etkisi (Sıcaklık: 55°C, Özütleme süresi: 90 min, Basınç: 180 bar)

5.3.2. Sürenin özütlenen kemferol miktarına etkisi

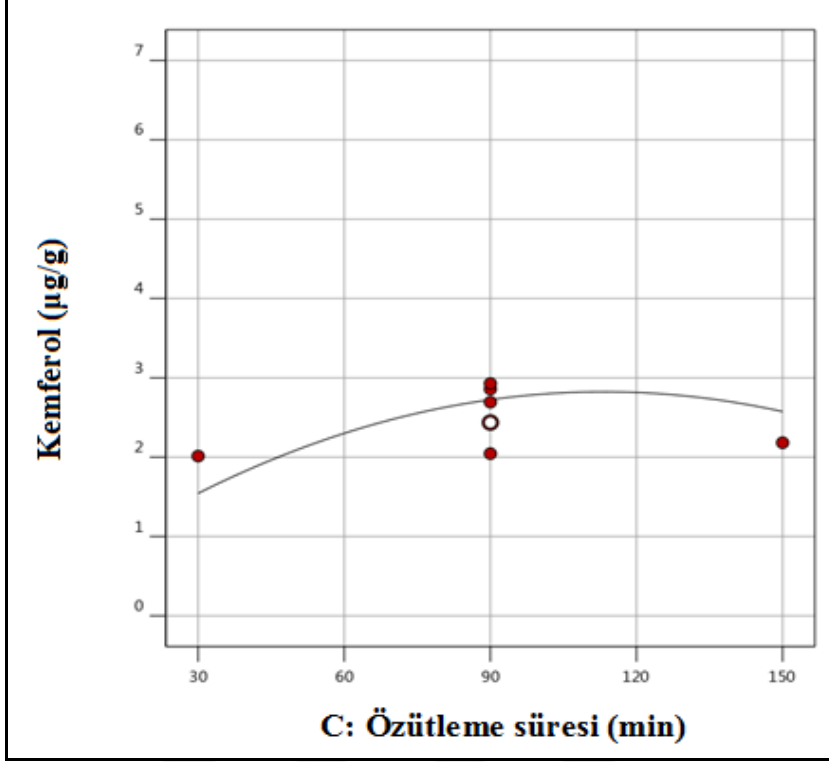
Kemferol miktarı üzerine özütleme süresindeki değişim kuersetine benzer etki göstermiştir.

Şekil 5.10 ekstraksiyon süresinin kemferol kazanımı üzerindeki etkilerini göstermektedir. Ekstraksiyon işleminin başlangıcından yaklaşık 120 dakikaya kadar olan süre içerisinde kemferol kazanımı artış göstermektedir. Ardış partikülleri ile SK-CO₂ arasında etkili bir kütle transfer kuvveti olduğu sürece bu artış devam edecektir.

Kemferol modeline ait Eş. 5.4 incelendiğinde kuersetine olduğu gibi kemferol kazanımı üzerinde lineer ekstraksiyon süresinin pozitif etkisi olmaktadır ancak optimum süre sonrası negatif kuadratik etki de önemli hale gelmektedir.

Ekstraksiyon süresi boyunca, eğrinin birinci kısmına tekabül eden zamanda katı yüzeyde bulunan analitler hızlı ve sabit bir hızla süperkritik akışkanla kolayca ekstrakte edilir. Bu

adımda ekstraksiyon işlemi, dış kütle transfer direnci ve analitin çözünürlüğü ile kontrol edilir.



Şekil 5.10. Sürenin özütlenen kemferol miktarına etkisi (Sıcaklık: 55°C, Basınç: 180 bar, CO₂ akış hızı: 5 L/min)

Bir sonraki aşamada, çözünenlerin özütlenme verimi çok daha yavaş bir şekilde artar. Eğrinin bu ikinci kısmı, yüzeyde çözünen maddenin tükenmesi ve katı substratın daha derin bölümlerinden çözücü tarafından çıkarılmasıyla açıklanabilir. Bu noktada difüzyonel ve içsel kütle transfer dirençleri özütleme işlemine hâkimdir. Sonuç olarak itici güç ortadan kalktığı için özütlenen kemferol miktarında daha fazla artış olmaz. Literatürde diğer araştırmacılar tarafından da benzer eğilim bildirilmiştir (Ghoreishi ve diğerleri, 2016b; Larkeche ve diğerleri, 2015).

Ayrıca özütleme süresinin uzun tutulmasının matriste bulunan flavonoidlerin daha uzun süre sıcaklığa maruz kalması nedeniyle bozulmasına ve özütlenen miktarın azalmasına neden olduğu düşünülmektedir.

5.4. Silibinin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi

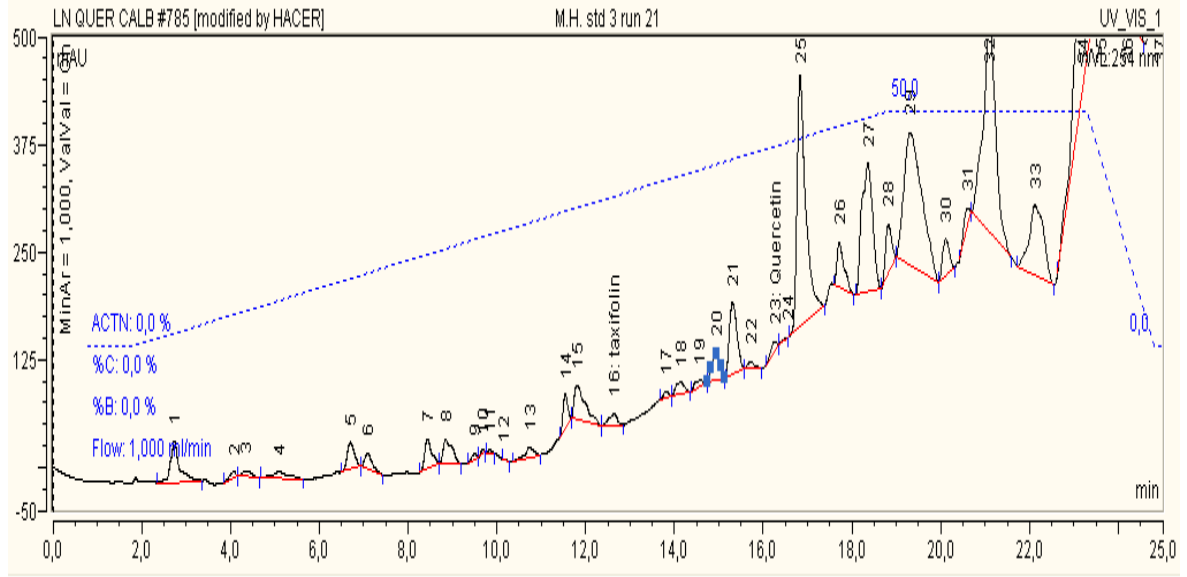
Design Expert 12 programı tarafından belirlenen çalışma algoritması izlenerek deneyler yapılmış ve Çizelge 5.7’te verilen silibinin miktarları bulunmuştur.

Çizelge 5.7. Deneysel çalışma sonucu bulunan silibinin miktarları

Deney No	A	B	C	D	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)	CO ₂ Akış hızı (L/min)	Silibinin (µg/g)
1	0	0	0	0	55	180	90	5	10,463
2	0	0	0	- 1	55	180	90	3	3,722
3	0	+ 1	0	0	55	230	90	5	2,763
4	+ 1	- 1	- 1	+ 1	70	130	30	7	5,759
5	- 1	- 1	+ 1	- 1	40	130	150	3	2,874
6	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	40	230	150	7	0,550
7	- 1	+ 1	- 1	+ 1	40	230	30	7	1,324
8	0	0	- 1	0	55	180	30	5	9,454
9	0	0	0	0	55	180	90	5	9,214
10	0	0	0	0	55	180	90	5	9,046
11	- 1	- 1	- 1	- 1	40	130	30	3	1,135
12	0	0	0	0	55	180	90	5	6,299
13	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	70	230	150	3	1,002
14	- 1	0	0	0	40	180	90	5	1,983
15	0	- 1	0	0	55	130	90	5	16,441
16	+ 1	0	0	0	70	180	90	5	18,438
17	+ 1	+ 1	- 1	- 1	70	230	30	3	14,421
18	0	0	+ 1	0	55	180	150	5	18,540
19	0	0	0	+ 1	55	180	90	7	2,888
20	0	0	0	0	55	180	90	5	11,452
21	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	70	130	150	7	21,017

Çizelge 5.7 incelendiğinde en yüksek silibinin miktarına A: 70°C, B: 130 bar, C: 150 min ve D: 7 L/min şartlarında çalışılan 21. deneyde ulaşılmış ve silibinin miktarı 21,017 µg/g olarak bulunmuştur. 21. deneye ait HPLC kromatogramı Şekil 5.11’de verilmiştir.

Program tarafından önerilen ve deneysel verilerin uyumluluk gösterdiği daraltılmış kuadratik modelin varyans analizi sonuçları ise Çizelge 5.8’te verilmiştir.



Şekil 5.11. Silibinin veriminin yüksek olduğu 21. deneyin HPLC kromatogramı

ANOVA (varyans) analizi sonucuna göre önerilen modelin F ve p değerleri sırasıyla 13,31 ve 0,0001 olarak bulunmuştur. Bu değerler modelin geçerli olduğunu ve gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir F değeri çıkma ihtimalinin % 0,01 olduğunu göstermektedir.

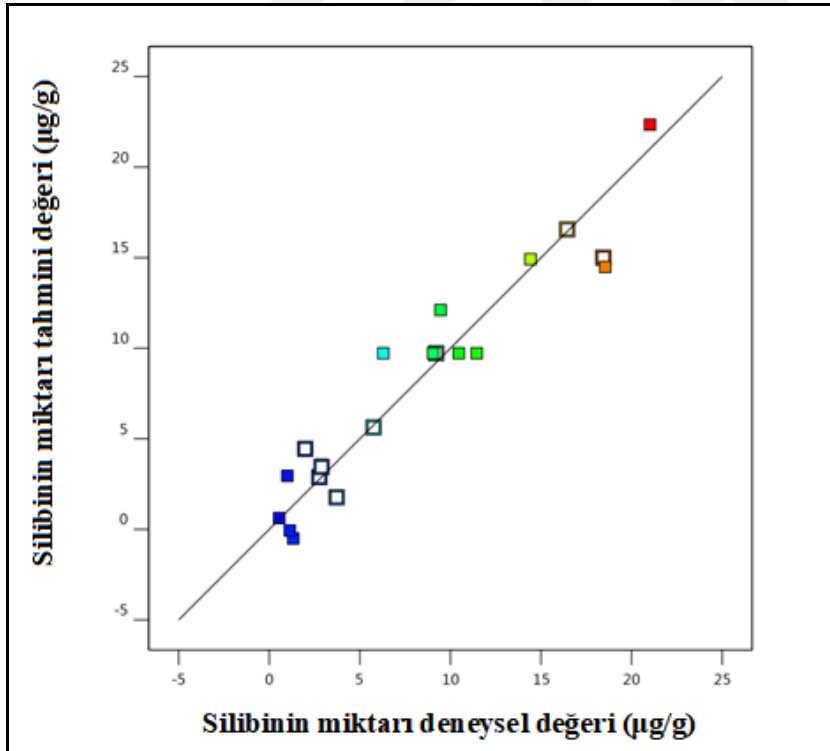
Çizelge 5.8. Silibinin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	790,43	9	87,83	13,31	0,0001	Önemli
A-Sıcaklık	278,46	1	278,46	42,19	< 0,0001	
B-Basınç	93,54	1	93,54	14,17	0,0031	
C-Özütlenme süresi	14,14	1	14,14	2,14	0,1713	
D- CO ₂ akış hızı	7,03	1	7,03	1,07	0,3242	
AD	42,48	1	42,48	6,44	0,0276	
BC	121,61	1	121,61	18,43	0,0013	
CD	85,56	1	85,56	12,96	0,0042	
C ²	41,43	1	41,43	6,28	0,0292	
D ²	163,83	1	163,83	24,82	0,0004	
Artık	72,59	11	6,60			
Uyum Eksikliği	57,53	7	8,22	2,18	0,2351	Önemli değil
Hata	15,06	4	3,77			
Toplam	863,03	20				

Hesaplanan uyum eksikliği p değeri ise 0,2351 olarak bulunmuştur. Bu değer model uyumsuzluğunun anlamsız olduğunu göstermektedir.

Modeldeki terimlerden p değeri 0,05 küçük olanlar anlamlı kabul edilmektedir. Buna göre Program tarafından önerilen modeldeki terimlerin p değerlerini incelediğimizde sıcaklık (A), basınç (B), sıcaklık-CO₂ akış hızı ilişkisi (AD), basınç-özütme süresi ilişkisi (BC), özütme süresi – CO₂ akış hızı ilişkisi (CD), özüt süresinin karesi (C²) ve CO₂ akış hızının karesi (D²) silibinin özütme miktarını etkileyen önemli parametreler olduğu görülmüştür. P değeri 0,05'den büyük olan terimler anlamsız olduğu için modele dahil edilmemiştir. Özütme süresi ve CO₂ akış hızının p değerleri 0,05'den büyük olsa da hiyerarşiyi korumak adına çıkarılmamıştır.

Model tarafından tahmin edilen değerler ile deneysel verilerin ilişkisini gösteren grafik Şekil 5.12'de verilmiştir.



Şekil 5.12. Silibinin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerinin ilişkisi

Silibinin miktarı için önerilen modelin Regresyon katsayısı 0,92 olarak bulunmuştur.

Silibinin miktarını sıcaklık, basınç, özütlenme süresi ve CO₂ akış hızı parametrelerinin birer fonksiyonu olarak veren modelin eşitliği gerçek ve kodlanmış değerler cinsinden Eş. 5.5 ve Eş. 5.6'da sırasıyla verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Silibinin } (\mu\text{g/g}) = & -81,3289 + 1,211*\text{Sıcaklık} - 0,0198*\text{Basınç} - 0,0614*\text{Özütlenme Süresi} + \\ & 25,2006*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} - 0,1718*\text{Sıcaklık}*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} - 0,0013*\text{Basınç}*\text{Özütlenme Süresi} \\ & + 0,0273*\text{Özütlenme Süresi}*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} + 0,001*\text{Özütlenme Süresi}^2 - 1,77872* \text{CO}_2 \text{ akış} \\ & \text{hızı}^2 \end{aligned} \quad (5.5)$$

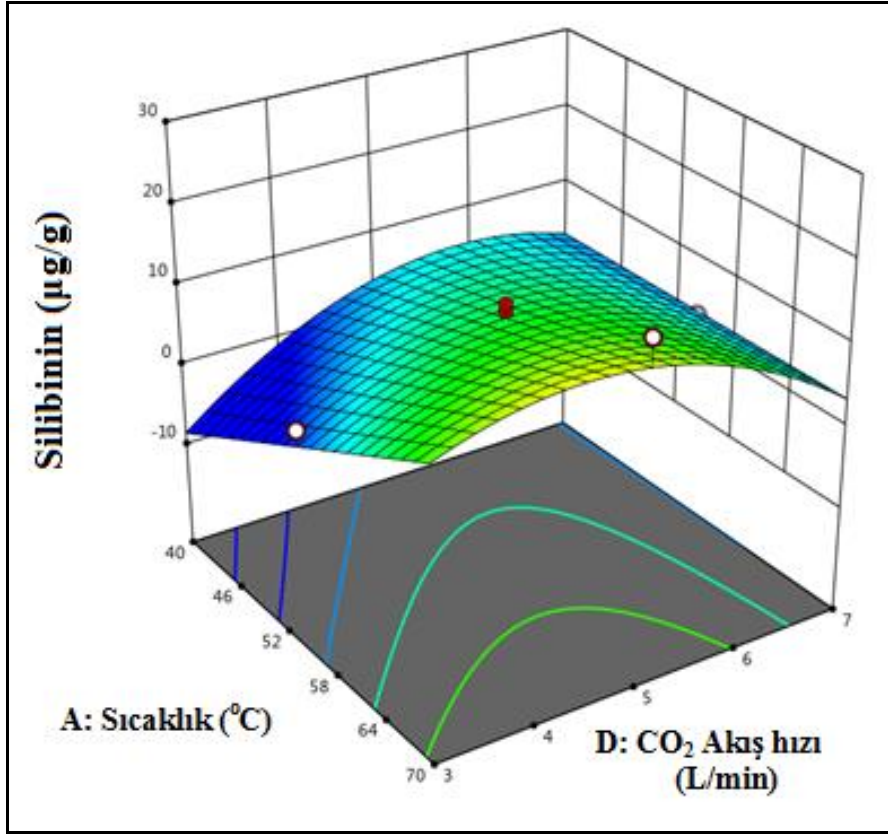
$$\begin{aligned} \text{Silibinin } (\mu\text{g/g}) = & +9,72 + 5,28*A - 6,84*B + 1,19*C + 0,8384*D - 5,15*AD - 3,90*BC + \\ & 3,27*CD + 3,58*C^2 - 7,11*D^2 \end{aligned} \quad (5.6)$$

Eş. 5.6 incelendiğinde sıcaklıktaki artışın özütlenen silibinin miktarını artırıcı etkisi olacağı söylenebilir. Bu sebeple yüksek sıcaklıkta çalışmak tercih edilebilir. Sıcaklık – CO₂ akış hızı ikili etkileşiminin önündeki katsayının negatif ($0 > -0,8384$) olduğu Eş. 5.6'dan görülebilir. Bu durumda sıcaklık – CO₂ akış hızı ikili etkileşiminin artırıcı etkisi olabilmesi için düşük CO₂ akış hızında çalışmak tercih edilmelidir. Artan basıncın ise silibinin kazanımına olumsuz etkisi olacaktır. Bu doğrultuda silibinin kazanımını maksimize etmek için düşük basınçta çalışmak tercih edilebilir. Özütlenme süresindeki artışın silibinin kazanımına olumlu etkisini de dikkate alırsak, basınç – özütlenme süresi ikili etkileşiminin pozitif yönlü olabilmesi için basınç düşük tutulmalıdır. Bu noktada deneysel verileri tekrar incelediğimizde silibinin miktarının maksimuma ulaştığı 21. deneyde 70°C, 130 bar, 150 min ve 7 L/min koşullarında çalışmıştır. Sıcaklık, basınç ve özütlenme süresi modelin yönlendirmesini destekler niteliktedir. Ancak CO₂ akış hızı için elde edilen deneysel bulgu 7 L/min iken, model denklemi (Eş. 5.6) düşük CO₂ akış hızında çalışmanın uygun olacağını göstermektedir.

5.4.1. Sıcaklık ve CO₂ akış hızının özütlenen silibinin miktarına etkisi

Silibinin için bulunan model ve çalışma parametrelerinin birbiriyle ilişkisi Design Expert 12 programı yardımıyla çizilen yüzey cevap grafikleri ile incelenmiştir. Çizilen üç boyutlu grafiklerin x ve y eksenlerinde bağımsız iki değişken yer alırken z ekseninde ise bağımlı değişkenin (silibinin özütlenen miktarı) sonucu gösterilmektedir. Grafikte yer almayan diğer iki bağımsız değişkenler ise sıfır düzeyindeki değerlerindedir.

Şekil 5.13 incelendiğinde düşük CO₂ akışı değerlerinde çalışıldığında sıcaklıktaki artışın özütlenen silibinin miktarını artırıcı etkisi olduğu görülebilir. Silibinin yüksek kaynama noktası ve moleküler ağırlığa sahip olması sebebiyle çözünürlüğünün artması için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

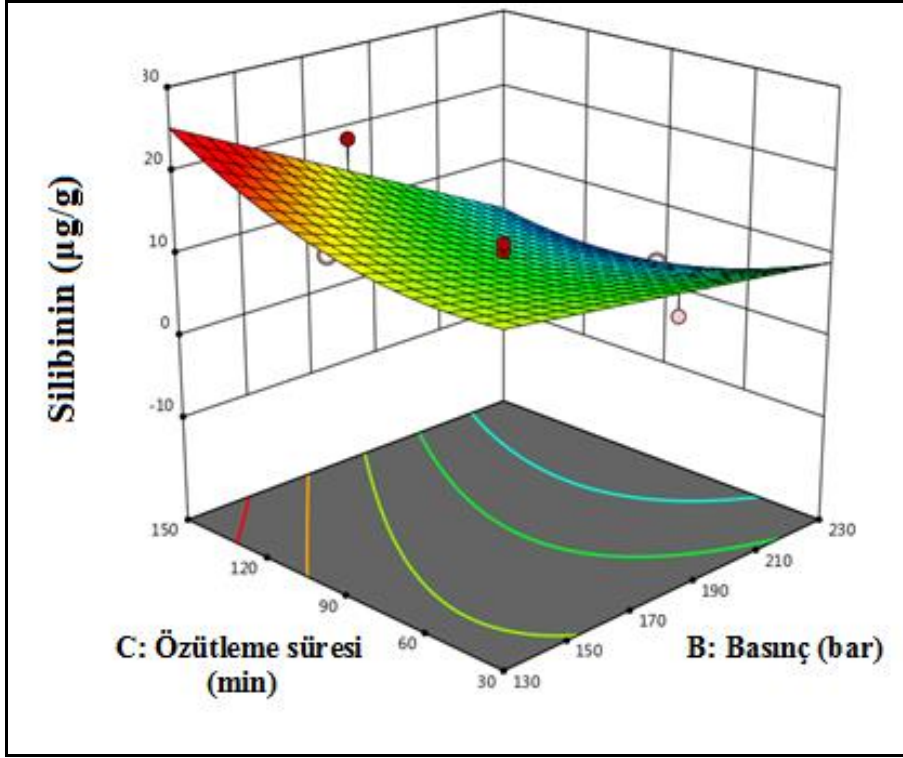


Şekil 5.13. Sıcaklık ve CO₂ akış hızının özütlenen silibinin miktarına etkisi (Özütleme süresi: 90 min, Basınç: 180 bar)

Yüksek CO₂ akış hızı değerlerinde çalışıldığında ise sıcaklıktaki değişimin silibinin miktarına etkisi açık değildir. Düşük sıcaklık değerlerinde çalışıldığında yüksek CO₂ akış hızında çalışmanın özütleme verimini artıracakı söylenebilir. Yüksek sıcaklıklarda çalışıldığında ise CO₂ hızının artması başta silibinin kazanımı artırmışken daha yüksek akış hızlarına çıktıkça verimi düşürmüştür. Benzer durumla Ekinci ve Gürü (2014) tarafından yapılan çalışmada da karşılaşılmış ve yüksek akış hızlarında özütleme sürecinin analitlerin difüzyon hızıyla kontrol edildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak şekilden de görülebileceği üzere 70°C sıcaklık, 5 L/min CO₂ akış hızında çalışıldığı durumda silibinin kazanımı artacaktır.

5.4.2. Basınç ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi

Şekil 5.14 incelendiğinde düşük basınç değerlerinde özütleme süresindeki artışın silibinin kazanımına olumlu etkisi görülebilir ancak özütleme süresinin bu etkisi yüksek basınçla çalışıldığı durumda aynı değildir.

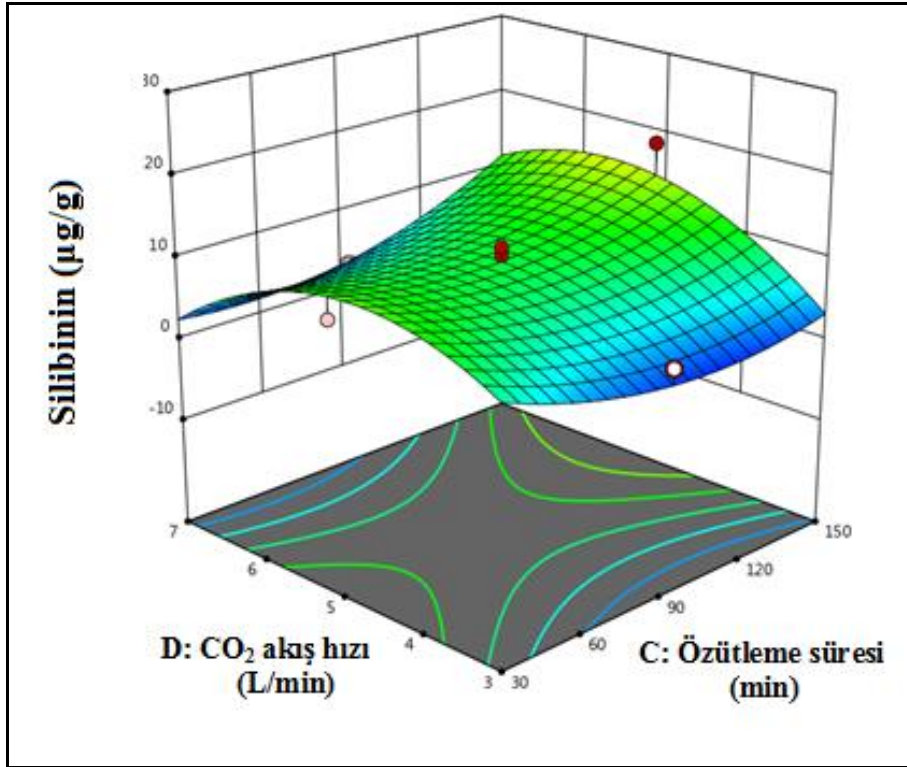


Şekil 5.14. Basınç ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi (Sıcaklık: 55°C, CO₂ akış hızı: 5 L/min)

Artan basıncın ise silibinin kazanımına olumsuz etkisi görülmüştür. Normalde SK-CO₂'in çözme gücü artan basınçla yoğunluğu da artacağı için yükselir ancak silibinin için basıncın bu etkisinden söz etmek mümkün olamamıştır. Literatürde basıncın bu olumsuz etkisiyle karşılaşıldığı durumlar olmuştur. Yüksek basıncın SK-CO₂'in difüzyon kabiliyetini düşürdüğü için numune matrisindeki gözeneklerle temasının azalmasına ve çözme gücünün azalmasına sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca artan basınç sebebiyle numune matrisinin sıkıştırılması da negatif ekstraksiyon verimiyle sonuçlanmaktadır (Peng, Mohd-Nasir, Setapar, Ahmad ve Lokhat, 2019). Sonuç olarak 130 barda çalışmanın silibinin verimini artıracacağı düşünülmektedir.

5.4.3. CO₂ akış hızı ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi

Şekil 5.15 incelendiğinde düşük CO₂ akış hızlarında çalışıldığında özütleme süresindeki azalmanın hafif de olsa silibinin kazanımını artırdığı söylenebilir. Yüksek CO₂ akış hızlarında çalışıldığında CO₂ ile partikül arasındaki temas süresi azalacağından daha iyi verim alabilmek için özütleme süresinin artırılması gereklidir. CO₂ akış hızının ise önceki kısımlarda belirtildiği gibi orta değerde tutulması verimi artıracaktır.



Şekil 5.15. CO₂ akış hızı ve sürenin özütlenen silibinin miktarına etkisi (Sıcaklık: 55°C, Basınç: 180 bar)

Satam, Parab, Bhagwat ve Bhoir (2012) yaptıkları çalışmada CO₂ akış hızındaki değişimlerin benzer etkisiyle karşılaşmıştır. Düşük CO₂ akış hızı ile çalışıldığında analitin kütle transfer direncinin çözücüye geçişi sınırlaması nedeniyle SK-CO₂'in doymuş hale gelmeden ekstraktörü terk ettiğini belirtmişlerdir. Akış hızı arttıkça, çözücü doymuş hale gelene kadar kütle transfer direnci düşer ve maksimum verim elde edilmesini sağlamak için dengenin sağlanmasına izin verir. Akış hızının daha da artırılması yüksek kütle transfer hızına rağmen çözücünün ekstraktörde kalma süresini azaltarak sistemin dengeden sapmasına ve doymamış halde terk etmesine neden olur.

5.5. Taksifolin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi

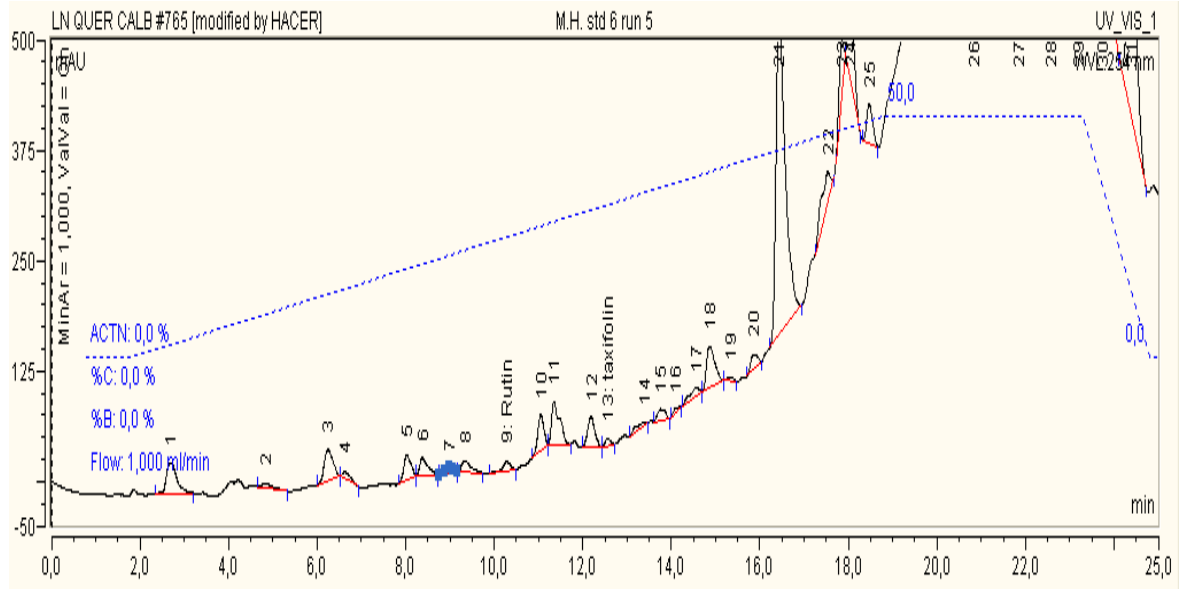
Design Expert 12 programı tarafından belirlenen çalışma algoritması izlenerek deneyler yapılmış ve Çizelge 5.9’da verilen taksifolin miktarları bulunmuştur.

Çizelge 5.9. Deneysel çalışma sonucu bulunan taksifolin miktarları

Deney No	A	B	C	D	Sıcaklık (oC)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)	CO ₂ Akış hızı (L/min)	Taksifolin (µg/g)
1	0	0	0	0	55	180	90	5	3,379
2	0	0	0	- 1	55	180	90	3	8,614
3	0	+ 1	0	0	55	230	90	5	4,164
4	+ 1	- 1	- 1	+ 1	70	130	30	7	2,911
5	- 1	- 1	+ 1	- 1	40	130	150	3	9,304
6	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	40	230	150	7	1,845
7	- 1	+ 1	- 1	+ 1	40	230	30	7	2,612
8	0	0	- 1	0	55	180	30	5	2,170
9	0	0	0	0	55	180	90	5	4,154
10	0	0	0	0	55	180	90	5	4,006
11	- 1	- 1	- 1	- 1	40	130	30	3	2,354
12	0	0	0	0	55	180	90	5	3,974
13	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	70	230	150	3	3,607
14	- 1	0	0	0	40	180	90	5	1,172
15	0	- 1	0	0	55	130	90	5	3,290
16	+ 1	0	0	0	70	180	90	5	2,314
17	+ 1	+ 1	- 1	- 1	70	230	30	3	3,258
18	0	0	+ 1	0	55	180	150	5	2,263
19	0	0	0	+ 1	55	180	90	7	6,846
20	0	0	0	0	55	180	90	5	4,289
21	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	70	130	150	7	2,508

Çizelge 5.9 incelendiğinde en yüksek taksifolin miktarına A: 40°C, B: 130 bar, C: 150 min ve D: 3 L/min şartlarında çalışılan 5. deneyde ulaşılmış ve taksifolin miktarı 9,304 µg/g olarak bulunmuştur.

5. deneye ait kromatogram Şekil 5.16’da verilmiştir. Program tarafından önerilen ve deneysel verilerin uyumluluk gösterdiği daraltılmış kuadratik modelin varyans analizi sonuçları ise Çizelge 5.10’da verilmiştir.



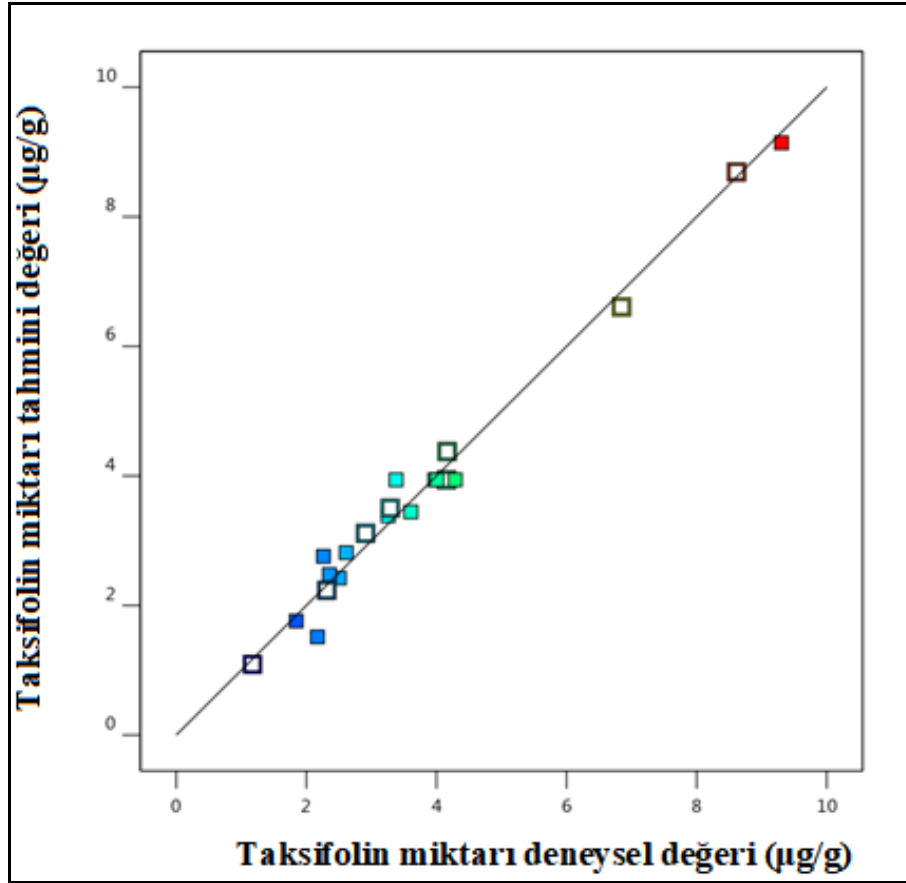
Şekil 5.16. Taksifolin veriminin yüksek olduğu 5. deneyin HPLC kromatogramı

Çizelge 5.10. Taksifolin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	86,47	12	7,21	38,17	< 0,0001	Önemli
A-Sıcaklık	0,6527	1	0,6527	3,46	0,1000	
B-Basınç	0,3825	1	0,3825	2,03	0,1924	
C-Özütlenme süresi	3,87	1	3,87	20,50	0,0019	
D-CO2 akış hızı	10,85	1	10,85	57,47	< 0,0001	
AC	4,86	1	4,86	25,76	0,0010	
AD	2,14	1	2,14	11,34	0,0098	
BC	6,06	1	6,06	32,12	0,0005	
BD	1,76	1	1,76	9,35	0,0156	
CD	8,97	1	8,97	47,49	0,0001	
A ²	14,33	1	14,33	75,91	< 0,0001	
C ²	8,99	1	8,99	47,60	0,0001	
D ²	38,06	1	38,06	201,59	< 0,0001	
Artık	1,51	8	0,1888			
Uyum Eksikliği	1,02	4	0,2561	2,11	0,2439	Önemli değil
Hata	0,4859	4	0,1215			
Toplam	87,98	20				

ANOVA (varyans) analizi sonucuna göre önerilen modelin F ve p değerleri sırasıyla 38,17 ve $< 0,0001$ olarak bulunmuştur. Bu değerler modelin geçerli olduğunu ve gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir F değeri çıkma ihtimalinin % 0,01 olduğunu göstermektedir. Hesaplanan uyum eksikliği p değeri ise 0,2439 olarak bulunmuştur. Bu değer model uyumsuzluğunun anlamsız olduğunu göstermektedir.

Taksifolin miktarı için önerilen modelin regresyon katsayısı 0,98 olarak bulunmuştur. Buna göre model tarafından tahmin edilen değerler ile deneysel verilerin ilişkisini gösteren grafik Şekil 5.17'de verilmiştir.



Şekil 5.17. Taksifolin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerinin ilişkisi

Modeldeki terimlerden p değeri 0,05 küçük olanlar anlamlı kabul edilmektedir. Buna göre Program tarafından önerilen modeldeki terimlerin p değerlerini incelediğimizde özütlenme süresi (C), CO₂ akış hızı (D), sıcaklık-özütlenme süresi ilişkisi (AC), sıcaklık-CO₂ akış hızı ilişkisi (AD), basınç-özütlenme süresi ilişkisi (BC), basınç-CO₂ akış hızı ilişkisi (BD),

özütleme süresi – CO₂ akış hızı ilişkisi (CD), sıcaklığın karesi (A²), özüt süresinin karesi (C²) ve CO₂ akış hızının karesi (D²) taksifolin özütleme miktarını etkileyen önemli parametreler olduğu görülmüştür. P değeri 0,05'den büyük olan terimler anlamsız olduğu için modele dahil edilmemiştir. Sıcaklık ve basıncın p değerleri 0,05'den büyük olsa da hiyerarşiyi korumak adına çıkarılmamıştır.

Taksifolin miktarını sıcaklık, basınç, özütleme süresi ve CO₂ akış hızı parametrelerinin birer fonksiyonu olarak veren modelin eşitliği gerçek ve kodlanmış değerler cinsinden Eş. 5.7 ve Eş. 5.8'de sırasıyla verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Taksifolin } (\mu\text{g/g}) = & - 2,4415 + 1,0364*\text{Sıcaklık} - 0,0176*\text{Basınç} + 0,2445*\text{Özütleme} \\ & \text{süresi} - 13,0143*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} - 0,0009*\text{Sıcaklık}*\text{Özütleme süresi} + 0,0386*\text{Sıcaklık} \\ & \text{CO}_2 \text{ akış hızı} - 0,0003*\text{Basınç}*\text{Özütleme süresi} + 0,0105*\text{Basınç}*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} - \\ & 0,0088*\text{Özütleme Süresi}*\text{CO}_2 \text{ akış hızı} - 0,0101*\text{Sıcaklık}^2 - 0,0005*\text{Özütleme süresi}^2 + \\ & 0,9276*\text{CO}_2 \text{ akış hızı}^2 \end{aligned} \quad (5.7)$$

$$\begin{aligned} \text{Taksifolin } (\mu\text{g/g}) = & + 3,94 + 0,5713*A + 0,4373*B + 0,6221*C - 1,04*D - 0,7797*AC + \\ & 1,16*AD - 0,8707*BC + 1,05*BD - 1,06*CD - 2,28*A^2 - 1,80*C^2 + 3,71*D^2 \end{aligned} \quad (5.8)$$

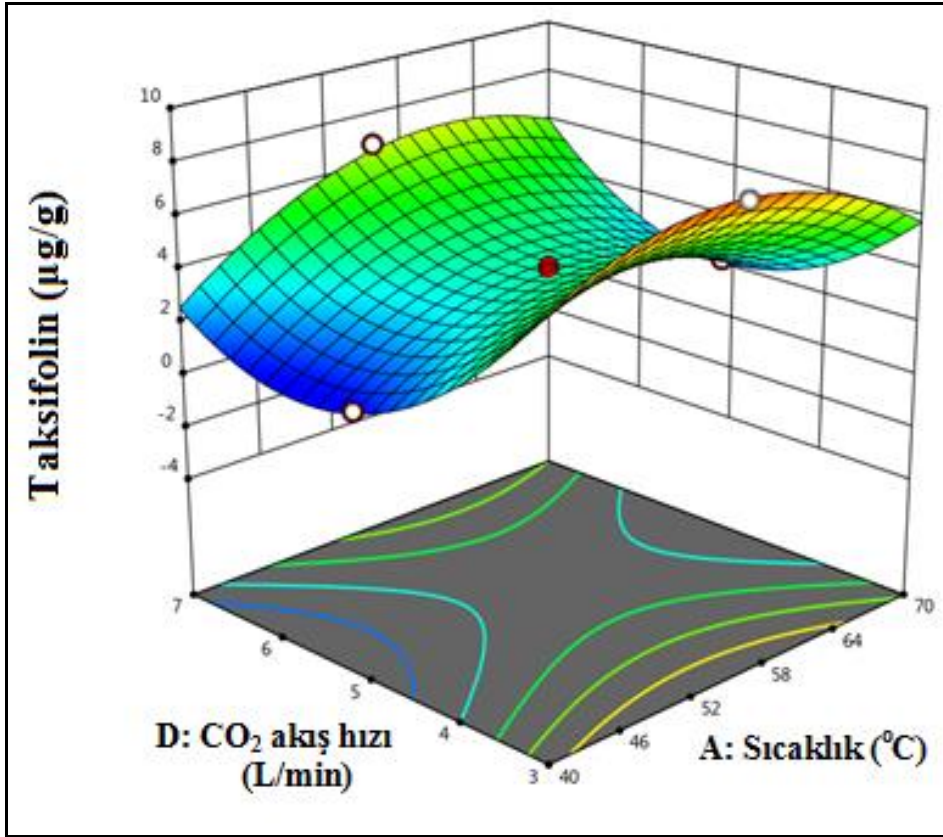
Eş. 5.8 incelendiğinde lineer sıcaklığa ait katsayının pozitif (0,5713>0) olduğu ancak kuadratik sıcaklığa ait parametrenin negatif (-2,28<0) olduğu görülmüştür. Ayrıca sıcaklık diğer çalışma parametreleriyle de etkileşim içerisindedir. Aynı şekilde özütleme süresinin lineer katsayısı pozitif (0,6221>0), kuadratik katsayısı (-1,80<0) ise negatiftir. Benzer durumlar basınç ve CO₂ akış hızı için de geçerlidir. Bu sebeple parametrelerdeki değişimlerin taksifolin kazanımını ne yönde etkileyeceğini değerlendirebilmek için yüzey cevap grafiklerinden faydalanılmıştır.

5.5.1. CO₂ akış hızı ve sıcaklığın özütlenen taksifolin miktarına etkisi

Taksifolin için bulunan model ve çalışma parametrelerinin birbiriyle ilişkisi Design Expert 12 programı yardımıyla çizilen yüzey cevap grafikleri ile incelenmiştir. Çizilen üç boyutlu grafiklerin x ve y eksenlerinde bağımsız iki değişken yer alırken z ekseninde ise bağımlı değişkenin (taksifolin özütlenen miktarı) sonucu gösterilmektedir. Grafikte yer almayan diğer iki bağımsız değişkenler ise sıfır düzeyindeki değerlerindedir.

Şekil 5.18 incelendiğinde düşük sıcaklık değerlerinde çalışıldığında CO₂ akış hızındaki yükselme taksifolin kazanımını olumsuz yönde etkilemiştir.

Düşük sıcaklıkta taksifolinin yeterli buhar basıncına sahip olmaması ve yüksek akış hızı sebebiyle SK-CO₂'in partikül içine nüfuz edememiş olması bu durumun nedeni olabilir. Maksimum taksifolin kazanımına ulaşabilmek için düşük CO₂ akışında çalışılması gerektiği düşünülmektedir.



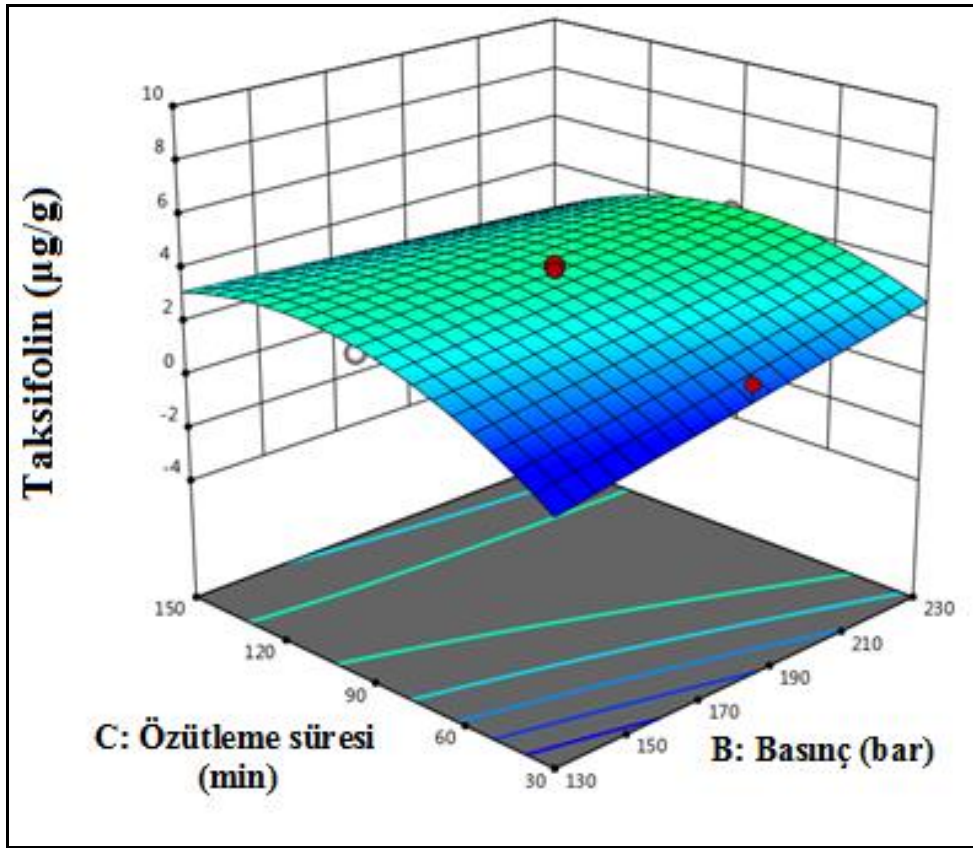
Şekil 5.18. CO₂ akış hızı ve sıcaklığın özütlenen taksifolin miktarına etkisi (Özütleme süresi: 90 min, Basınç: 180 bar)

5.5.2. Basınç ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi

Şekil 5.19'da taksifolin miktarı üzerine özütleme süresi ve basıncın ikili etkisi gösterilmektedir. Şekil oluşturulurken sıcaklık ve CO₂ akış hızı sıfır düzeylerinde sabit tutulmuştur.

Buna göre düşük özütleme sürelerinde yüksek basınçlara çıkıldıkça taksifolin kazanımı artmaktadır.

Ghoreishi ve diğerleri (2016b) tarafından yapılan çalışmada karaçam kabuğundan taksifolin eldesine 100-300 bar aralığındaki basıncın etkisi araştırılmış ve basınçtaki yükselmenin 193 bar'a kadar taksifolin kazanımını artırdığı ancak daha yüksek basınç değerlerinde özütleme sürecini olumsuz etkilediği gösterilmiştir.



Şekil 5.19. Basınç ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi (Sıcaklık: 55°C, CO₂ akış hızı: 5 L/min)

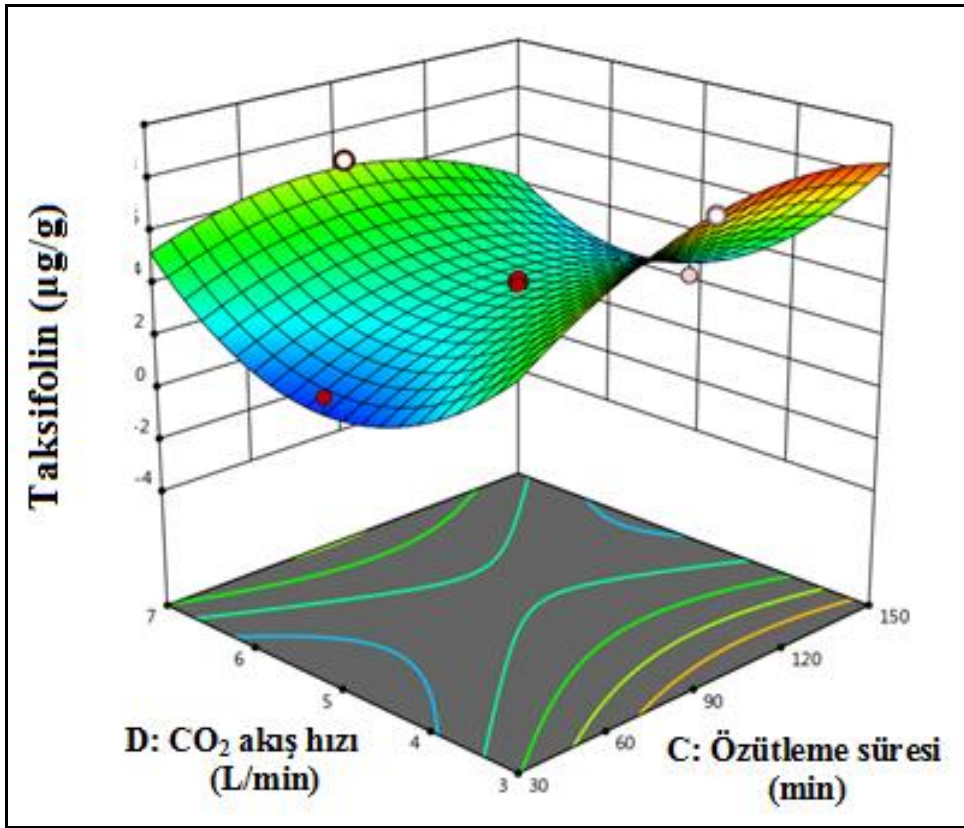
Benzer olarak bu çalışmadaki basıncın bir miktara kadar taksifolin kazanımını desteklediğine ilişkin deneysel bulgu literatürle uyumlu bulunmuştur.

Ayrıca Şekil 5.19'dan düşük basınç değerlerinde maksimum taksifolin kazanımı için daha uzun özütleme sürelerine ihtiyaç olduğu da söylenebilir. Ancak yüksek basınç değerlerinde çalışıldığında süredeki değişimlerin taksifolin kazanımına belirgin bir etkisi görülememiştir.

5.5.3. CO₂ akış hızı ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi

Şekil 5.20 incelendiğinde düşük CO₂ akış hızlarında çalışıldığında özütleme süresindeki artış taksifolin verimini olumlu yönde etkilemektedir.

Düşük akış hızında çalışmak partikül içi difüzyon direncine baskın gelip karbondioksitin matrikse daha iyi nüfus etmesini sağlar ancak bu durumda daha uzun ekstraksiyon sürelerine ihtiyaç duyulur.



Şekil 5.20. CO₂ akış hızı ve sürenin özütlenen taksifolin miktarına etkisi (Basınç: 180 bar, Sıcaklık: 55°C)

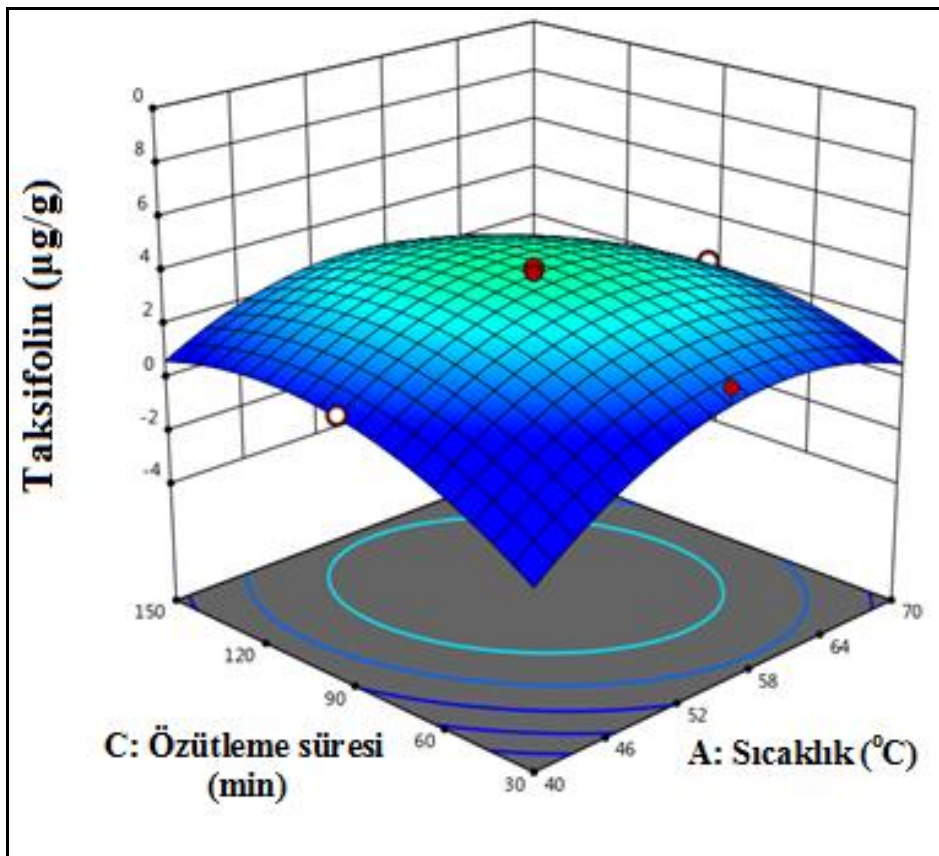
5.5.4. Sıcaklık ve özütleme süresinin özütlenen taksifolin miktarına etkisi

Şekil 5.21 incelendiğinde taksifolin kazanımını artırmak için çalışılacak sıcaklık aralığının 50°C ile 60°C arasında olması tercih edilebilir. Sıcaklıktaki artış analitin buhar basıncını artırıp çözünürlüğünü artırırsa da SK-CO₂'in yoğunluğunu düşürerek çözme gücünü

azaltmaktadır. Sıcaklığın özütleme verimini ne şekilde etkileyeceği baskın gelen etkiye göre değişmektedir.

Sıcaklıktaki artışın taksifolin özütleme verimini olumsuz yönde etkilediğine ilişkin bu bulgu Ghoreishi ve diğerleri (2016b) tarafından karaçam kabuğundan taksifolin eldesi üzerine yapılan çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Özütleme süresinin ise 60 min ile 150 min arasında olması daha yüksek taksifolin kazanımı sağlamaktadır.

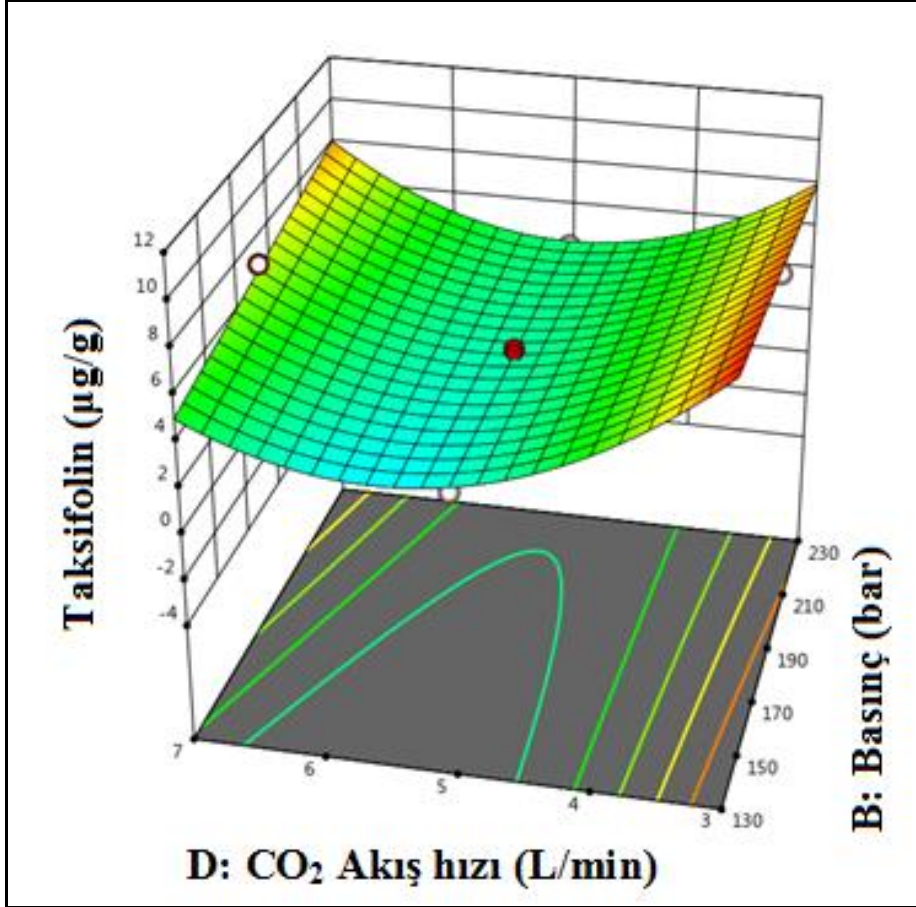


Şekil 5.21. Sıcaklık ve özütleme süresinin özütlenen taksifolin miktarına etkisi (Basınç: 180 bar, CO₂ akış hızı: 5 L/min)

5.5.5. CO₂ akış hızı ve basıncın özütlenen taksifolin miktarına etkisi

Şekil 5.22 incelendiğinde düşük basınç değerlerinde çalışıldığı durumda CO₂ akış hızının artması taksifolin verimini düşürmektedir. Taksifolin verimi özellikle düşük CO₂ akış hızlarında çalışıldığında artmaktadır ancak bu şartlarda basınçtaki değişimlerin etkisi görülememiştir.

Basınç taksifolin verimini yüksek CO₂ akış hızı değerlerinde çalışıldığı zaman daha çok etkilemektedir. Buna göre yüksek CO₂ akış hızlarında çalışıldığında taksifolin kazanımını artırmak için yüksek basınçta çalışmak gerektiği söylenebilir.



Şekil 5.22. CO₂ akış hızı ve basıncın özütlenen taksifolin miktarına etkisi (Özütleme süresi: 90 min, Sıcaklık: 55°C)

5.6. Apigenin Miktarı İçin Önerilen Modelin Analizi ve Çalışma Parametrelerinin Etkisi

Design Expert 12 programı tarafından belirlenen çalışma algoritması izlenerek deneyler yapılmış ve Çizelge 5.11'de verilen apigenin miktarları bulunmuştur. Çizelge 5.11 incelendiğinde en yüksek apigenin miktarına A: 40°C, B: 230 bar, C: 150 min ve D: 7 L/min şartlarında çalışılan 6. deneyde ulaşılmış ve apigenin miktarı 1,347 µg/g olarak bulunmuştur.

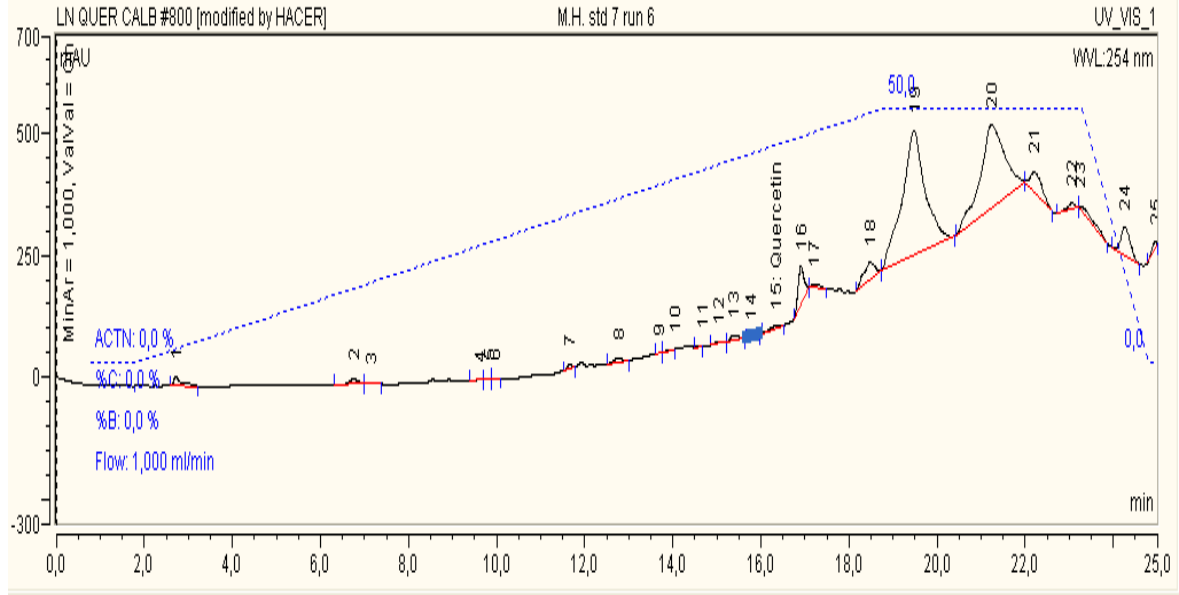
Şekil 5.23 'de 6. deneye ait HPLC kromatogramı verilmiştir. Program tarafından önerilen ve deneysel verilerin uyumluluk gösterdiği daraltılmış lineer modelin varyans analizi sonuçları Çizelge 5.12'de verilmiştir.

Çizelge 5.11. Deneysel çalışma sonucu bulunan apigenin miktarları

Deneysel No	A	B	C	D	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütlenme Süresi (min)	CO ₂ Akış hızı (L/min)	Apigenin (µg/g)
1	0	0	0	0	55	180	90	5	0,693
2	0	0	0	-1	55	180	90	3	0,721
3	0	+1	0	0	55	230	90	5	0,947
4	+1	-1	-1	+1	70	130	30	7	0,322
5	-1	-1	+1	-1	40	130	150	3	0,724
6	-1	+1	+1	+1	40	230	150	7	1,347
7	-1	+1	-1	+1	40	230	30	7	1,199
8	0	0	-1	0	55	180	30	5	0,874
9	0	0	0	0	55	180	90	5	0,576
10	0	0	0	0	55	180	90	5	0,604
11	-1	-1	-1	-1	40	130	30	3	0,321
12	0	0	0	0	55	180	90	5	0,584
13	+1	+1	+1	-1	70	230	150	3	0,854
14	-1	0	0	0	40	180	90	5	0,761
15	0	-1	0	0	55	130	90	5	0,496
16	+1	0	0	0	70	180	90	5	0,590
17	+1	+1	-1	-1	70	230	30	3	0,429
18	0	0	+1	0	55	180	150	5	0,747
19	0	0	0	+1	55	180	90	7	0,823
20	0	0	0	0	55	180	90	5	0,714
21	+1	-1	+1	+1	70	130	150	7	0,483

ANOVA (varyans) analizi sonucuna göre önerilen modelin F ve p değerleri sırasıyla 21,54 ve $< 0,0001$ olarak bulunmuştur. Bu değerler modelin geçerli olduğunu ve gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir F değeri çıkma ihtimalinin % 0,01 olduğunu göstermektedir. Hesaplanan Uyum Eksikliği p değeri ise 0,1057 olarak bulunmuştur. Bu değer model uyumsuzluğunun anlamsız olduğunu göstermektedir.

Modeldeki terimlerden p değeri 0,05 küçük olanlar anlamlı kabul edilmektedir. Buna göre Program tarafından önerilen modeldeki terimlerin p değerlerini incelediğimizde sıcaklık (A), basınç (B) ve CO₂ akış hızı (D) apigenin özütleme miktarını etkileyen en önemli parametreler olduğu görülmüştür.



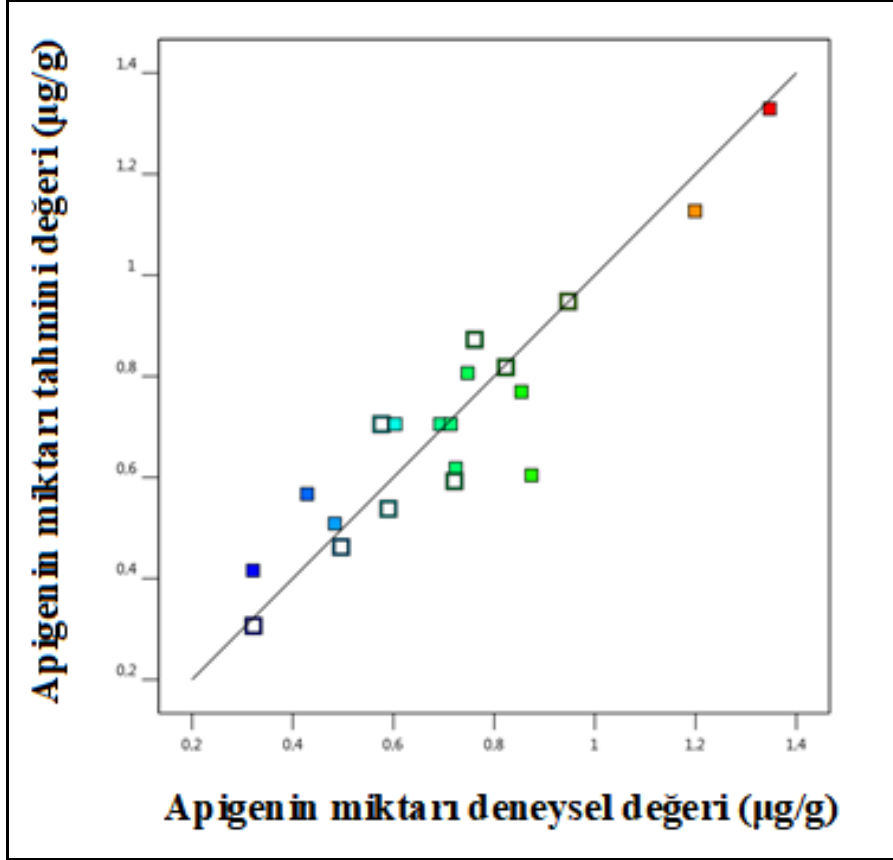
Şekil 5.23 Apigenin veriminin yüksek olduğu 6. deneyin HPLC kromatogramı

Çizelge 5.12. Apigenin miktarı için oluşturulan modelin varyans analizi sonuçları

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	1,10	4	0,2748	21,54	< 0,0001	Önemli
A-Sıcaklık	0,2801	1	0,2801	21,95	0,0002	
B-Basınç	0,5901	1	0,5901	46,25	< 0,0001	
C-Özütleme süresi	0,1022	1	0,1022	8,01	0,0121	
D-CO ₂ akış hızı	0,1268	1	0,1268	9,94	0,0062	
Artık	0,2041	16	0,0128			
Uyum Eksikliği	0,1875	12	0,0156	3,76	0,1057	Önemli değil
Hata	0,0166	4	0,0042			
Toplam	1,30	20				

Her ne kadar özütleme süresine (C) ait p değeri 0,05'den düşük olsa da diğer parametrelere ait p değerinden daha yüksek olduğu için süredeki değişimlerin apigenin kazanımına etkisinin daha düşük olacağı söylenebilir. Bu bulgu, sadece özütleme süresinin değiştiği 6. ve 7. deneylerin karşılaştırmasını yaptığımızda da görülebilir.

Apigenin miktarı için önerilen modelin regresyon katsayısı 0,84 olarak bulunmuştur. Buna göre model tarafından tahmin edilen değerler ile deneysel verilerin ilişkisini gösteren grafik Şekil 5.24'te verilmiştir.



Şekil 5.24. Apigenin miktarı için önerilen modelin tahmini verileri ile deney verilerinin ilişkisi

Apigenin miktarını sıcaklık, basınç, özütlenme süresi ve CO₂ akış hızı parametrelerinin birer fonksiyonu olarak veren modelin eşitliği gerçek ve kodlanmış değerler cinsinden Eş. 5.9 ve Eş. 5.10'da sırasıyla verilmiştir.

$$\text{Apigenin } (\mu\text{g/g}) = + 0,01124 - 0,01116 \cdot \text{Sıcaklık} + 0,0049 \cdot \text{Basınç} + 0,0017 \cdot \text{Özütlenme süresi} + 0,0563 \cdot \text{CO}_2 \text{ akış hızı} \quad (5.9)$$

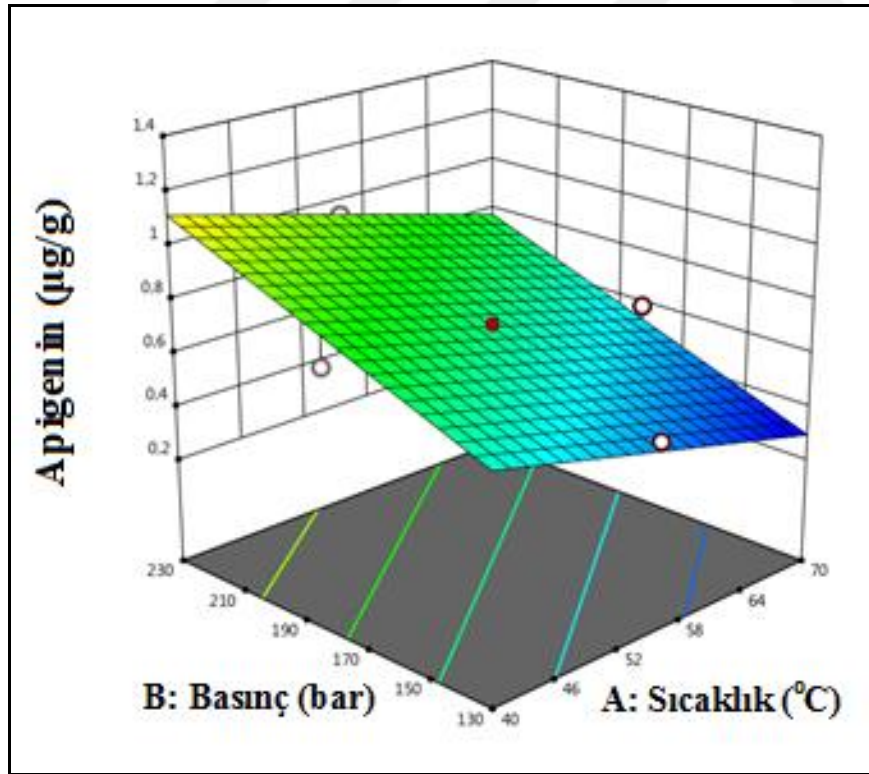
$$\text{Apigenin } (\mu\text{g/g}) = + 0,7052 - 0,1674 \cdot A + 0,2429 \cdot B + 0,1011 \cdot C + 0,1126 \cdot D \quad (5.10)$$

Eş. 5.10 incelendiğinde sıcaklığa ait katsayının negatif olması sıcaklık artışının apigenin kazanımını olumsuz etkileyeceğini göstermektedir. Bu sebeple maksimum miktarda

apigenin eldesi için düşük sıcaklıklarda çalışmak tercih edilebilir. Basınç, özütleme süresi ve CO₂ akış hızına ait katsayıların pozitif olması ise maksimum miktarda apigenin eldesi için bu parametrelerin yüksek değerinde çalışılması gerektiğini göstermektedir. İşlem parametrelerinin katsayılarını karşılaştırdığımızda basınca ait katsayı daha büyük olduğundan apigenin miktarını etkileyen en önemli parametre olduğu ve yüksek basınçlarda çalışılması halinde özütlenecek apigenin miktarının daha fazla olacağı söylenebilir. Bu noktada deneysel verileri tekrar incelediğimizde apigenin miktarının maksimuma ulaştığı 6. deneyde 40°C, 230 bar, 150 min ve 7 L/min koşullarında çalışmıştır. Alınan deneysel sonuçla modelin birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

5.6.1. Basınç ve sıcaklığın özütlenen apigenin miktarına etkisi

Apigenin miktarının sıcaklık ve basınçla değişimini gösteren Şekil 5.25'te yer alan grafik incelendiğinde artan sıcaklıkla özütlenen apigenin miktarında azalma olduğu basınç arttığında ise özütlenen apigenin miktarında artış olduğu görülmüştür.



Şekil 5.25. Basınç ve sıcaklığın özütlenen apigenin miktarına etkisi (Özütleme süresi: 90 min, CO₂ akış hızı: 5 L/min)

Literatürde süperkritik CO₂'in yoğunluğu ve çözme gücünün yüksek basınç ve düşük sıcaklıklarda arttığı belirtilmektedir. Artan yoğunluk moleküller arası uzaklığın azalmasını böylece analit ile karbondioksit arasındaki artan etkileşim sayesinde çözünürlüğün de artmasını sağlamaktadır. Bimakr ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmada içlerinde apigeninin de olduğu biyoaktif flavonoidlerin süperkritik CO₂ ekstraksiyonu çalışmış ve 209,39 bar'a artan basıncın özütlenme verimini artırdığı görülmüştür.

5.7. Yüzey Cevap Metodu Optimizasyon Sonuçları

Özütlenme sürecine etkisi incelenen bağımsız parametreler sıcaklık, basınç, özütlenme süresi ve CO₂ akış hızı olarak belirlenmiştir. Bu kısma kadar ardıç bitkisi meyvelerinden kuersetin, kemferol, taksifolin, silibinin ve apigenin ilaç etken maddelerinin süperkritik CO₂ ile özütlenmesi sürecine etki eden parametreler ayrı ayrı incelenmiş ve her bir ilaç etken maddesinin maksimum miktarına ulaştığı deneysel şartlar belirlenmiştir. Yüzey cevap metodu kullanılarak ilaç etken maddelerinin özütlenme miktarını veren modeller oluşturulmuş ve istatistikî anlamı değerlendirilmiştir.

Bu kısımda oluşturulan matematiksel modeller doğrultusunda belirlenen optimum çalışma şartları ile deneysel verilerin uyumu karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma tablosu Çizelge 5.13'te verilmiştir. Optimum çalışma şartları belirlenirken Design Expert programından yararlanılmıştır. Bunun için bağımsız parametrelerin çalışma aralığında olması ve ilaç etken maddesi miktarlarının maksimize edilmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 5.13 incelendiğinde kuersetin için oluşturulan modelin önerdiği optimum çalışma şartlarının ve bu şartlarda çalışıldığında elde edilecek kuersetin miktarının (1,824 µg/g) deneysel bulgu (1,777 µg/g) ile uyumlu olduğu görülmüştür. Model maksimum kuersetin eldesi için deneysel çalışma şartına göre daha düşük basınçta çalışılmasını önermiştir. Bu sonucun sıcaklık-basınç ikilisinin kuersetin kazanımına çapraz yönlü etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bkz. Bölüm 5.2.1).

Kemferol modelinin önerdiği optimum çalışma şartları ve kemferol miktarının (5,308 µg/g) deneysel bulgu (5,143 µg/g) ile uyumlu olduğu görülmüştür. Model maksimum kemferol eldesi için deneysel çalışma şartına göre daha uzun özütlenme süresinde çalışılmasını önermiştir. Li ve diğerleri (2010) tarafından yapılan çalışmada özütlenme

süresindeki artışın kemferol verimini artırdığı görülmüştür. Kemferol için alınan bu sonucun (Bkz. Şekil 5.10) deneysel veriler ve literatürle uyumlu olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 5.13. Model tarafından belirlenen optimum koşullar ile deneysel sonuçların karşılaştırması

Etken Madde	Optimizasyon Yöntemi	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Özütleme Süresi (min)	CO ₂ akış hızı (L/min)	Miktar (µg/g)
Kuersetin	Deneysel opt.	55	180	90	7	1,777
	Model opt.	53,2	165,4	90,5	7	1,824
Kemferol	Deneysel opt.	55	230	90	5	5,143
	Model opt.	59,1	228,2	120	6,5	5,308
Silibinin	Deneysel opt.	70	130	150	7	21,017
	Model opt.	69	135,2	94	4,9	21,017
Taksifolin	Deneysel opt.	40	130	150	3	9,304
	Model opt.	51,7	166,9	127,8	3	9,304
Apigenin	Deneysel opt.	40	230	150	7	1,347
	Model opt.	40	230	150	7	1,329

Silibinin modelinin önerdiği optimum çalışma şartları incelendiğinde özütleme süresi ve CO₂ akış hızının deneysel bulgulardan daha düşük değere sahip olduğu görülmüştür. Bu şartlarda çalışıldığında ise özütlenecek silibinin miktarının deneysel çalışmayla aynı olacağı görülmektedir. Modelin varyans analizi sonuçları (Bkz. Çizelge 5.8) ve Eş. 5.6 incelendiğinde silibinin kazanımı üzerine sıcaklık ve basıncın önemi çok daha fazladır. Daha kısa özütleme süresi ve CO₂ akış hızında çalışmanın enerji ve kaynak maliyetini düşüreceği yönünde değerlendirilmektedir.

Taksifolin modelinin önerdiği optimum çalışma şartlarını incelediğimizde sıcaklık ve basınç maksimum taksifolin kazanımının elde edildiği deneysel şartlardan daha yüksek, özütleme süresinin ise daha kısa olduğu görülmüştür. Bu şartlarda çalışıldığında ise özütlenecek taksifolin miktarının deneysel çalışmayla aynı olacağı görülmektedir. Modelin varyans analizi sonuçları (Bkz. Çizelge 5.10) incelendiğinde taksifolin kazanımı üzerine CO₂ akış hızının lineer ve kuadratik etkisi daha önemlidir.

Apigenin modelinin önerdiği optimum çalışma şartları ve bu şartlardaki apigenin kazanımı deneysel olarak bulunan optimum şartlar ve miktarla aynıdır. Apigenin modelinin deneysel veriler ile uyumlu olduğu görülmüştür.

5.8. Deneysel Sonuçların Sokslet Ekstraksiyonu ile Karşılaştırması

Gamze Çiftçi tarafından yapılan lisans araştırma projesi kapsamında boylu ardıç meyveleri sokslet yöntemi ile özütlenmiş ve içeriğinde bulunan flavonoidlerin (kuersetin, rutin, apigenin, kemferol ve silibinin) HPLC ile analizleri yapılmıştır. Özütleme işlemi öncesinde ardıç meyveleri 3 gün süreyle 30°C'de kurutulmuş ve bitki değirmeninde öğütüldükten sonra 0,710 mm – 0,350 mm arasında olacak şekilde boyut sınıflandırması yapılmıştır. Daha sonra 5'er gram numunenin sabit 78°C ± 5°C sıcaklıkta sokslet ekstraksiyonu yapılmıştır. Optimize edilecek çalışma parametreleri etanol yüzdesi (% 70 - 95) ve özütleme süresi (60 – 300 min) olarak belirlenmiş ve bu parametrelerin özüt hacmine etkisi incelenmiştir. Maksimum flavonoid verimi elde etmek için seçilen parametrelerin optimizasyonu yüzey cevap metodu ile yapılmıştır. Buna göre azalan etanol yüzdesi ve artan sürenin özütteki rutin, kemferol ve silibinin miktarını artan yönde etkilediği görülmüş ve optimum çalışma koşullarının %70 etanol oranı ve 300 min olduğu bulunmuştur. Design Expert 11 programı tarafından bu flavanoidler için lineer model önerilmiştir. Bulunan optimum çalışma koşullarında yapılan sokslet ekstraksiyonu sonucu rutin, kemferol ve silibinin miktarı sırasıyla 254,4 µg/g, 19,7 µg/g ve 15,1 µg/g olarak tespit edilmiştir. Kuersetin ve apigenin için ise anlamlı bir model üretilmemiş ancak yapılan deneysel çalışmalarda % 82,5 etanol oranı ve 180 dakika şartlarında yapılan deneylerde maksimum kuersetin ve apigenin miktarına ulaşıldığı, kuersetin ve apigenin miktarının sırasıyla 10,0 µg/g ve 285,4 µg/g olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında yapılan süperkritik karbondioksit ekstraksiyon sonuçları ile lisans araştırma projesi kapsamında yapılan sokslet ekstraksiyon sonuçlarını karşılaştırdığımızda literatüre uygun olarak sokslet ile daha fazla miktarda özüt elde edildiği görülmüştür. SK-CO₂ ile sokslet tekniğine kıyasla daha fazla miktarda silibinin özütlendiği ancak rutin özütlenemediği görülmüştür. Sokslet özütlerinde rutin varlığı tespit edilmişken SK-CO₂ özütlerinde görülmemesinin ana sebebinin kullanılan etanol miktarındaki farklılık olduğu düşünülmüştür. Etanol yüzdesi arttıkça özütlenen rutin miktarının artması beklenmektedir.

Ancak bunun doğruluğunu tespit edebilmek için süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak etanol miktarındaki değişimlerin rutin verimine etkisini incelemek gereklidir.



6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında *Juniperus excelsa* (Boylu ardıç) meyvelerinden kuersetin, apigenin, kempferol, silibinin ve taksifolin ilaç etken maddelerinin miktarını maksimize eden süperkritik CO₂ ekstraksiyonu optimum çalışma şartlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Süperkritik CO₂ özütlemesi düşük sıcaklık değerlerinde çalışma imkânı sağlaması, yanıcı ve patlayıcı olmaması, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, özüt içerisinde kalıntı bırakmaması ve seçiciliğinin kontrol edilebilir olması gibi avantajları nedeniyle geleneksel özütleme yöntemlerinin yerine tercih edilmektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında ardıç bitkisinden süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yöntemiyle uçucu yağların özütlenmesine yönelik çalışmaların olduğu ancak flavonoidler gibi ilaç etken maddelerinin bu yöntemle özütlenmesinin çalışılmadığı görülmüştür.

Bu amaçla deneylerde kullanılacak ardıç meyveleri öncelikle neminden uzaklaştırılmış ve partikül boyutu 0,425 – 0,600 mm arasında olacak şekilde öğütülmüştür. Optimize edilecek bağımsız parametreler sıcaklık (40-70 °C), basınç (130-230 bar), özütleme süresi (30-150 min) ve süperkritik CO₂ akış hızı (3-7 L/min) olarak belirlenmiştir. Çalışma parametrelerinin özütlenen ilaç etken madde miktarına etkileri araştırılmıştır. Deneyler boyunca kosolvent olarak kullanılan etanolün karbondioksit akışındaki kütlece oranı %2’de sabit tutulmuştur.

“Design Expert 12” deneysel tasarım programında Yüzey cevap metodu, yüz merkezli kompozit tasarım kullanılarak 21 deneyin sıcaklık, basınç, ekstraksiyon süresi ve CO₂ akış hızı değerleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen özütlerin içerisindeki ilaç etken maddelerinin (kuersetin, apigenin, kemferol, silibinin ve taksifolin) kalitatif ve kantitatif analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır.

Deneysel çalışmalar sonucunda kuersetinin miktarının maksimuma ulaştığı çalışma şartlarının 55 °C sıcaklık, 180 bar basınç, 90 min özütleme süresi ve 7 L/min CO₂ akış hızı

olduğu tespit edilmiştir. Bu şartlarda çalışıldığında özütlenen kuersetin miktarı 1,777 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Deneysel tasarım programı kuersetin için daraltılmış kuadratik model önermiş, modelin regresyon katsayısı 0,88 olarak bulunmuştur. Kuersetin miktarını etkileyen en önemli parametrenin CO_2 akış hızı olduğu grlmştir.

Kemferol miktarının maksimumuna ulaştığı çalışma şartlarının ise 55 $^\circ\text{C}$ sıcaklık, 230 bar basınç, 90 min özütleme süresi ve 5 L/min CO_2 akış hızı olduğu tespit edilmiştir. Bu şartlarda çalışıldığında özütlenen kemferol miktarı 5,143 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Deneysel tasarım programı kemferol için daraltılmış kuadratik model önermiş, modelin regresyon katsayısı 0,94 olarak bulunmuştur. Kemferol miktarını etkileyen en önemli parametrenin basınç olduğu grlmştir.

Silibinin miktarının maksimumuna ulaştığı çalışma şartları 70 $^\circ\text{C}$ sıcaklık, 130 bar basınç, 150 min özütleme süresi ve 7 L/min CO_2 akış hızı olduğu tespit edilmiştir. Bu şartlarda çalışıldığında özütlenen silibinin miktarı 21,017 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Deneysel tasarım programı silibinin için daraltılmış kuadratik model önermiş, modelin regresyon katsayısı 0,92 olarak bulunmuştur. Silibinin miktarını etkileyen en önemli parametrelerin sıcaklık ve basınç olduğu grlmştir.

Taksifolin miktarının maksimumuna ulaştığı çalışma şartları 40 $^\circ\text{C}$ sıcaklık, 130 bar basınç, 150 min özütleme süresi ve 3 L/min CO_2 akış hızı olduğu tespit edilmiştir. Bu şartlarda çalışıldığında özütlenen taksifolin miktarı 9,304 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Deneysel tasarım programı taksifolin için daraltılmış kuadratik model önermiş, modelin regresyon katsayısı 0,98 olarak bulunmuştur. Taksifolin miktarını etkileyen en önemli parametrenin CO_2 akış hızı olduğu grlmştir.

Apigenin miktarının maksimumuna ulaştığı çalışma şartları 40 $^\circ\text{C}$ sıcaklık, 230 bar basınç, 150 min özütleme süresi ve 7 L/min CO_2 akış hızı olduğu tespit edilmiştir. Bu şartlarda çalışıldığında özütlenen apigenin miktarı 1,347 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Deneysel tasarım programı apigenin için lineer model önermiş, modelin regresyon katsayısı 0,84 olarak bulunmuştur. Apigenin miktarını etkileyen en önemli parametrenin basınç olduğu grlmştir.

Beş ilaç etken maddesi için geliştirilen modellerin ön gördüğü optimum çalışma şartları ve özütlenme miktarları ile deneysel sonuçlar büyük oranda uyumlu bulunmuştur. Ardıç bitkisinden çevre dostu süperkritik CO₂ ekstraksiyon tekniği kullanarak maksimum miktarda ilaç etken maddesinin özütlenmesi için belirlenen bu çalışma şartları kullanılabilir.

Yapılan HPLC analizleri kapsamında özütlerin içerisinde rutin bileşiğinin varlığı da araştırılmış ancak bulunamamıştır. Bunun, rutin bileşiğinin diğer bileşiklere kıyasla daha yüksek moleküler ağırlığa ve polariteye sahip olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Literatürde rutin bileşiğinin geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle ardıç bitkisi özütlerinde varlığı tespit edilmiştir. Süperkritik CO₂ ile özütlenmesi için ise daha yüksek oranda kolsolvent varlığında yüksek basınç değerlerinde çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

Ülkemiz ormanlarının % 4,58'ini oluşturan ardıç ağacının ekonomik değerinin artırılması için meyvelerinin katma değeri yüksek ürünler üretmek üzere kullanılabileceği ve insan sağlığına faydalı etken madde kaynağı olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir. Ardıç meyveleri gibi bitkisel kaynaklardan süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilecek özütler ilaç endüstrisinde, gıda endüstrisinde, gıda takviyelerinde veya fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilir.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında elde edilen bulguların ileride yapılacak in-vivo çalışmalara ışık tutacağı, literatür, bilim ve teknolojiye önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Akkol, E. K., Güvenç, A. ve Yesilada, E. (2009). A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2), 330-336.
- Aliev, A. M., Radjabov, G. K., and Musaev, A. M. (2015). Dynamics of supercritical extraction of biological active substances from the *Juniperus communis* var. *saxatillis*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 102, 66-72.
- Asili, J., Emami, S. A., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B. S., and Hassanzadeh, M. K. (2008). Chemical and antimicrobial studies of *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* and *Juniperus excelsa* subsp. *polycarpos* essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(3), 292-302.
- Atanur, O. M., (2008). *Ganoderma lucidum* mantarlarından konvansiyonel ve süperkritik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlerin bileşenlerinin tanımlanması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bais, S., Gill, N. S., Rana, N., and Shandil, S. (2014). A phytopharmacological review on a medicinal plant: *Juniperus communis*. *International scholarly research notices*, 2014, 634723.
- Barjaktarović, B., Sovilj, M. and Knez, Ž. (2005). Chemical composition of *Juniperus communis* L. fruits supercritical CO₂ extracts: dependence on pressure and extraction time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2630-2636.
- Ben Salah H., Allouche N. (2019) Plant-Based Chemicals Extraction and Isolation. In: Li Y., Chemat F. (Eds) *Plant Based "Green Chemistry 2.0"*. *Green Chemistry and Sustainable Technology*. Springer, Singapore, 89-117.
- Bilgiç-Keleş, S., Şahin-Yeşilçubuk, N., Barla-Demirkoz, A. and Karakaş, M. (2019). Response surface optimization and modelling for supercritical carbon dioxide extraction of *Echium vulgare* seed oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 143, 365-369.
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Ganjloo, A., Taip, F. S., Salleh, L. M., and Sarker, M. Z. I. (2012). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 912-920.
- Cansell, F., Aymonier, C., and Loppinet-Serani, A. (2003). Review on materials science and supercritical fluids. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4-5), 331-340.
- Carus, S. (2004). Isparta-Sütçüler Yöresi Boylu Ardıç (*Juniperus Excelsa* Bieb.) Meşcerelerinde Artım ve Büyüme. *Türkiye Ormanlık Dergisi*, 5(1), 19-36.

- Çelik, H. T. (2014). *Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu İle Deve Dikeninden İlaç Etken Maddelerinin Özütleme*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çelik, H. T. ve Gürü, M. (2015). Extraction of oil and silybin compounds from milk thistle seeds using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 100, 105-109.
- Chen, A. Y., and Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138(4), 2099-2107.
- De Melo, M. M. R., Silvestre, A. J. D., and Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176.
- De Zordi, N., Cortesi, A., Kikic, I., Moneghini, M., Solinas, D., Innocenti, G., Portolan, A., Baratto, G. and Dall'Acqua, S. (2014). The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from propolis: a central composite design approach. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 491-498.
- Değirmencioğlu, A. ve Yazgı, A. (2006). Tepki Yüzeyleri Metodolojisi" Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları". *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 2(2), 111-115.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Ekinci, M. S., Gürü, M. (2014). Extraction of oil and β -sitosterol from peach (*Prunus persica*) seeds using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 319-323.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10), 851-874.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., and Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941-1953.
- García, J., Rodríguez, F., and Revenga, J. A. (2000). Modelling solubility of solids in supercritical fluids using response surface methodology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 75(3), 245-251.

- Ghoreishi, S. M., Hedayati, A., and Mousavi, S. O. (2016a). Quercetin extraction from *Rosa damascena* Mill via supercritical CO₂: Neural network and adaptive neuro fuzzy interface system modeling and response surface optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 112, 57-66.
- Ghoreishi, S. M., Hedayati, A., Mohammadi, S. (2016b). Optimization of periodic static-dynamic supercritical CO₂ extraction of taxifolin from *pinus nigra* bark with ethanol as entrainer, *The Journal of Supercritical Fluids*, 113, 53-60.
- Ignat, I., Volf, I., and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Khaw, K. Y., Parat, M. O., Shaw, P. N., and Falconer, J. R. (2017). Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review. *Molecules*, 22(7), 1186.
- Larkeche O., Zermanea, A., Meniaia, A.-H., Crampon, C., Badens, E. (2015). Supercritical extraction of essential oil from *Juniperus communis* L. needles: Application of response surface methodology, *The Journal of Supercritical Fluids*, 99, 8–14.
- Lesjak, M. M., Beara, I. N., Orčić, D. Z., Petar, K. N., Simin, N. Đ., Emilija, S. Đ., and Mimica-Dukić, N. M. (2014). Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. *Journal of Functional Foods*, 7, 257-268.
- Li, B., Xu, Y., Jin, Y. X., Wu, Y. Y., and Tu, Y. Y. (2010). Response surface optimization of supercritical fluid extraction of kaempferol glycosides from tea seed cake. *Industrial Crops and Products*, 32(2), 123-128.
- Liu, Q., Li, D., Wang, W., Wang, D., Meng, X., and Wang, Y. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils and Methanol Extracts of Different Parts from *Juniperus rigida* Siebold & Zucc. *Chemistry & Biodiversity*, 13(9), 1240-1250.
- Loizzo, M. R., Saab, A. M., Tundis, R., Statti, G. A., Menichini, F., Lampronti, I., and Doerr, H. W. (2008). Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chemistry & Biodiversity*, 5(3), 461-470.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Conforti, F., Saab, A. M., Statti, G. A., and Menichini, F. (2007). Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry*, 105(2), 572-578.
- Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., and Goto, M. (2007). *Effect of Supercritical Carbon Dioxide Condition on Extraction of Carotenoids and Seed Oil from Rosehip Fruits*. In Proceeding of the International Symposium on EcoTopia Science, Kumamoto, Japan.

- Marongiu, B., Porcedda, S., Caredda, A., Piras, A., Vargiu, L., Mascia, V., Cadeddu, A., and Loddo, R. (2004). Isolation of *Juniperus phoenicea* volatiles by supercritical carbon dioxide extraction and bioactivity assays. *Journal of Essential Oil Research*, 16(3), 256-261.
- Martinez, J. L. (Editör). (2007). *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, Boca Raton FL: CRC Press, 275–304.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., ... and Taviano, M. F. (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6570-6577.
- Nguyen, H. N., Pag-asa, D. G., Maridable, J. B., Malaluan, R. M., Hinode, H., Salim, C. and Huynh, H. K. (2011). Extraction of oil from *Moringa oleifera* kernels using supercritical carbon dioxide with ethanol for pretreatment: Optimization of the extraction process. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11-12), 1207-1213.
- Nuralın, L., Tosun, A., Erol, F., Akgün, F. B. ve Gürü, M. (2017). Süperkritik CO₂ özütlemesi ile iğde çekirdeklerinden quercetin miktarının yüzey cevap metodu ile optimizasyonu. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32(4).
- Nuralın, L. (2018). *Yağlı tohumlardan süperkritik karbon dioksit yöntemiyle ilaç etken bileşenlerinin özütlenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Nyam, K. L., Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K., and Man, Y. B. C. (2011). Optimization of supercritical CO₂ extraction of phytosterol-enriched oil from Kalahari melon seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1432-1441.
- Orhan, N., Aslan, M., Demirci, B., and Ergun, F. (2012). A bioactivity guided study on the antidiabetic activity of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 409-415.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Pasquali, I. (2007). *Microparticulate Drug Delivery Systems Based On Hydrophilic Polymers Obtained With A Supercritical CO₂ Process*, Ph. D. Thesis, Ciclo.
- Peng, W. L., Mohd-Nasir, H., Setapar, S. H. M., Ahmad, A., and Lokhat, D. (2019). Optimization of process variables using response surface methodology for tocopherol extraction from Roselle seed oil by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 143(2020), 111886.
- Pourmortazavi, S. M., and Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163(1-2), 2-24.

- Rai, A., Mohanty, B. and Bhargava, R. (2016). Supercritical extraction of sunflower oil: A central composite design for extraction variables. *Food Chemistry*, 192, 647-659.
- Reverchon, E., and De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.
- Sadeghi, A. H., Emami, A., Saeidi, M., Sadeghi, B., and Jafarian, A. (2009). Evaluation of in vitro cytotoxic effects of *Juniperus foetidissima* and *Juniperus sabina* extracts against a panel of cancer cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(4), 281-286.
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., B. Souto, E., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., N. Setzer, W., and Martins, N. (2019). The therapeutic potential of apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1305.
- Satam, N. K., Parab, L. S., Bhagwat, A. M., and Bhoir, S. I. (2012). Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Solanum melongena* Linn. fruit and its evaluation of free radical scavenging activity. *International Journal of Biological*, 3(8), 990-5.
- Seca, A. M., and Silva, A. M. (2006). The chemical composition of the *Juniperus* genus (1970–2004). *Recent Progress In Medicinal Plants*, 16, 401-522.
- Sekiguchi, A., Motegi, S. I., Fujiwara, C., Yamazaki, S., Inoue, Y., Uchiyama, A., Akai, A., Iwawaki, T. and Ishikawa, O. (2019). Inhibitory effect of kaempferol on skin fibrosis in systemic sclerosis by the suppression of oxidative stress. *Journal of Dermatological Science*, 96(1), 8-17.
- Soković, M., Ristić, M., and Grubišić, D. (2004). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil from *Juniperus excelsa* berries. *Pharmaceutical Biology*, 42(4-5), 328-331.
- Sovova, H., and Stateva, R. P. (2011). Supercritical fluid extraction from vegetable materials. *Reviews in Chemical Engineering*, 27(3-4), 79-156.
- Takke, A., and Shende, P. (2019). Nanotherapeutic silibinin: An insight of phytomedicine in healthcare reformation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 21, 102057.
- Tavares, L., McDougall, G. J., Fortalezas, S., Stewart, D., Ferreira, R. B., and Santos, C. N. (2012). The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chemistry*, 135(2), 562-570.
- Topçu, G., Gören, A. C., Bilsel, G., Bilsel, M., Çakmak, O., Schilling, J., and Kingston, D. G. (2005). Cytotoxic Activity and Essential Oil Composition of Leaves and Berries of *Juniperus excelsa*. *Pharmaceutical Biology*, 43(2), 125-128.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

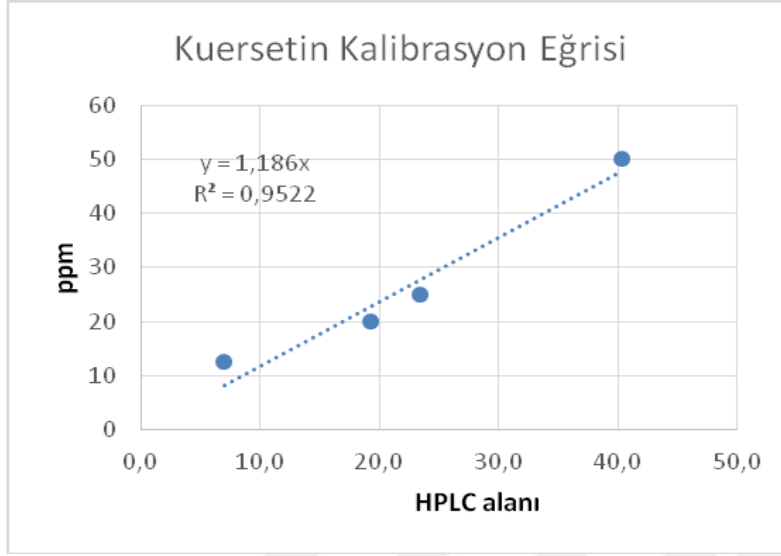
- Tümen, İ. (2010, 5-6 Haziran). *Tıbbi Bitkilerin Ekonomik Değeri: "Ardıç" Örneği*. Bitkilerle Tedavi Sempozyumunda sunuldu, İstanbul.
- Tümen, İ., Hafizoğlu, H. (2003) Türkiye’de Yetişen Ardıç (*Juniperus L.*) Türlerinin Kozalak ve Yaprak Uçucu Yağlarının Bileşiminde Bulunan Terpen Grupları. *ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi* 5 (5), 89-90.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2017). *Türkiye kanser istatistikleri*. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 44.
- Uquiche, E. L., Toro, M. T., and Quevedo, R. A. (2019). Supercritical extraction with carbon dioxide and co-solvent from *Leptocarpha rivularis*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 14, 100210.
- Ruan, X., Yan, L. Y., Li, X. X., Liu, B., Zhang, H., and Wang, Q. (2014). Optimization of process parameters of extraction of amentoflavone, quercetin and ginkgetin from *Taxus chinensis* using supercritical CO₂ plus co-solvent. *Molecules*, 19(11), 17682-17696.
- Yaglioglu, A. S., and Eser, F. (2017). Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *South African Journal of Botany*, 113, 29-33.



EKLER

EK-1. Standartların kalibrasyon eğrileri

Ardıç özütlerindeki flavonoid (kuersetin, apigenin, kemferol, silibinin ve taksifolin) miktarlarını tayin etmek üzere çizilen kalibrasyon eğrileridir.

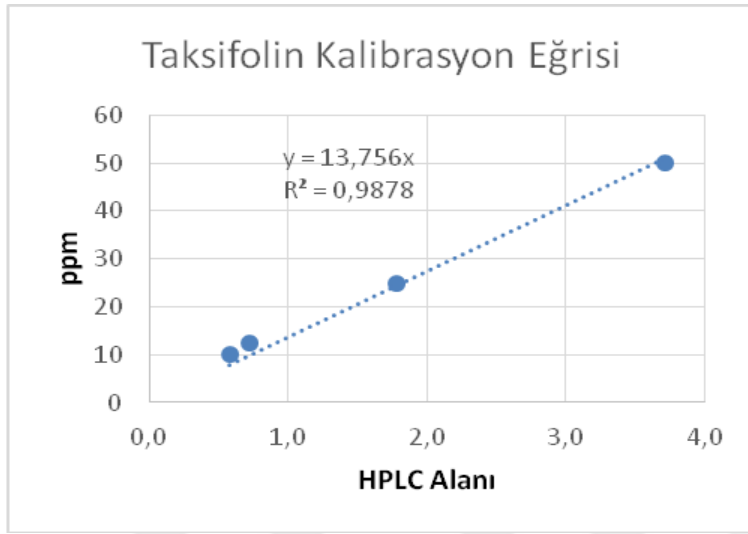


Şekil E.1. Kuersetin'in 4 farklı derişimdeki kalibrasyon eğrisi

Çizelge E.1. Kuersetin'in farklı derişimlerideki HPLC alanları

ppm	HPLC alanı
50	40,310
25	23,357
20	19,262
12,5	6,999

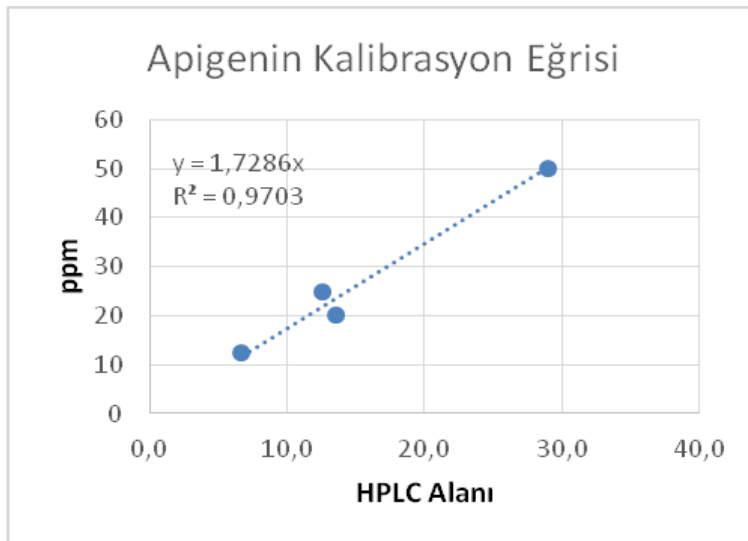
EK-1. (devam) Standartların kalibrasyon eğrileri



Şekil E.2. Taksifolin'in 4 farklı derişimdeki kalibrasyon eğrisi

Çizelge E.2. Taksifolin'in farklı derişimlerindeki HPLC alanları

ppm	HPLC Alanı
10	0,580
12,5	0,721
25	1,778
50	3,713

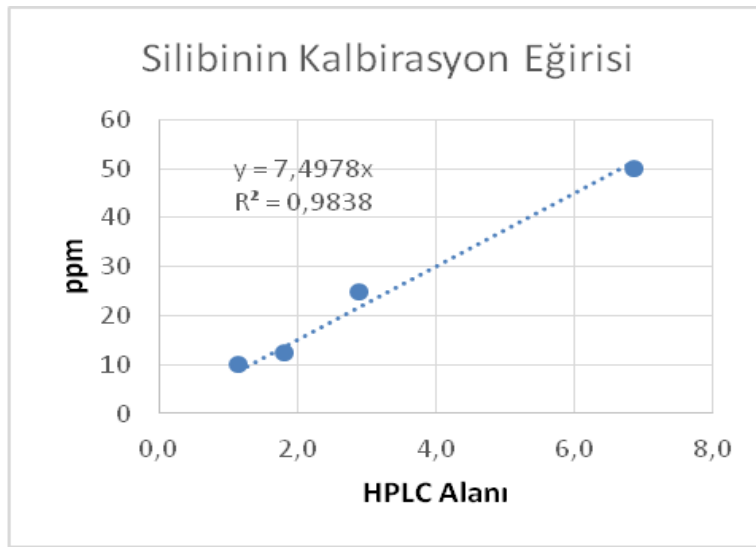


Şekil 1.3. Apigenin'in 4 farklı derişimdeki kalibrasyon eğrisi

EK-1. (devam) Standartların kalibrasyon eğrileri

Çizelge E.3. Apigenin'in farklı derişimlerdeki HPLC alanları

ppm	HPLC Alanı
50	28,963
25	12,534
20	13,537
12,5	6,705

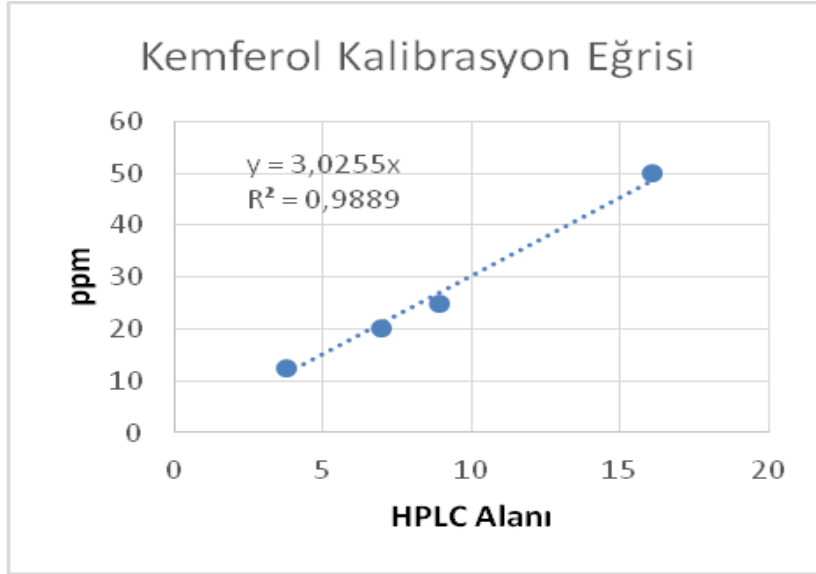


Şekil E.4. Silibinin'in 4 farklı derişimdeki kalibrasyon eğrisi

Çizelge E.4. Silibinin'in farklı derişimlerdeki HPLC alanları

ppm	HPLC Alanı
50	6,854
25	2,881
12,5	1,803
10	1,156

EK-1. (devam) Standartların kalibrasyon eğrileri



Şekil E.5. Kemferol'ün 4 farklı derişimdeki kalibrasyon eğrisi

Çizelge E.5. Kemferol'ün farklı derişimlerideki HPLC alanları

ppm	HPLC Alanı
12,5	3,74725
20	6,9866
25	8,9455
50	16,0726

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : HİMMETOĞLU, Esra Merih
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 05.10.1986, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (536) 358 87 95
 e-mail : merihhim@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	2010
Lise	Özel Yüce Fen Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-Halen	TÜBİTAK	Bilimsel Programlar Uzman Yardımcısı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

Himmetoğlu, E. M., Nuralın, L. ve Gürü, M. (2019). *Juniperus Excelsa M. Bieb (Boylu Ardiç) Meyvelerinden Kuersetin ve Apigenin Bileşenlerinin Süperkritik Karbondioksit ile Ekstraksiyonu*. IATENS (The International Aluminium-Themed Engineering and Natural Sciences Conference), Seydişehir.

Hobiler

Yürüyüş yapma, Yüzme, Film seyretme, Kitap okuma |



GAZİ GELECEKTİR..