



**PELEMİR TOHUMUNDAN SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT  
EKSTRAKSİYON YÖNTEMİYLE UÇUCU YAĞ VE İLAÇ ETKEN  
MADDELERİNİN EKSTRAKSİYONU**

**Sümeyye CANER**

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

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2020**

Sümeyye CANER tarafından hazırlanan “PELEMİR TOHUMUNDAN SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT EKSTRAKSİYON YÖNTEMİYLE UÇUCU YAĞ VE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN EKSTRAKSİYONU” 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.

.....

**İkinci Danışman:** 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.

.....

**Başkan:** Prof. Dr. M. Atilla MURATHAN

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

**Üye:** Doç. Dr. Fatih AKKURT

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

**Üye:** Doç. Dr. İbrahim BİLİCİ

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Hitit Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin 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.

Sümeyye CANER

24/06/2020

PELEMİR TOHUMUNDAN SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT EKSTRAKSİYON  
YÖNTEMİYLE UÇUCU YAĞ VE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN  
EKSTRAKSİYONU  
(Yüksek Lisans Tezi)

Sümeyye CANER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2020

ÖZET

Antioksidan hem vücut hücrelerinin ürettiği hem de gıdalarda bulunan beslenme ile alabildiğimiz kimyasal maddelerdir. Kararsız ve çok reaktif olan serbest radikallerin olumsuz etkilerini azaltabilen bileşiklerdir. Gıdalarda mevcut olan doğal antioksidanların çeşitli bitkilerden elde edilmesinden dolayı bu antioksidanlara olan ilgi son yıllarda artmıştır. Flavonoidler bitkisel fenolik yapıdaki doğal antioksidanlar arasındadır. Çeşitli pelemir türlerinin yapılarında flavonoidler, saponinler ve iridoit glikozit bileşenlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılarındaki bu yararlı bileşenler sayesinde çeşitli kanser hastalıklarının tedavisinde hem ucuz hem de doğal olmasından dolayı tedaviye büyük bir katkısı olacağı düşünülmektedir. Bu çalışma sıcaklık, basınç ve etanol kosolventi değiştirilip, ekstraksiyon süresi sabit tutularak verimli sonuçlar elde edebilmeyi planlamıştır. Pelemir tohumundan kuersetin, rutin, kaemferol, apigenin, silibinin ve taksifolin flavonoidlerinin tayininde ucuz, çevre dostu ve modern bir teknoloji olan süperkritik karbon dioksit ekstraksiyon yöntemi tercih edilmiştir. Deneysel çalışma şartları Design Expert 11.1.2.0 Trial programı ile yüzey cevap metodu (YCM) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstraktların HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) analizleri sonucunda maksimum flavonoid miktarları 98,28 µg rutin/g tohum, 2,59 µg silibinin/g tohum olarak bulunmuştur. Daha sonra ekstraktlarda Difenil-1 Pikrilhidrazil Radikal Tutma Kapasitesi (DPPH) metodu kullanılarak toplam antioksidan madde, Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak da toplam fenolik madde tayinleri yapılmıştır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemi olan Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır.

Bilim Kodu : 91202  
Anahtar Kelimeler : Pelemir tohumu, Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu, Yüzey cevap metodu  
Sayfa Adedi : 83  
Danışman : Prof. Dr. Metin GÜRÜ  
İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hacer İÇEN

OBTAINING OF ESSENTIAL OIL AND MEDICINE ACTIVE SUBSTANCE FROM  
CEPHALARIA SEED WITH SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION

(M. Sc. Thesis)

Sümeyye CANER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2020

ABSTRACT

Antioxidants are chemical substances that are produced by both body cells and nutrients in foods. These are compounds that can reduce the negative effects of unstable and highly reactive free radicals. Interest in antioxidants that obtain from plants and existence in foods has increased in recent years. Flavonoids are among the natural antioxidants in herbal phenolic structure. It has been determined that flavonoids, saponins and iridoit glycoside components are present in the structures of various types of *Cephalaria Syriaca*. Thanks to these beneficial components in their structure, it is believed that they will contribute greatly to the treatment of various cancer diseases since they are both cheap and natural. This study planned to achieve efficient results by changing the temperature, pressure and ethanol co-solvent and keeping the extraction time constant. In the determination of quercetin, rutin, kaemferol, apigenin, silibinin and taxifolin flavonoids from pelemir seeds, the supercritical carbon dioxide extraction method, which is a cheap, environmentally friendly and modern technology, was preferred. Experimental working conditions were determined by using the Surface Response method (YCM) with the Design Expert 11.1.2.0 Trial program. As a result of HPLC (High performance liquid chromatography) analysis of the extracts obtained, the maximum flavonoid amounts were found as 98.28 µg rutin / g seed, 2.59 µg silibinin / g seed. Then, total antioxidant substance was determined in the extracts by the Diphenyl-1 Picrilhydrazyl Radical Holding Capacity (DPPH) method, and total phenolic substance by the Folin-Ciocalteu method. The results obtained by Soxhlet extraction, which is the traditional extraction method, were compared.

Science Code : 91202

Key Words : *Cephalaria syriaca*, Supercritical carbon dioxide extraction, Response surface methods

Page Number : 83

Supervisor : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hacer İÇEN

## TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına ışık tutan saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Metin GÜRÜ'ye, tecrübeleri ve önerileri ile yol gösteren ikinci danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hacer İÇEN'e, deneyimlerini esirgemeyen hocam Öğr. Gör. Dr. Levent NURALIN'a, değerli bilgi ve tecrübeleriyle tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Canan CABBAR, Prof. Dr. Servet ÇETE, Arő. Gör. Deniz AKIN'a ve desteklerini daima hissettiğim kıymetli aileme teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. PELEMİR.....	3
2.1. Pelemir Bitkisinin Botanik Özellikleri .....	3
2.2. Pelemir Türlerinin Yapılarında Bulundurduğu Kimyasallar .....	5
2.3. Pelemir Bitkisinin Farmakolojik Etkileri.....	7
3. ANTİOKSİDAN MADDELER VE FENOLİK BİLEŞİKLER.....	9
3.1. Doğal Antioksidanlar .....	10
3.2. Yapay Antioksidanlar .....	11
3.3. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	11
3.4. Uçucu Yağlar .....	12
4. SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYONU .....	15
4.1. Süperkritik Akışkan ve Özellikleri .....	15
4.2. Süperkritik Akışkanın Seçimi .....	18
4.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonuna Etki Eden Faktörler .....	19
4.3.1. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda numune özelliklerinin etkisi .....	19
4.3.2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda sıcaklık ve basıncın etkisi.....	20



	<b>Sayfa</b>
4.3.3. Süperkritik akışkanın akış hızının etkisi.....	20
4.3.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kosolvent kullanımının etkisi ....	20
4.3.5. Süperkritik akışkan ekstraksiyon süresinin etkisi.....	21
4.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Sistemi .....	21
4.5. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Avantajları.....	23
4.6. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Dezavantajları .....	23
<b>5. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>25</b>
5.1. Pelemir Türleri ile Yapılan Çalışmalar.....	25
5.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ile Flavonoid Ekstraksiyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	27
5.3. Yüzey Cevap Yöntemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar.....	29
<b>6. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>33</b>
6.1. Kullanılan Cihazlar .....	33
6.2. Kullanılan Kimyasallar .....	33
6.3. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu.....	34
6.4. Cephalaria Syriaca Bitkisinin Fenolik Bileşenlerinin Analiz Yöntemi .....	37
6.4.1. HPLC yöntemi.....	37
6.4.2. Soxhlet yöntemi.....	39
6.4.3. UV-VIS spektrofotometre yöntemi .....	40
6.5. Deneysel Tasarım Yöntemi .....	43
<b>7. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>45</b>
7.1. Yüzey Cevap Metoduyla Matematiksel Modelleme .....	45
7.2. Pelemir Tohumundan Süperkritik CO <sub>2</sub> ile Rutin Ekstraksiyon Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi .....	45
7.3. Parametrelerin Rutin Ekstraksiyon Sürecine Etkisi.....	48
7.3.1. Rutin ekstraksiyon miktarına sıcaklık-basınç parametresinin etkisi .....	48
7.3.2. Rutin ekstraksiyon miktarına sıcaklık-etanol parametresinin etkisi.....	50

**Sayfa**

7.3.3. Rutin ekstraksiyon miktarına basınç-etanol parametresinin etkisi .....	52
7.4. Pelemir Tohumundan Süperkritik CO <sub>2</sub> ile Silibinin Ekstraksiyon Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi .....	53
7.5. Parametrelerin Silibinin Ekstraksiyonu Sürecine Etkisi .....	55
7.5.1. Silibinin ekstraksiyonu miktarına sıcaklık-basınç parametresinin etkisi.....	55
7.5.2. Silibinin ekstraksiyonu miktarına sıcaklık-etanol kosolventi parametresinin etkisi.....	57
7.5.3. Silibinin ekstraksiyonu miktarına basınç-etanol kosolventi parametresinin etkisi.....	58
7.6. Pelemir Tohumundan Süperkritik CO <sub>2</sub> ile Ekstraksiyon Sürecinde Yüzey Cevap Metodu Optimizasyon Sonuçları .....	59
7.7. Pelemir Tohumundan Süperkritik CO <sub>2</sub> ile Ekstraksiyon Sürecinde Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları.....	62
7.8. Pelemir Tohumunun Süperkritik CO <sub>2</sub> ile Ekstraksiyon Sürecinde Elde Edilen Ekstraktların Toplam Antioksidan Madde Tayini Sonuçları .....	64
7.9. Pelemir Tohumundan Ekstrakte Edilen Diğer Bileşenlere Ait Sonuçlar.....	67
<b>8. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>69</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>71</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>81</b>
<b>EK-1. Standartlara ait kromatogramlar .....</b>	<b>82</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>83</b>

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.1. Akışkanların fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması .....	17
Çizelge 6.1. Design Expert 11.1.2.0 Trial programı tarafından belirlenen ekstraksiyon çalışma koşulları .....	37
Çizelge 7.1. Yüzey cevap metodu için seçilen parametreler .....	45
Çizelge 7.2. Sıcaklık, basınç ve etanol kosolventi olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı .....	45
Çizelge 7.3. Deneysel algoritma ve rutin ekstraksiyon çıktıları .....	46
Çizelge 7.4. Rutin deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri ve parametreler arası ilişkilerin anlamlılığı .....	46
Çizelge 7.5. Rutin için hesaplanan model istatistikleri .....	47
Çizelge 7.6. Deneysel algoritma ve silibinin ekstraksiyon çıktıları.....	53
Çizelge 7.7. Silibinin deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri ve parametreler arası ilişkilerin anlamlılığı .....	54
Çizelge 7.8. Silibinin için hesaplanan model istatistikleri .....	54
Çizelge 7.9. Süperkritik CO <sub>2</sub> ekstraksiyonu ve soxhlet yöntemi deneyleri sonucu elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları.....	64
Çizelge 7.10. Süperkritik özütleme ve soxhlet deneyleri sonucu elde edilen özütlerin toplam antioksidan madde tayini sonuçları.....	66
Çizelge 7.11. Tez çalışmasında pelemir tohumu kullanılarak yapılan çalışma koşulları, analiz metotları ve analiz edilen flavonoidler .....	67

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. Besinsel flavonoidlerin ana alt sınıfları .....	9
Şekil 3.2. Karbon atomlarının numaralandırılmasını ve halkaların adlandırılmasını gösteren flavonoid iskeleti .....	10
Şekil 3.3. Antioksidanların sınıflandırılması .....	12
Şekil 4.1. Süperkritik akışkan bölgesinin faz diyagramı.....	17
Şekil 4.2. CO <sub>2</sub> faz diyagramına eklenmiş SAE sisteminin şematik gösterimi.....	22
Şekil 6.1. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyon sisteminin akış diyagramı .....	36
Şekil 7.1. Rutin miktarına sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin etkisi .....	49
Şekil 7.2. Rutin miktarına sıcaklık-etanol ikili etkileşiminin etkisi.....	51
Şekil 7.3. Rutin miktarına basınç-etanol ikili etkileşiminin etkisi .....	52
Şekil 7.4. Silibinin miktarına sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin etkisi .....	56
Şekil 7.5. Silibinin miktarına sıcaklık-etanol ikili etkileşiminin etkisi.....	57
Şekil 7.6. Silibinin miktarına basınç-etanol ikili etkileşiminin etkisi .....	58
Şekil 7.7. Modelin öngördüğü rutin miktarı ile deneysel elde edilen miktarın kıyaslanması.....	59
Şekil 7.8. Rutin miktarının en yüksek elde edildiği 60 °C, 215 bar ve %6,5 etanol çalışma şartlarına ait kromatogram.....	60
Şekil 7.9. Modelin öngördüğü silibinin miktarı ile deneysel elde edilen miktarın kıyaslanması.....	61
Şekil 7.10. Silibinin miktarının en yüksek elde edildiği 40 °C sıcaklık, 300 bar basınç ve %10 etanol kosolventi çalışma şartlarına ait kromatogram .....	62
Şekil 7.11. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği.....	63
Şekil 7.12. DPPH kalibrasyon eğrisi grafiği .....	65

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. Pelemir çiçekleri .....	4
Resim 2.2. Pelemir tohumu a) toplanmış, b) öğütülmüş.....	4
Resim 6.1. Bitki değirmeni .....	34
Resim 6.2. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon sistemi .....	35
Resim 6.3. UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayarını .....	39
Resim 6.4. Soxhlet ekstraksiyon sistemi.....	39
Resim 6.5. UV-VIS spektrofotometre cihazı .....	41
Resim 7.1. DPPH kalibrasyonu için hazırlanan çözeltiler .....	65

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
°C	Celcius
µL	Mikron
atm	Basınç birimi
bar	Basınç birimi
cm	Santimetre
g	Gram
K	Kelvin
L	Litre
m	Metre
M	Molar
min	Dakika
mL	Mililitre
nm	Nanometre
P	Basınç
P <sub>c</sub>	Kritik basınç
T	Sıcaklık
T <sub>c</sub>	Kritik sıcaklık

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
ANOVA	Varyans Analizi Metodu
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
CO <sub>2</sub>	Karbon dioksit
CP	Kritik Nokta
CUPRAC	Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite
DPPH	Difenil-1 Pikrilhidrazil Radikali

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

<b>FTIR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>GC</b>	Gaz Kromatografisi
<b>GC/MS</b>	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrofotometresi
<b>GSE</b>	Geleneksel Soxhlet Ekstraksiyonu
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>MIC</b>	En Düşük Önleyici Konsantrasyon
<b>MS</b>	Kütle Spektrometresi
<b>NMR</b>	Nükleer Manyetik Rezonans
<b>SAE</b>	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>SK-CO<sub>2</sub></b>	Süperkritik Karbon dioksit
<b>TP</b>	Üçlü Nokta
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>UV-VIS</b>	Ultraviyole Görün
<b>YCM</b>	Yüzey Cevap Metodu

## 1. GİRİŞ

Serbest radikaller ve antioksidanlar ile ilgili çalışmalar son yıllarda daha da önem kazanmaktadır. Sağlıklı bir canlı organizmada oksidanlar ile antioksidanlar dengededir. Bu denge oksidanlar lehine bozulduğunda oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres kanser, hipertansiyon, diyabet, nörolojik bozukluklar, kronik akciğer hastalığı, astım gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum ve Kalayci, 2012). UV, X-rays ve mikrodalga ışınları, orman yangınları, hava kirletici kimyasallar, temizlik ürünleri, sigara ve egzoz dumanı gibi eksojen serbest radikal kaynakları vücut ve dokulara zarar vererek oksidasyona sebep olmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016). Antioksidanlar bu hasarı önleyebilen moleküllerdir.

Antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen flavonoidler bitkiler aleminde dağılım gösteren ikincil metabolitlerin bir grubudur. Ayrıca geniş ve biyolojik olarak aktif olan polifenolik bileşiklerin sınıfındadır. Antioksidan etkileri ve farmakolojik aktivitelerinden dolayı beslenme ve sağlık alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Li, ve diğerleri, 2019; Farombi, Akinmoladun, ve Owumi, 2019). Flavonoidler C halkası üzerinde oksidasyon seviyelerine göre antosiyanidinler, flavanoller (kateşinler), flavonlar, flavonoller ve flavanonlar olarak sınıflara ayrılır. Flavonlar ve flavonoller çoğu bitkide tanımlanmıştır (Aherne ve O'Brien, 2002). Doğal antioksidanlar sınıfında yer alan flavonoidler birçok bitkide bol miktarda bulunmaktadır.

Flavonoidlerin malzeme boyama ve metallerle tepkimeye girme özelliklerinin olması gıda, ziraat, tıp, tekstil, deri metalürji endüstrilerinde kullanıma ihtimallerini artırmaktadır. Özellikle takviye edici gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı flavonoidlerin, cildi UV-ışınlarından koruma özelliğinden dolayı kozmetik endüstrisinde de kullanım alanına sahiptir (Özyurt, 2005).

Son yıllarda bitkilerden ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakt elde etmenin hem kolay hem de maliyetinin az olmasından dolayı, çeşitli bitkilerdeki antioksidan tayini çalışmalarına ilgi artmıştır. Halk arasında acımık olarak bilinen pelemir (*Cephalaria Syriaca*) bitkisi de içinde önemli flavonoidlerin bulunduğu gıda ve sağlık sektöründe kullanım alanı bulabilecek değerli bir bitkidir. Pelemir kuersetin, rutin ve kaempferol gibi önemli derecede antioksidan aktiviteye sahip flavonoidler içermektedir. Uygun ekstraksiyon



metodu ve çalışma parametreleri ile sözkonusu bileşenleri elde etmek mümkündür. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin dezavantajlarından dolayı, bu çalışmada süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu ekstraksiyon yönteminde çevre dostu, ucuz ve bol bulunabilirlik özelliklerinden dolayı akışkan olarak karbon dioksit seçilmiştir.

Bu çalışma etanol kosolventli (yardımcı çözücü) süperkritik karbon dioksit ekstraksiyon metodu ile pelemir tohumundan ekstrakt eldesi, elde edilen ekstraktlardaki çeşitli flavonoidlerin HPLC cihazı ile miktarsal tayini, daha sonra toplam antioksidan madde ve toplam fenolik madde değerlerinin belirlenmesi amaçlamaktadır. Ayrıca, süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile toplam antioksidan madde ve toplam fenolik madde miktarını karşılaştırabilmek için geleneksel ekstraksiyon yöntemi olarak bilinen soxhlet ekstraksiyonu yapılmıştır. Design Expert 11.1.2.0 Trial programı ile sıcaklık, basınç, etanol kosolventi parametrelerinin elde edilen ekstraktların miktarına etkisini gösteren deneysel model oluşturulmuştur.

## 2. PELEMİR

Bu bölüm pelemir (*Cephalaria syriaca L.*) Bitkisine ait botanik özellikleri, yapısında bulunan kimyasal bileşikleri ve farmakolojik olarak gösterdiği etkilerini içermektedir.

### 2.1. Pelemir Bitkisinin Botanik Özellikleri

Pelemir bitkisi Dipsacaceae familyasına aittir. Dipsacaceae familyası taksonomik açıdan çok karmaşık bir ailedir. *Cephalaria* cinsi yaklaşık 94 türden oluşmaktadır. *C. aristata*, *C. davisiana*, *C. lycica*, *C. speciosa* ve *C. anatolica* türlerinde rutin, kuersetin ve kaempferol gibi önemli flavonoidleri de içeren birçok yararlı bileşik bulunmaktadır (Sarıkahya, Goren ve Kirmizigul, 2019). Ağırlıklı olarak Akdeniz Bölgesi ve Ortadoğu'ya yayılmıştır. Bugüne kadar Anadolu florasında 40 *Cephalaria* türü olduğu bilinmektedir. Bu türlerin 24 tanesi endemik olarak kabul edilmektedir (Sarıkahya ve diğerleri, 2011). Bu çalışmada bitkinin *Cephalaria syriaca* türünün tohumları kullanılmıştır.

*Cephalaria syriaca* Türkiye' nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde yetişmektedir. Ayrıca, Suriye' de de bol miktarda yetişmektedir (Musselman, 2000). Akdeniz Bölgesi ve Batı Asya'da geniş bir dağılım göstermektedir. Avrupa ülkelerinden bazılarında rastlanmasına rağmen en çok Güney Fransa, Güney İspanya, Kuzey Afrika ve Türkiye' de görülmektedir (Katar, Arslan ve Kudas, 2012).

*Cephalaria syriaca* buğday tarlalarında yetişen tek yıllık otsu bir bitkidir. Ayrıca, şekil ve boyut olarak buğdaya benzemektedir. Pelemir halk arasında acımık olarak bilinmektedir. Buğdayla birlikte toplanıp öğütüldüğünde ekmeğe acımsı bir tat vermektedir. *Cephalaria syriaca* unu zayıf una ilave edildiğinde, hamurun güçlendirilmesinde önemli rol oynadığı görülmüştür. Bu yüzden Türkiye' nin bazı bölgelerinde yaşayan çiftçiler ekmek yapımında kullanılan hamurun zayıflığını gidermek için katkı maddesi olarak kullanmaktadır (Karaoğlu, 2006).

Pelemirin (*Cephalaria syriaca L.*) boyu 40-100 cm aralığındadır. Pelemir içi boş güçlü bir sapa ve kazık köke sahiptir. Bitkinin yaprak, dal ve gövdesi tüylerle kaplı olup, gövde ve yan dallarında tohumlar bulunmaktadır. Yaprakları ise, koyu yeşil renklidir (Katar ve diğerleri 2012). 15-20 çiçek bir araya gelerek bir öbek oluştururlar ve çiçekler morumsu

kırmızı renkli olup tüp şeklindedir (Resim 2.1). Bitkinin meyveleri ilk zamanlar yeşil, olgunlaşınca kahverengi rengini almaktadır (Altunbaş, 2015). Pelemir tohumlarının yakın görüntüsü ve öğütülmüş hali Resim 2.2 de verilmiştir.



Resim 2.1. Pelemir çiçekleri (Altunbaş, 2015)



Resim 2.2. Pelemir tohumu a) toplanmış, b) öğütülmüş

Soğuğa oldukça dayanıklı olan pelemir bitkisi fazla bir iklim isteği bulunmadığından dolayı eğimli ve erozyona maruz alanlarda bile yetiştirilebilmektedir. Bu topraklardan tatmin edici seviyede verim alınabilmektedir (Sezgin ve diğerleri, 2017)

*Cephalaria syriaca L.*'nin tane verimi ve kalitesini belirlemek için tesadüf blokları deneme deseni kullanılarak 6 tekrarlamalı olarak yapılmıştır. Ankara (Yenimahalle, Yenikent ve Haymana), Konya ve Kırşehir lokasyonlarında *Cephalaria syriaca L.*'nin Karahan, Populasyon 1 ve Populasyon 2 genotiplerinden iki yıllık ortalama elde edilen verimler

(dekara tohum verimi kg/da) sırasıyla 233,2, 41,1 ve 216,9 olarak elde edilmiştir. Yağ oranları, (%) 23,4, 26,2 ve 19,8 yağ verimleri (kg/da) 58,8, 10,3 ve 52,8 olarak bulunmuştur (Sezgin ve diğerleri, 2017). Şanlıufa ilinde mercimek tarlalarında yabancı ot türlerinin yoğunluğunu ve yaygınlığını belirlemek amacıyla 2014 yılında 70 mercimek tarlasında yapılan incelemeye göre, *Sinapis arvensis* L. (yabancı hardal), *Avena sterilis* L. (yabancı yulaf) bitkilerini *Cephalaria syriaca* L. (pelemir) bitkisi %50,00 oranında takip etmiştir (Arslan, Altun ve Bilgili, 2017).

## 2.2. Pelemir Türlerinin Yapılarında Bulundurduğu Kimyasallar

Yapılan araştırmalar ile çeşitli *Cephalaria* türlerinin triterpenler, iridoitler, flavonoidler, alkaloidler, lignanlar ve yağ asitleri gibi geleneksel tıpta kullanılan birçok bileşen içerdiği belirlenmiştir. Bu konudaki çalışmaların bazıları aşağıda verilmiştir.

*Cephalaria syriaca* tohumlarındaki yağ asidi; %1,5 laurik asit, % 19,5 miristik asit, %9,4 palmitik asit, %2 stearik asit, %23,0 oleik asit, %36,9 linoleik asit içermektedir. (Yazicioglu, Karaali ve Gökçen, 1978). *Cephalaria syriaca* tohumu %14-21 ham protein, %22-28 yağ, %3-10 kül ve %9-30 ham lif içerdiği belirlenmiştir (Karaoğlu, 2012). Pelemir oldukça iyi bir oranda lif içeriğine sahiptir. Lifli gıdalara olan ilginin artması sebebiyle gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olabilir. Yağlı tohumlu bir bitki olan pelemirin yapısında bulunan %7-8 epoksi asit nedeniyle deri ve tekstil endüstrisinde kullanımı uygundur. Ayrıca yapısında bulunan %19-20' lik miristik asit sabun endüstrisi için elverişli olmaktadır. Pelemir tohumlarından yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan kısım besicilik sanayisinde kullanılabilecek yem türlerindedir (Katar ve diğerleri, 2012; Yazicioglu ve diğerleri, 1978).

*Cephalaria transsylvanica* türünde yapılan fitokimyasal çalışmalar ile bitkinin yapısında triterpenoidler belirlenmiştir (Kirmizigul ve Anil, 1994; Kirmizigul ve Rose, 1997). Ayrıca çiçeklerinin metanol ile ekstraksiyonu sonucunda antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Kirmizigul, Anil, Uçar ve Akdemir , 1996).

*Cephalaria kotschy* köklerinden iridoid bileşiklerinin ekstraksiyonu yapılmıştır (Mustafaeva ve diğerleri, 2008). Bu türün çiçeklerinin kaempferol, hiperosid, quercimeritrin, cinarosid, cephasid ve cephacosid flavonoidlerini içerdiği tespit edilmiştir

(Aliev ve Movsumov, 1981; Movsumov, Garaev ve Isaev, 2009). *C. grossheimii* çiçeklerinin apigenin, hiperosid, quercimeritrin, cinarosid, palustrosid ve oleanolik asit içerdiği belirlenmiştir. *C. kotschyi* ile karşılaştırıldığında flavonoid içeriklerinin farklı olduğu görülmektedir (Movsumov ve diğerleri 2009).

*Cephalaria gigantea* çiçeklerinde luteolin, kuersetin, sinarozit, quercimeritrin ve yeni bir flavonol olan biyosid gigantosid A flavonoidleri tespit edilmiştir (Movsumov ve diğerleri, 2006). *Cephalaria gigantea* köklerinde sitotoksik triterpenoit saponinler tespit edilmiştir (Tabatadze ve diğerleri, 2007).

*Cephalaria kotschyi*, *Cephalaria nachiczevanica* ve *Cephalaria gigantea* türlerinden toplam alkaloidlerin ekstraksiyonu yapılmıştır (Aliev, Movsumov ve Bagirov, 1975).

*Cephalaria ambrosioides* köklerinden yapılan çalışmada iridoid glikozitler, hidroksisinnamik esterler ve lignan glikozit bileşiklerinin tespiti yapılmıştır (Pasi, Aligiannis, Skaltsounis ve Chinou, 2002).

*Cephalaria pastricensis* türünün antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Goğevac ve diğerleri, 2004).

Yapılan bir başka çalışmada 19 *Cephalaria* türü incelenmiş ve siyanidin-3-O-glukozit, luteolin-7-O-glukozit, kaempferol-3-O-glukozit, hiperosid, hesperidin, luteolin ve quercetin ana flavonoidler olarak belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerde salisilik ve kafeik asitler ise ana fenolik asitler olarak belirlenmiştir (Sarıkahya, Goren ve Kirmizigul, 2019).

Anadolu' daki endemik *Cephalaria* türlerinden olan *C.scoparia*' dan iki yeni triterpen glikozit *C.scoparia*, *C. paphlagonica*, *C. Isaurica* ve *C. Stellipilis* türlerinden fenolik, flavonoid, iridoid ve triterpen tipi glikozitler içeren bileşikler görülmüştür (Sarıkahya ve diğerleri, 2011).

*Cephalaria transsylvanica* L' nin çiçeklerinden bidesmosidic triterpen saponin olduğu belirlenmiştir (Çalışkan, Anil ve Stephenson, 1994).

### 2.3. Pelemir Bitkisinin Farmakolojik Etkileri

Pelemirde bulunan esansiyel yağ asitleri hem temel besin maddesi olarak hem de birçok hastalığın tedavisi için uygun olabilen bileşiklerdir. Bazı vücut ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarını düzenler. Bunlar doğurganlık, gebe kalma, kalp atış hızı, kan basıncı, kan pıhtılaşmasıdır. Aynı zamanda zararlı atık ürünlere karşı bağışıklık sistemi iltihabını düzenlemektedirler (Sarıkahya ve diğerleri, 2015).

Pelemirde bulunan saponin bileşiği kan lipitlerini, kan şekeri tepkisini ve kanser riskini azaltmaktadır. Diş çürüğü tedavisinde, trombosit kümeleşmesini önlemede, hiperkalsiüri tedavisinde ve akut kurşun zehirlenmesinde saponin içerikli besinler kullanılabilir (Shi ve diğerleri, 2004). Buna ek olarak, saponinlerin obeziteyi tedavi edici etki mekanizmaları bulunmaktadır (Marrelli, Conforti, Araniti, ve Statti, 2016). Plazma kolesterolünü kontrol etmek, peptik ülser ve osteoporozu önlemek, kalp hastalığı riskini azaltmak için insan besinlerinde kullanılması gereken önemli bir besindir (Gemede ve Ratta, 2014).



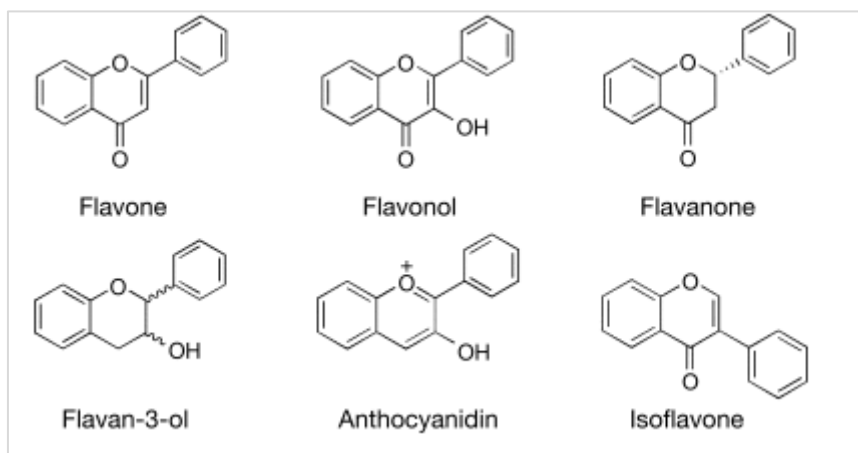
### 3. ANTIOKSİDAN MADDELER VE FENOLİK BİLEŞİKLER

Oksidasyonu engelleyen maddelere antioksidan denir. Radikaller ile küçük reaktif türler oluşturdukları için ‘serbest radikal tutucu’ olarak da bilinirler. Besinsel antioksidanların oksidatif stres kaynaklı hastalıkları önleme potansiyeli vardır (Neha, Haider, Pathak ve Yar, 2019). Oksidatif stres, serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasıyla meydana gelmektedir (Gazaryan ve Ratan, 2016).

Bitki fenolik bileşiklerinin sağlığa faydalı birçok özelliği vardır (Rohn, 2019). Bitki kökenli fitokimyasalların en bilinen türü fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, güçlü antioksidan ve antienflamatuar ajanlardır. Biyolojik olarak kullanılabilir olan fenolik bileşikler, hastalık riskinin azaltılmasında ve hastalıkların önlenmesinde büyük bir katkıda bulunabilirler (Gioxari, Kogiannou, Kalogeropoulos ve Kaliora, 2016).

Bitki fenolikleri ve polifenollerin yapısı, fenolik asit gibi basit moleküllerden proantosiyanidinler gibi yüksek oranda polimerleşmiş bileşiklere kadar çeşitlilik göstermektedir. Çok çeşitli yapılar içeren binlerce farklı bileşik tanımlanmıştır (aralarında 8000’in üzerinde flavonoid). Bunların çoğu gıdalarda bulunmaktadır (Gioxari ve diğerleri, 2016).

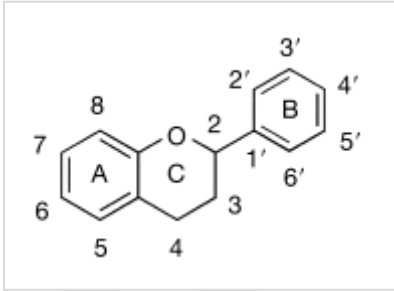
Fenolik bileşikler arasında en yaygın olanlar şekilde görülen flavonoidlerdir (Gioxari ve diğerleri, 2016). Şekil 3.1’ de flavonoidlerin alt sınıfları görülmektedir.



Şekil 3.1. Besinsel flavonoidlerin ana alt sınıfları



Besinsel flavonoidlerin en yaygın alt sınıfları Şekil 3.1' de görüldüğü gibi flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavan-3-oller, antosiyanidinler ve izoflavonlardır (Gioxari ve diğerleri, 2016). Şekil 3.2' de flavonoid yapısı görülmektedir. Flavonoid omurgasındaki üç halka A, B ve C halkası olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 3.2. Karbon atomlarının numaralandırılmasını ve halkaların adlandırılmasını gösteren flavonoid iskeleti

### 3.1. Doğal Antioksidanlar

Günümüzde, tüketiciler doğal, temiz ve daha az katkı maddesi içeren gıdalar tercih ettiklerinden dolayı, doğal antioksidanlar ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Doğal antioksidanlar, serbest radikaller ve geçiş metallerinin neden olduğu gıda bozulmalarına karşı koruma görevi üstlenir (Chen ve Xu, 2019). Bitkiler, oksidatif stresi kontrol edebilen doğal antioksidan bileşikler üretebilmektedirler. Üzüm çekirdeği, yeşil çay ve domates gibi bitki ekstraktları doğal antioksidanlar yani polifenoller, flavonoidler, flavanoller ve terpenler içermektedir (Kusumawati ve Indrayanto, 2013).

Doğal antioksidanların gıda kalitesi ile bağlantısı olmakla birlikte, sağlık yararları ile de ilişkilendirilmiştir. Alzheimer, parkinson gibi demansa bağlı hastalıklarda doğal antioksidan bileşiklerinin yararı görülmüştür (Cabezas ve diğerleri, 2015). Kanseri ve kardiyovasküler hastalıklara karşı da meyve ve sebzelerin koruyucu etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (Chen ve Xu, 2019).

Sebze ve meyvelerin bol miktarda tüketilmesi ile antioksidan aktivite gösteren çok çeşitli fitokimyasallar sağlanmaktadır. Doğal antioksidanlar askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten ve bitki fenoliklerini içermektedir (Chen ve Xu, 2019). Doğal antioksidanların önemli bir sınıfı olan flavonoidler, çok çeşitli meyvelerde, sebzelerde, yapraklarda ve çiçeklerde bulunmaktadır. Flavonoidlerin en önemli alt grupları renksiz kateşinler, kırmızı-mor renkli

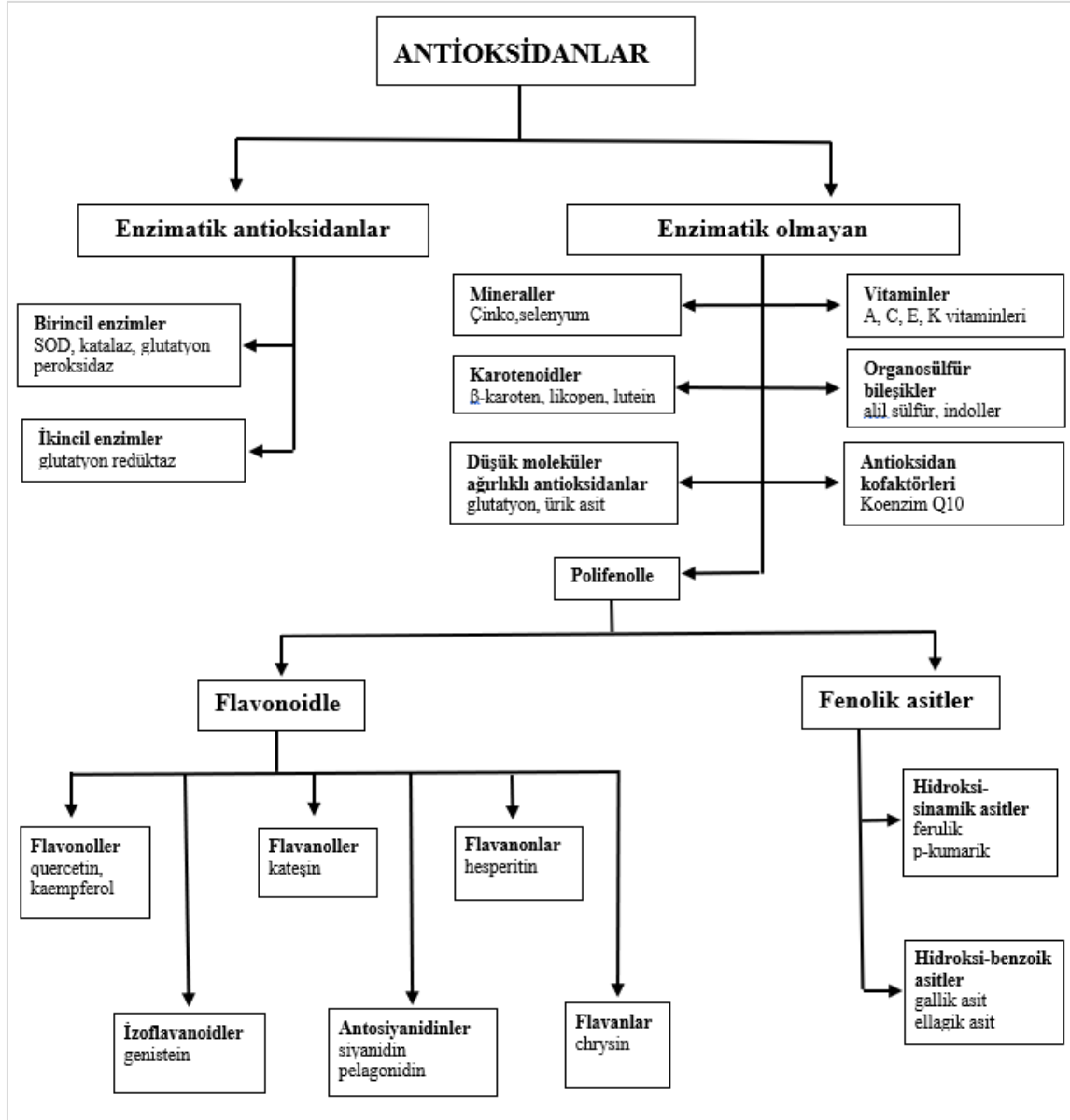
antosiyandinler, sarı flavonoller ve flavonlar ve renksiz proantosiyandinlerdir (Gordon, 2003).

### **3.2. Yapay Antioksidanlar**

Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), Bütillenmiş Hidroksitolüen (BHT), Propil Gallat (PG) ve Tert-Butilhidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar lipid oksidasyonu ve gıdalardaki bozulmayı geciktirmek için bazı ülkelerde kullanılmaktadır. Bu sentetik antioksidanlar verimli ve nispeten ucuz olmasına rağmen, kullanımını önlemek veya en aza indirmek için doğal antioksidanların kullanımına önem verilmiştir (Frankel, 2014).

### **3.3. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar birincil ve ikincil enzimler olarak ikiye ayrılmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı moleküller ve antioksidan kofaktörleri gibi enzimatik olmayan antioksidanlar endojen olarak üretilmektedir. Diğer enzimatik olmayan antioksidanlar besinsel kaynaklardan elde edilmektedir. Besinsel antioksidanlar polifenollerin yani fenolik asitler ve flavonoidler başlıklarında çeşitli sınıflara yerleştirilmektedir (Liu, 2004). Şekil 3.3'te sınıflandırılmış antioksidanlar görülmektedir.



Şekil 3.3. Antioksidanların sınıflandırılması (Bunaciu, Danet, Fleschin ve Aboul-Enein, 2015)

### 3.4. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, bir bitkinin aromasına ve kokusuna katkıda bulunan uçucu ve organik bileşiklerin karışımıdır. Bitkilerin birçok farklı bölümlerinden uçucu yağlar elde edilebilir:

- Çiçeklerinden yararlanılanlar : Gül, karanfil gibi.
- Yapraklarından yararlanılanlar : Nane, kekik, maydanoz, mercankös, defne gibi.
- Meyvelerinden yararlanılanlar : Limon, kimyon, anason, karabiber, kırmızı biber, vanilya gibi.

- Tohumlarından yararlanılanlar : Rezene, hardal, küçük Hindistan cevizi gibi.
- Gövdelerinden yararlanılanlar : Zencefil, tarçın gibi.
- Köklerinden yararlanılanlar : Güve otu, karaturp, kırmızı turp gibi.
- Soğan yapısında olanlar : Mutfak soğanı, sarımsak gibi.
- Kabuklarından yararlanılanlar : Tarçın gibi.
- Otsu bitkilerden yararlanılanlar : Limon otu gibi.
- Ağaçlardan yararlanılanlar : Sedir gibi (Cellat K., 2011; Tisserand ve Young, 2014)

Uçucu yağların içerisindeki bileşikleri belirlemek için Gaz Kromatografisi (GC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Kütle Spektrometrisi (MS) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi gibi modern metotlar kullanılmaktadır (Tisserand ve Young, 2014).

Bir uçucu yağın bileşeni, bir veya daha fazla fonksiyonel grubun bağlandığı çoğunlukla karbon ve hidrojenden oluştuğu düşünülebilir. Uçucu yağlardaki fonksiyonel grupların çoğu alkoller, fenoller, aldehytler, ketonlar, esterler, eterler ve heteroatomlar içermektedir (Tisserand ve Young, 2014).



## 4. SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYONU

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SAE), kritik sıcaklık ve basınç değerlerinin üzerinde çözücüler kullanılmasına dayanan bir tekniktir. SAE, çeşitli matrislerden çeşitli bileşenlerin ekstraksiyonu için kullanılabilir hızlı ve etkili bir metoddur. SAE bitkiler, deniz kaynakları, tarımsal ve gıda yan ürünleri gibi doğal kaynaklardan çeşitli biyoaktif bileşiklerin elde edilmesi için kullanılan etkili bir ekstraksiyon tekniği olarak günümüzde kullanılmaktadır (Ibáñez, Mendiola ve Castro-Puyana, 2016).

SAE, yüksek verim, çözücü (solvent) içermeyen özütler ve çevre dostu gibi avantajlarından dolayı bitkilerden faydalı bileşiklerin özütlenmesinde kullanılan en cazip teknolojiler arasında yer almaktadır (Medina, Diaz, Espitia ve Davila, 2019). Hastalıkların önlenmesinde önemli bir rolü olan biyoaktif bileşiklerin eldesinde SAE gibi daha yeşil ve çevre dostu tekniklerin kullanımı önem kazanmıştır (Asiri ve Kanchi, 2019). SAE son üründe toksik kalıntı bırakmamasından dolayı ilaç, kimya, gıda ve yakıt gibi alanlarda kullanılmaktadır. SAE ile ilgili ilk patent 1943' de yayınlanmasına rağmen, ilk endüstriyel uygulamalar 1978' de geliştirilmiştir (Ibáñez ve diğerleri, 2016).

SAE'de düşük kritik sıcaklık ve basınca sahip özellikle güvenli yeşil çözücüler tercih edilmektedir. Bu çözücüler arasında karbon dioksit en yaygın olarak kullanılan çözücüdür (Ibáñez, ve diğerleri, 2016). Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu düşük kritik sıcaklık ve basınca sahip olması ve organik çözücü bulunmaması gibi avantajları ile göze çarpmaktadır (Asiri ve Kanchi, 2019)

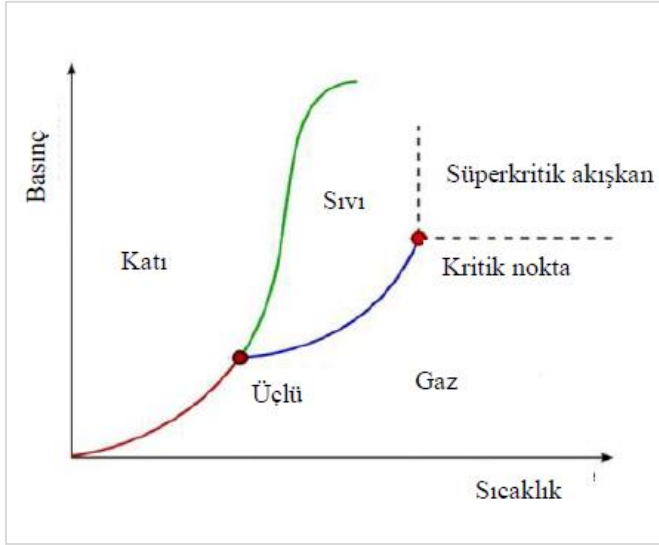
### 4.1. Süperkritik Akışkan ve Özellikleri

Kritik sıcaklık ve basınç değerlerini aşan bir akışkan, süperkritik akışkan olarak adlandırılır. Süperkritik akışkanlar gaz ve sıvı arasında özelliğe sahip olan yoğun bir akışkandır (Temelli, Saldaña ve Comin, 2012). Süperkritik akışkanlar bir yüzyıldan daha fazla süredir araştırılmasına rağmen, malzeme işleme ve kimyasal sentez uygulamalarında oldukça yenidir (Blanchard, Xu, Stadtherr ve Brennecke, 2003). SAE, ilk olarak 1879' da tanıtılmıştır. Süperkritik akışkanın 1879' dan beri çözücü gücü olduğu bilinmektedir (Bennett, 2007). 1970'lerin ortalarına kadar süperkritik akışkanlar birkaç pratik endüstriyel uygulamalarda kullanılmıştır (Ramsey, Guo, Liu ve Wu, 2011). SAE, 1980' lerin sonlarına

doğru gelişmiştir ve 1990' ların başlara kadar bu tekniğe olan ilgi artan bir şekilde devam etmiştir. Son yıllarda da SAE' ye olan ilgi devam etmektedir (Camel, 2013).

Sıvının çözme gücü basınç ve sıcaklıktaki küçük değişikliklerden etkilenmektedir. Yoğunluk, göreceli geçirgenlik ve çözme gücü gibi fiziksel özellikler kritik noktanın yukarısında basınç ile büyük değişiklikler göstermektedir. Bu özelliklerdeki değişiklikler çözünürlük ve kütle transfer oranlarındaki değişikliklerle ilgili olduğu için özütleme yaparken göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Ibáñez ve diğerleri, 2016). Basınç ve sıcaklığın değişmesiyle kritik nokta yakınındaki süperkritik akışkanın özellikleri değiştirilebilir. Böylece seçici ve daha hızlı ekstraksiyonun yapılmasına olanak sağlanır (Manjare ve Dhingra, 2019). Basınç, sıcaklık, katı matrisin partikül boyutu, çözücü akış hızı ve ekstraksiyon zamanı gibi parametreler süperkritik koşullarda katı matristen çözücüye kütle transferini etkileyebilmektedir (Medina ve diğerleri, 2019).

şekil 4.1' de saf bir maddenin faz diyagramı gösterilmektedir. Katı, sıvı ve gaz fazları birbirinden bir eđri ile ayrılmıştır. Katı ve gaz bölmelerini süblimasyon eğrisi, katı ve sıvı bölmelerini erime eğrisi ayırmaktadır. Buharlařma eğrisi kritik noktada sona ermektedir (Türk, 2014). Faz bölgeleri arasındaki sınır çizgileri ilgili fazların birarada dengede olduğunu temsil etmektedir. Üçlü noktada (TP) katı, sıvı ve gaz fazları bir arada dengede bulunur (Ramsey ve diğerleri, 2011). Kritik basınç ve sıcaklığın birleştiği noktaya maddenin kritik noktası denir (Ibáñez ve diğerleri, 2016). Üçlü noktadan (TP) kritik noktaya kadar (CP) buhar basıncı eğrisi takip edildiğinde, sıvı ve gaz fazlarının dengede olduğu kısımlardaki basınç ve sıcaklık değerleri belirtilmektedir (Ramsey ve diğerleri, 2011). Madde kritik sıcaklığına yaklaşıkça, hem gaz hem de sıvı fazların özellikleri kritik noktada sadece bir fazda birleşerek homojen süperkritik bir akışkan görölür (Ibáñez ve diğerleri, 2016). Kritik sıcaklık ve basıncın birleştiği kritik noktada, sıvı ve gaz fazları mevcut değildir. Süperkritik akışkan oluşturmak için etkili bir şekilde birleşirler. Süperkritik faz alanının solundaki sıvı bölgesi, kritik olmayan (subkritik) akışkanlar olarak adlandırılan bölgedir. Süperkritik faz alanının hemen altında ise yoğun gazlar bulunmaktadır (Ramsey ve diğerleri, 2011). Kritik sıcaklık ( $T_c$ )' nin üzerinde, ne kadar basınç uygulanırsa uygulansın bir gazı sıvılaştırmak mümkün değildir (Yasuji, Takeuchi ve Kawashima, 2008).



Şekil 4.1. Süperkritik akışkan bölgesinin faz diyagramı

Bir madde kritik noktanın ötesindeki sıcaklıklara ısıtıldığında gaz haline geçer. Ama fiziksel özellikleri kritik noktanın yakınında olan bir madde gaz ve sıvıların arasında olan bir maddedir ve maddenin dördüncü hali olarak süperkritik akışkan olarak düşünmek uygundur. Bir sıvıdan daha çok arzu edilebilir taşıma özelliğine ve bir gazdan daha iyi çözücü özelliklerine sahiptir. Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanın fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Akışkanların fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması (Manivannan ve Sawan, 1998)

	Yoğunluk (g/ml)	Difüzyon katsayısı (cm <sup>2</sup> /s)	Dinamik viskozite (g/cm.s)
Gaz	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^{-4}$
Sıvı	1.0	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-2}$
Süperkritik akışkan	$3 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$

Süperkritik akışkanların fiziksel özellikleri gaz ve sıvı özellikleri arasında yer almaktadır (Ibáñez ve diğerleri, 2016). Süperkritik bir akışkanın yoğunluğu bir sıvının yoğunluğuna benzerdir ve değerli bileşenlerin özütlenmesinde yüksek çözünme gücüne sahiptir. Bunlar süperkritik bir akışkanın uygun taşıma özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir (Medina ve diğerleri, 2019). Bir süperkritik akışkanın viskozitesi bir gazın viskozitesi ile kıyaslanabilir. Difüzyon katsayısı ise gaz ve sıvı arasında bulunmaktadır (Manivannan ve Sawan, 1998). Yüzey gerilimi ve viskoziteleri ihmal edilebildiğinden dolayı, katı matrisin içine daha fazla girebilir (Manjare ve Dhingra, 2019).



Ayrıca ısı iletkenlik süperkritik akışkanlarda nispeten daha büyüktür. Yüzey gerilimi özelliği gazlara daha yakın olup, sıvılarınkinden ise çok daha küçüktür. Birçok diğer fiziksel özellik yoğunlukla ilişkilidir, kritik noktanın yukarısında basınçla değişim gösterir. Düşük basınçta, yoğunluğu düşük olan bir gazın çözücü gücü de düşüktür. Kritik koşulların yakınında, yoğunluk bir sıvının yoğunluğuna yaklaşarak artmaktadır. Böylece çözünürlük özelliği kritik basınca yaklaşıldıkça artmaktadır. Fiziksel özelliklerdeki değişimler çözünürlük ve kütle transfer oranındaki değişimlerle ilgili olduğundan dolayı, ekstraksiyon sürecinde bu özellikler ile ilgili değişimler oldukça önemlidir (Mendiola, Herrero, Castro-Puyana ve Ibáñez, 2013).

#### 4.2. Süperkritik Akışkanın Seçimi

SAE işleminde çözücü olarak seçilecek akışkanın kritik sıcaklık ve basınç değerleri önem arz etmektedir. Kritik değerlerinin yanı sıra çözücünün toksik olmaması, kolay bulunabilmesi ve ekonomik olması gibi özellikleri de dikkate alınmaktadır. Gaz ve sıvıların kritik sıcaklıkları oldukça farklıdır. Bu farklılık çeşitli uygulamalarda spesifik süperkritik akışkanların kullanılabilmesini ileri sürmektedir. Karbon dioksit, etan ve etilenin kritik sıcaklığı ortam sıcaklığına yakındır. Bu çözücüler ısıya dirençli aromalar, ilaçlar, dayanıksız (kararsız) lipitler ve reaktif monomer süreçleri için cazip çözücülerdir. Çoğu endüstriyel kimyasallar ve polimerler gibi daha düşük sıcaklığa duyarlı olan maddelerin kritik sıcaklıkları 100-150 °C aralığındadır. Benzen ve sikloheksan gibi daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan hidrokarbonların 250-300 °C aralığında yüksek kritik sıcaklık değerine sahiptirler. Bu hidrokarbonlar kömür ve petrol fraksiyonu gibi uçucu olmayan maddelerin proseslerinde kullanılmaktadır. 374,2 °C kritik sıcaklığı olan su ise, tehlikeli atıkların zehirini giderme ve hidrokarbon dönüştürme proseslerinde kullanılmaktadır (Mchugh ve Krukoniş, 1994). Kritik sıcaklık ve basıncına kolayca erişilebilen diğer çözücülerin ise dezavantajları vardır. Ksenon çok pahalı, amonyak ve azot oksit toksik, etan ve pentan yanıcıdır (Morgan, 2000).

Karbon dioksitin kritik koşullarının (31,1 °C sıcaklık, 73,8 bar basınç) uygunluğundan dolayı en yaygın kullanılan çözücüdür. Oda sıcaklığı ve basıncında gaz halde olan karbon dioksit ile özüt eldesi kolaydır ve özütlenen numunede toksik kalıntı kalmaması avantajı vardır. Karbon dioksit kullanılarak düşük sıcaklıklarda çalışılabilmektedir, böylece termal olarak kararsız ve kolayca oksitlenebilen bileşiklerin özütlenmesi için karbon dioksit

uygun bir çözücüdür (Ibáñez, Mendiola ve Castro-Puyana, 2016). Ayrıca, süperkritik karbon dioksitin yüksek difüzyon özelliği ile çözücü gücünün ayarlanabilir olmasından dolayı cazip bir akışkandır (Manivannan ve Sawan, 1998). Karbon dioksit bol ve kolay bulunabilmesi, toksik olmaması, yanmaması, geri kazanılabilmesi, ucuz ve güvenilir olması ayrıca lipofilik (yağı seven) maddeleri çözme yeteneği açısından ideal bir süperkritik akışkandır (Hossain ve diğerleri, 2020; Mendiola ve diğerleri, 2013). Son yıllarda bitkilerden uçucu yağların ekstraksiyonunda geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin yerine süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu hem etkili hem de çevre dostu bir yöntem olarak göze çarpmaktadır. Aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde önemli uygulamaları bulunmaktadır (Gonçalves ve Romano, 2020).

Karbon dioksitin polaritesinin düşük olması, numunelerden polar bileşiklerin ekstraksiyon verimini kısıtlamaktadır. Süperkritik karışımda polar bileşiklerin çözünürlüğünü artırmak için etanol, metanol ve su gibi polar kosolvent (yardımcı çözücü) kullanılarak bu problemin üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır (Mendiola ve diğerleri, 2013).

### **4.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonuna Etki Eden Faktörler**

SAE verimi kullanılan numune, partikül boyutu, basınç, sıcaklık süperkritik akışkanın cinsi ve akış hızı, kosolvent kullanımı gibi birçok parametrelerden etkilenmektedir. Bu bölümde parametrelerin etkisi incelenmiştir.

#### **4.3.1. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda numune özelliklerinin etkisi**

SAE uygulamaları hem katı hem de sıvı numunelerin ekstraksiyonu için olarak sağlamaktadır. Ancak her ikisinin değerlendirilmesi ve cihaz kullanımı biraz farklıdır. Katı numunelerin fiziksel özellikleri güçlü etkiye sahip olabilir. Numunenin partikül boyutu ve gözenekliliği yüzey temasını artırdığından dolayı kütle transferinde önemli etkiye sahiptir. Genellikle kurutulmuş numunelerden daha iyi sonuçlar elde edilmektedir. Numunenin boyutu değerlendirilecek olursa, eğer numunenin boyutu çok küçükse ekstraksiyon hücresi içinde ek olarak kanalların oluşması mümkündür. Bu durumu önlemek için, dispersiyon ajanlar homojen ekstraksiyon yapabilmek için kullanılabilir (Sánchez-Camargo, Mendiola, Ibáñez ve Herrero, 2014). Numunenin nem içeriği ise SAE verimini genellikle negatif

etkilemektedir (Nagy ve Simándi, 2008). Sıvı numuneler incelendiğinde, numune ve süperkritik akışkan arasındaki teması artırmak için ters akım ekstraksiyonları kullanılmaktadır (Sánchez-Camargo ve diğerleri, 2014).

#### **4.3.2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda sıcaklık ve basıncın etkisi**

Kritik noktanın üzerinde sıcaklık ve basınçtaki küçük değişiklikler akışkanın yoğunluğunda önemli değişikliklere sebep olur. Bu nedenle sıcaklık ve basınç SAE 'yi etkileyen en önemli parametreler olup birlikte değerlendirilmesi uygundur. Süperkritik akışkanın sabit sıcaklıkta basıncı arttıkça yoğunluğu artar, böylece numunedeki bileşenleri çözme gücü de artar. Öte yandan, sabit bir basınçta sıcaklık arttıkça yoğunluk azaldığından dolayı çözünürlük azalmaktadır. Sıcaklığın buhar basıncına etkisi incelendiğinde ise, sıcaklık arttıkça buhar basıncının artmasından dolayı, numuneden süperkritik akışkana çözünen maddelerin transferi kolaylaşmaktadır. Böylece sıcaklık ve basınç değerleri özütlenmesi amaçlanan bileşenlere göre dikkatli bir şekilde seçilmelidir. Doğal kompleks numuneler için farklı parametrelerin etkisini istatistiksel olarak gözlenmesine izin veren deneysel tasarım programları sıklıkla kullanılmaktadır. Yüzey cevap metodu ve simpleks merkezli tasarım en çok kullanılan metotlardır (Sánchez-Camargo ve diğerleri, 2014).

#### **4.3.3. Süperkritik akışkanın akış hızının etkisi**

Çözücü veya karbon dioksit akış hızı süperkritik ekstraksiyon sürecinde büyük bir öneme sahiptir. Ekstraksiyon verimini en üst düzeye çıkaracak kadar yüksek, ancak numune ile iyi temas sağlayacak kadar işletme maliyetini azaltmak için düşük tercih edilmelidir (Sánchez-Camargo ve diğerleri, 2014).

#### **4.3.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kosolvent kullanımının etkisi**

Kosolventler çözünen maddenin çözünürlüğünü ve ekstrakte edilebilen bileşenlerin çeşitliliğini dolayısıyla ekstraksiyon verimini arttıran yardımcı çözücülerdir (Tirado, Tenorio, Cabañas ve Calvo, 2018; Yousefi ve diğerleri, 2019). Kosolvent seçiminde çözücünün kritik şartları ve özütlenmesi amaçlanan bileşenin yapısı önemlidir. Yaygın olarak kullanılan kosolventler; metanol, etanol, 2-propanol, diklorometan ve asetonitrildir. Gıda ve ilaç sektöründe kullanılacak bileşenlerin özütlenmesi için kosolvent seçiminde, diğer kriterlerin yanı sıra toksik olmaması ve üründen tamamen uzaklaştırılabilmesi de

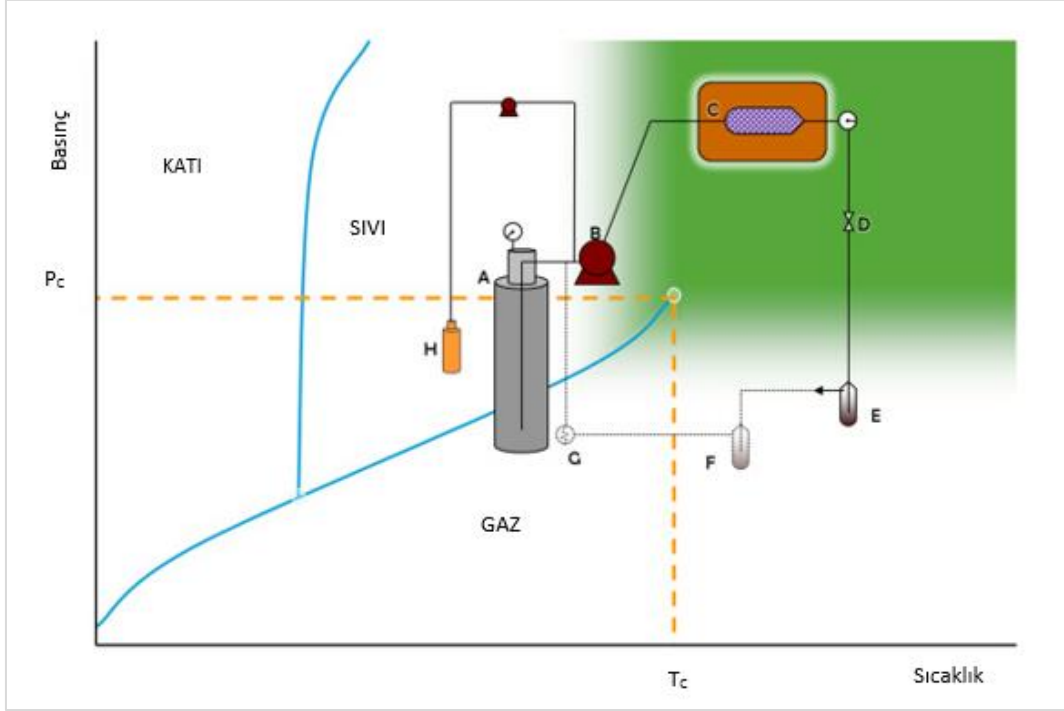
önem arz etmektedir. Karbon dioksit oldukça apolar olmasından dolayı, daha yüksek ağırlıklı ve polar moleküllerin çözünürlüğünü artırabilmek için polar kosolvent ilave edilmesi gereklidir (Yousefi ve diğerleri, 2019). Az miktarda kosolvent ilave edilerek süperkritik karbon dioksitin çözücü gücü artırılabilir. Kosolventin konsantrasyonu çalışma koşulları altında karışımın faz davranışı tarafından belirlenir. Süperkritik karbon dioksitin çözücü gücünü artırmadaki etki, süperkritik fazda kosolventin konsantrasyonuna bağlıdır (Shi ve diğerleri, 2009).

#### **4.3.5. Süperkritik akışkan ekstraksiyon süresinin etkisi**

Ekstraksiyon süresi numunenin türüne, matris içinde çözünen maddenin konsantrasyonuna, karbon dioksit akış hızına ve çalışma parametrelerine bağlı olarak değişmektedir (Atanur, 2008).

#### **4.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Sistemi**

SAE prosedürü üç faza ayrılabilir. Ekstraksiyon prosesinin başlangıcında, süperkritik çözücü matris içine yayılır ve kütle transfer direnci azalır. Sonraki aşamada çözünen bileşikler süperkritik akışkan içerisinde çözünür ve ilk olarak difüzyonla katı yüzeyine, sonra da süperkritik faz yığına aktarılır. Ekstraksiyon işlemi çözünenin ve süperkritik faz yığınının ayrılmasıyla sona erer (Ibáñez ve diğerleri, 2016). Şekil 4.2' de SAE'ye ait akım şeması karbon dioksit faz diyagramı ile birlikte verilmiştir.



Şekil 4.2. CO<sub>2</sub> faz diyagramına eklenmiş SAE sisteminin şematik gösterimi

Şekil 4.2' de sıvı CO<sub>2</sub> silindiri (A), CO<sub>2</sub> pompası (B), ısıtılmış ekstraksiyon hücresi (C), sabit/hareketli vana (D), toplama kabı 1 (E), toplama kabı 2 (F), CO<sub>2</sub> geri kazanım sistemi ve kosolvent kabı (H) olarak ifade edilmiştir (Ibáñez ve diğerleri, 2016). Şekil.4.2' de görüldüğü üzere sıvı CO<sub>2</sub> bir pompa yardımı ile basınçlandırılarak fırın vasıtasıyla sıcaklığı istenilen değere getirilmiş içerisinde numune bulunan ekstraktöre gönderilir. Ekstraksiyon işlemi yarı kesikli ya da sürekli olarak gerçekleştirilebilir. Fırın çıkışına yerleştirilmiş akış ölçer ile CO<sub>2</sub> akış hızını kontrol etmek mümkündür. Vana yardımıyla CO<sub>2</sub>' in basıncı düşürülerek özütten ayrılması sağlanır, elde edilen özüt bir toplama kabında biriktirilir. Geri döngülü sistemlerde atmosferik şartlara gelen CO<sub>2</sub> tekrar basınçlandırılarak kullanılabilir. Ayrıca bir modifiye pompa ile sisteme kosolvent ilavesi mümkündür.

SAE gıda ve eczacılık alanlarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayrıca süperkritik akışkanlar biyokimyasal karışımların ayrılması, püskürtmeli kurutma, toz halinde aktif madde üretimi, polimer işleme, implant malzemelerinin tasarımı, kristalizasyon (kaplama), aktif karbon rejenerasyonu, sulu çözeltilerden organik atıkların uzaklaştırılması ve topraktan ağır metallerin uzaklaştırılması gibi alanlarda da kullanılmaktadır (Dinçer, Baran, Uzun ve Deniz, 2007).

#### 4.5. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Avantajları

- Çözücü buhar duruma geri dönerek analitlerden kolayca ayrılır.
- Sıvı çözücüler ile karşılaştırıldığında süperkritik akışkan daha düşük viskozite ve daha yüksek yayılma gücüne sahip olduğundan dolayı, gözenekli katı maddelere nispeten daha etkili bir şekilde girmektedir. Sonuç olarak çok daha hızlı kütle aktarımı sağlar ve ekstraksiyon daha hızlı gerçekleşir.
- SAE' da numunelere devamlı olarak taze çözücü akışı sağlandığından kütle aktarım hızı artar.
- Basınç ve sıcaklığın değiştirilmesi ile süperkritik akışkanların çözme gücü değiştirilebilir. Böylece yüksek ürün seçiciliği sağlanır.
- SAE' da kritik sıcaklığı düşük çözücüler kullanıldığında ekstraksiyon işlemi geleneksel yöntemlere göre daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir. Bu nedenle ısıya dayanıksız bileşiklerin ekstraksiyonunda ideal bir teknik olarak kabul edilmektedir.
- SAE' da az miktarda numune ile sıvı-katı özütlemesine göre daha fazla uçucu bileşik özütlenmektedir. Bu gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi ile belirlenmiştir.
- SAE sisteminde organik çözücüler ya hiç kullanılmaz ya da çok az miktarda kullanılır. Dolayısıyla çevre dostu bir teknik olarak kabul edilmektedir.
- SAE sisteminin doğrudan bir kromatografik analiz cihazına bağlanabilmesi sayesinde, yüksek derecede uçucu bileşiklerin miktarı belirlenebilir.
- SAE sürecinde kullanılan akışkan ekstraktöre geri beslenebilmesinden dolayı ekonomik bir süreçtir.
- SAE' da analitik ölçeklerden büyük endüstriyel ölçeklere kadar değişik ölçekte sistemler kullanılabilir (Lang ve Wai, 2001).

#### 4.6. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Dezavantajları

- Proses optimizasyonunu zordur.
- Yüksek basınçta çalıştığı için yatırım maliyeti ve enerji gereksinimi yüksektir.
- Karbon dioksit tüplerinde var olabilecek % 1-2 oranında oksijen antioksidanlarla tepkimeye girip az miktarda bozulmaya yol açabilir (Lang ve Wai, 2001).



## 5. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Bu bölümde pelemiri de içeren *Cephalaria* grubu bitkilerin çeşitli türlerinin içeriğini, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini araştıran çalışmalara yer verilmiştir. Pelemirden (*Cephalaria syriaca* L.) SAE ile yapılan çalışmaya literatürde rastlanmadığı için benzer bitki türlerinden SAE ile flavonoid eldesi ile ilgili yapılan çalışmalar ve sonuçları incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada da kullanılan Yüzey Cevap Metodu (YCM) ile değerlendirilen bazı SAE çalışmaları da ele alınmıştır.

### 5.1. Pelemir Türleri ile Yapılan Çalışmalar

Yazıcıoğlu ve diğerleri (1978) tarafından ağırlıklı olarak Türkiye' nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi' nde yetişen *Cephalaria syriaca schrad.* tohumlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiştir. Tohumların %7,8 nem içerdiği belirlenmiştir. Pelemir tohumlarının kuru kimyasal bileşimleri %25,3 ham yağ, %15,9 ham protein, % 40,4 N-içermeyen ekstrakt, %11,9 ham lif, %6,5 ham kül olarak tespit edilmiştir. Tohumların karakteristik özelliği; özgül ağırlığı 25 °C'de 0,9229, kırılma indisi 25 °C'de 1,4706, sabunlaşma değeri 192, iyodin değeri 88,4, tiyosiyajeno değeri 58,8, Reichert-Meissl değeri 0,36, Polenske değeri 0,25, sabunlaştırılmayan madde miktarı %1,24, hidroksil değeri 20,9 olarak belirlenmiştir. Yağ asidi bileşenleri; %1,5 laurik asit, %19,5 miristik asit, %9,4 palmitik asit, %2 stearik asit; %23 oleik asit, %36,9 linoleik asit olduğu gözlenmiştir. Ekstraksiyon sonrası geriye kalan numunenin kimyasal bileşimi; %20,4 ham protein, %0,8 ham yağ, %50,5 N-içermeyen ekstrakt, %6,4 ham kül, %14,4 ham lif, %7,5 saponin olarak belirlenmiştir. Pelemir tohumunun %7,8 epoksi asit içermesinden dolayı yenilebilir yağ kullanımını kısıtlamaktadır. Ancak epoksi asit içerdiğinden dolayı endüstrilerde kullanmaya uygundur. Yüksek miristik asit içermesi sabun yapımı için elverişlidir. Yağın laurik asit, palmitik asit, stearik asit, oleik asit linoleik asit içeriği de belirlenmiştir.

Arslan, Subaşı, Kodaş ve Katar (2014) tarafından *Cephalaria syriaca* L. Bitkisinin yetiştirme dönemlerinde 2 yıl süreyle farklı azot ve fosfor dozlarının bitkinin verim ve verim özelliklerine etkisi Ankara ekolojik koşullarında 2 yıl süre ile çalışılmıştır. Deneme tesadüf blokları kullanılıp, bölünmüş olan parseller deneme desenine göre üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Fosfor dozları (0, 3, 6, 9 kg/da) ve azot dozları (0, 5, 10, 15, 20 kg/da)



incelenmiştir. Bu çalışmanın amacı, bitki boyu (cm), bitkide tabla sayısı (adet), 1000 tohum ağırlığı (g), yağ oranı (%), dekara tohum verimi (kg/da) üzerine etkisini araştırmaktır. Ortalama bitki boyu 101,4-179,3 cm, bitkide tabla sayısı 32,8-44,5 adet/bitki, 1000 tohum ağırlığı 16,30-17,20 g, yağ oranı %19,72-20,60 ve dekara tohum verimi 209,4-338,3 kg/da değerlerinde fosfor ve azot dozlarına bağlı olarak elde edilmiştir. En yüksek tohum verimleri N<sub>20</sub> ve P<sub>9</sub> uygulamalarından 2010-2011 yetiştirme yılında, P<sub>6</sub>N<sub>10</sub> ve P<sub>9</sub>N<sub>10</sub> interaksyonlarından 2011-2012 yetiştirme yılında elde edilmiştir. En yüksek yağ oranı P<sub>9</sub> uygulamasından kaydedilmiş olup, ortalama yağ oranı %19,72-20,60 arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Pelemirin tohum verimi ve yağ oranını artırıcı fosfor ve azot dozu uygulamalarında önemli bir etken olduğu belirlenmiştir.

Böke ve diğerleri (2011) tarafından Anadolu' daki endemik *Cephalaria* türlerinden olan *Cephalaria scoparia*, *Cephalaria paphlagonica*, *Cephalaria isaurica* ve *Cephalaria stellipilis* bitkilerinin kimyasal bileşimleri incelenmiştir. İzole edilen 13 bileşiğin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Antioksidan bileşiklerin aktivitesi için DPPH ve CUPRAC testleri, antimikrobiyal bileşiklerin aktivitesi için MIC testi yapılmıştır. Bu türler arasında *Cephalaria scoparia*' nın antioksidan aktivitesi en yüksek, *Cephalaria paphlagonica*' nın ise antimikrobiyal aktivitesinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ada ve Tamkoç (2015) tarafından Türkiye' nin Sivas popülasyonundan seçilen 33 pelemir hattı üzerinde tarımsal özelliklerini belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Pelemir diğer yağlı tohumlu bitkilerden farklı olarak kurak alanlarda yetişmektedir. Çalışmada artırılmış deneysel tasarım kullanılmıştır. Bitki boyu, ilk dalın yüksekliği, bitki başına dal sayısı, bitki başına kafa sayısı, tohum ağırlığı, tohum verimi, yağ oranı ve yağ verimi özelliklerini incelemişlerdir. Popülasyon seçimi boyunca geliştirilen hatlar tohum verimi ve yağ oranı açısından önemli bir başarıyla sonuçlanmıştır.

Altıniğne ve Saygın (1983) tarafından Muş, Konya, Balıkesir (Ayvalık), Kayseri ve Ağrı' da yetişen *Cephalaria syriaca schrad.* tohumları toplanılarak tohumların protein nicelikleri ve fraksiyonlarının analizi yapılmıştır. Pelemirin %20,3 ile yüksek oranda ham protein içerdiği belirlenmiştir. Konya popülasyonundan toplanan pelemirin %22,5 ile en fazla protein niceliği, Kayseri pelemirinde %16,4 ile az protein niceliğinin olduğunu belirlemişlerdir.

Sarikahya ve diğerkleri (2019) tarafından 19 *Cephalaria* türlerindeki flavonoidler ve fenolik asitler tandem kütle spektrometri ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-MS/MS) ile belirlenmiştir. 25 flavonoid, 5 fenolik, 2 triterpenoid, 1 iridoid ve C vitamini 19 *Cephalaria* türü için başarılı bir şekilde tanımlanıp nicelendirilmiştir. Ana flavonoidler olarak siyanidin-3-O-glukozit, luteolin-7-O-glukozit, kaempferol-3-O-glukozit, hiperosid, hesperidin, luteolin ve kuersetin tespit edilirken, ana fenolik asitler olarak salisilik ve kafeik asitler analiz edilmiştir. *C. aristata*, *C. davisiana*, *C. lycica*, *C. speciosa* ve *C. anatolica* türlerinde rutin, kuersetin ve kaempferol gibi önemli flavonoidleri de içeren birçok yararlı bileşik bulunduğu tespit edilmiştir.

## 5.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ile Flavonoid Ekstraksiyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar

Li, Zhang ve Wang (2016) tarafından Çin geleneksel tıbbında yıllardır kullanılan *Abelmoschus manihot* (L.) Medic bitkisinin çiçekleri kullanılarak süperkritik karbon dioksit (SK-CO<sub>2</sub>) ekstraksiyonu ile flavonoidlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. 40-60 °C sıcaklık, 10-30 MPa basınç, etanol kosolventi (% 60-90%, etanol: su, v/v) parametre aralıklarında ekstraktların ana flavanol ve antioksidan aktivitesi Box-Behnken tasarımı kullanılarak YCM ile çalışılmıştır. Rutin, hyperin, isoquercetin, hibifolin, myricetin, quercetin-31-O-glucoside ve quercetin flavonoidleri HPLC metodu ile incelenmiştir. Antioksidan aktivitesi 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) serbest radikal süpürme testi kullanılarak belirlenmiştir. Deneysel tasarım programının önerdiği model üç faktör ve onların etkileşimlerinin ikinci dereceden polinom modellerine ( $p < 0,05$ ) uygun olduğunu göstermiştir. Flavonoidlerin sonuçları için optimum çalışma koşullarının 20 MPa basınç, 52 °C sıcaklık ve % 85 etanol içeriği olduğu tespit edilmiştir. Flavonoidlerin verimi 41,96 mg/g, IC<sub>50</sub> değeri 0,288 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Bunlara ek olarak, 3T3-L1 hücre çizgisi üzerinde ekstraktın anti-adipogenik aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar mRNA' da PPAR $\gamma$  ve C/EBP $\alpha$  ifadeleri azaltarak düzenlenebildiğini göstermiştir. Ekstraktların güçlü antioksidan ve anti-adipogenic etki gösterdiğini ve obesitenin önlenmesi ve tedavisi için şifalı bir yaklaşım olduğu belirlenmiştir.

Liza ve diğerkleri (2010) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile *Strobilanthes crispus* (Madagaskar kökenli bir çalı) bitkisinden özütlenen biyoaktif flavonoid bileşikler incelenmiş ve en uygun çalışma parametreleri belirlenmiştir. Karbon dioksit polar olmayan

bir çözücü olduğundan akışkanın polaritesini artırmak için kosolvent olarak etanol kullanılmıştır. 100, 150 ve 200 bar basınç, 40, 50 ve 60 °C sıcaklık ve 40, 60 ve 80 dakika ekstraksiyon süresi çalışma parametreleri olarak seçilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarının 200 bar, 50 °C ve 60 dakika olduğu tespit edilmiştir. Ortalama değere bağlı olarak, basıncın ekstraksiyon verimi üzerinde baskın bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Optimum SK-CO<sub>2</sub> şartlarından ayrı olarak belirlenen her bir parametrenin minimum (100 bar, 40 °C, 40 dakika) ve maksimum (200 bar, 60 °C ve 80 dakika) koşullarda ana biyoaktif flavonoid bileşiklerini tayin etmek için HPLC metodu ile kontrol çalışmaları olarak analiz edilmiştir. Optimum koşullar altında (+) - kateşin, (-) - epikateşin, rutin, mirisetin, luteolin, apigenin, naringenin ve kaempferol flavonoidleri tanımlanmıştır.

Bimacr ve diğerleri (2011) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ve geleneksel soxhlet ekstraksiyonu (GSE) metodları kullanılarak nane (*Mentha spicata L.*) yapraklarından kateşin, epikateşin, rutin, mirisetin, luteolin, apigenin ve naringenin flavonoid bileşikleri özütlenmiştir. Parametreler 40, 50 ve 60 °C sıcaklık, 100, 200 ve 300 bar basınç, 30, 60 ve 90 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Nane yapraklarındaki flavonoid bileşikleri tamamen rastgeleleştirilmiş tasarım (TRT) ile tam faktöriyel düzenleme kullanılarak araştırılmıştır. GSE metodu ile ve optimum koşullarda SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen nane yaprakları ekstraktlarının ana flavonoid bileşikleri HPLC metodu ile analiz edilmiştir. Optimum şartlarda (60 °C sıcaklık, 200 bar basınç ve 60 dakika ekstraksiyon süresi) SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu sonuçları ile %70 etanol ile gerçekleştirilen GSE sonuçları karşılaştırılmıştır. GSE verimi (257,67 mg/g) SK-CO<sub>2</sub> verimi (60,57 mg/g) ile kıyaslandığında, GSE veriminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak, optimum koşullarda SK-CO<sub>2</sub> metodu ile elde edilen flavonoid bileşiklerin (7 biyoaktif flavonoid) %70 etanol ile çalışılan GSE (5 biyoaktif flavonoid) metoduna göre fazla miktarda elde edildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle SK-CO<sub>2</sub> metodu nane yapraklarından yüksek konsantrasyonlu biyoaktif bileşik elde etmek için GSE metodu ile kıyaslandığında alternatif bir metod olduğu kabul edilmiştir.

Yang, Zheng, Hu, Luo ve Zhang (2008) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) bitkisinden toplam flavonoidler analiz edilmiştir. Tek faktör ve ortogonal testi kullanılarak optimize edilmiştir. Kosolvent olarak %50 etanol kullanılmıştır. Optimum ekstraksiyon koşullarını materyalin %50 etanole oranı (1:25 g/mL), 70 °C sıcaklık, 2,5 saat ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında

68,09 mg ekstrakt /g kuru şerbetçi otu elde edilmiştir. Flavonoid ekstraktların DPPH metodu ile serbest radikal süpürme aktivitesinin (IC50 5,73 µg/mL), askorbik asit (IC50 8,79 µg/mL) ve rutin (IC50 14,84 µg/mL) değerlerinden daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde maksimum etkili konsantrasyon (EC50 0,158 mg/mL), rutin (0,252 mg/mL) değerinden daha güçlü olduğu ama askorbik asit (EC50 0,103 mg/mL) değerinden daha zayıf olduğu hesaplanmıştır. Sonuç olarak, SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu kullanılarak *Humulus lupulus* ekstraktlarının güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çelik ve Gürü (2015) tarafından deve dikenini (*Silybum marianum*) tohumlarından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile ekstrakt eldesi için optimum koşullar belirlenmiştir. HPLC cihazı ile silibinin bileşikleri tayin edilmiştir. Sıcaklık (40-80 °C), basınç (160-220 bar) ve partikül boyutu (0,3025, 0,925 ve 1,2 mm) çalışma parametrelerinde yağ ekstrakte edilmiştir. Optimum koşullar 40 °C sıcaklık, 200 bar basınç, 4 ml/min karbon dioksit akış hızı, 0,3025 mm partikül boyutu olarak bulunmuştur. Bu koşullarda; yağ miktarı, silibin A, silibin B sırasıyla 327, 2,29 ve 1,92 mg/g deve dikenini tohumu olarak tespit edilmiştir. Palmitik asit (% 8,15), stearik asit (% 5,51), oleik asit (% 24,10) ve linoleik asit (% 54,97) optimum koşullarda en fazla bulunan bileşiklerdir.

Rahal, Barba, Barth ve Chevalot (2015) tarafından deve dikenini tohumlarından etanol kosolventli SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile yağ, yağ asitleri ve flavonolignanların tayini çalışması yapılmıştır. CaCo-2 hücrelerinde antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH ve ABTS testleri kullanılmıştır. Etanol kosolvent ilaveli süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunda çalışma aralığı 160-220 bar, 40-80 °C olarak belirlenmiştir. Deve dikeninden SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen yağ ekstraktlarından dört ana flavonolignan (silychristin, silydianin, silybin and taksifolin) tespit edilmiştir. Basınç ve sıcaklığın değerli bileşiklerin eldesini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. 220 bar basınç ve 40 °C sıcaklıkta SK-CO<sub>2</sub> ile çalışıldığında maksimum yağ ve flavolignan elde edilmiştir. Optimum koşullarda SK-CO<sub>2</sub> ile elde edilen yağlar önemli antioksidan kapasite göstermiştir.

### 5.3. Yüzey Cevap Yöntemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Wang ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmada çay polifenollerini ekstrakte etmek için yeşil çay üretim prosesindeki çay atıklarından yararlanılmıştır. Çay polifenollerini

SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. YCM için Design Expert programı kullanılmış ve çalışma parametreleri sıcaklık (313,15-323,15 K), basınç (20-30 MPa) ve kosolvent miktarı (50-150 ml) olarak belirlenmiştir. YCM ile elde edilen modelden optimum koşulların 322,15 K sıcaklık, 23,60 MPa basınç ve 150 ml kosolvent miktarı olduğu görülmüştür. Bitkinin fenolik içeriğini belirlemek için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmış, UV-VIS spektrofotometrisi ile ölçümü yapılmıştır. Toplam fenolik içeriği 117,73 mg/g olarak bulunmuştur. Optimum koşullar altında çay polifenollerinin maksimum verimi % 23,07 ± 0,82 olduğu belirtilmiştir.

Buszewski ve diğerleri (2019) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile sarı acı bakla (*Lupinus luteus*) tohumlarından elde edilen ekstraktların fitokimyasal analizi ve biyolojik aktivitesi incelenmiştir. Çalışma parametrelerinin optimizasyonu için YCM kullanılmıştır. 73 °C sıcaklık, 147 bar basınç ve %16,1 kosolvent olan optimum koşullarda elde edilen ekstraktların kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Toplam fenolik içeriği 14,56 mg GAE/g olarak hesaplanmıştır. Ekstraksiyon verimi ise %3,25 olarak bulunmuştur. Polifenolik bileşik olarak apigenin ve fitesin HPLC-ESI-MS/MS cihazı ile tayin edilmiştir. Elde edilen ekstraktlardaki yağ asitleri, fitosteroller ve lupeol GC-MS ile analiz edilmiştir.

Benito-Román, Varona, Sanz ve Beltrán (2019) tarafından pirinç kepeğinden kosolvent olarak etanol ilaveli SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile yağ özütlenmiştir. Çalışma parametrelerinin aralıkları 40-60 °C sıcaklık, 30-40 MPa basınç %0,5-10 etanol kosolventi olarak belirlenmiştir. Özütlenen yağın yağ asidi profili, antioksidan aktivitesi ve biyoaktif bileşikleri (fenolikler, flavonoidler, tokoferol ve  $\gamma$ -Oryzanol) incelenmiştir. 40 °C sıcaklık ve 30 MPa basınç koşullarında elde edilen yağın antioksidan aktivitesinin en yüksek olduğu gözlenmiştir. Kosolvent olarak etanol ilave edildiği zaman ekstraksiyonu yapılan biyoaktif moleküllerin miktarının arttığı gözlenmiştir. Böylece toplam antioksidan aktivitesi sıcaklıktan bağımsız olarak 40 MPa basınç ve %10 etanol kosolventi parametrelerinde en yüksek değer elde edilmiştir.

Sodeifian, Ardestani, Sajadian ve Moghadamian (2018) tarafından semiz otu tohumlarından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen yağların toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Sıcaklık, basınç, özütleme süresi ve parçacık boyutlarının özütlemeye etkisi araştırılmıştır. Toplam fenolik içerik tayini için Folin-

Cicalteu metodu, antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH metodu kullanılmıştır. Tohum parçacıklarının yüzey morfolojisini gözlemek için SEM kullanılmıştır. Çeşitli fonksiyonel grupları tanımlamak için FTIR analizi yapılmıştır. Özütlerin doymuş ve doymamış yağ asitleri GC analizi ile belirlenmiştir. YCM ile optimum ekstraksiyon koşulları 23,5 MPa, 333 K, 0,8 mm partikül boyutu, 210 dakika olarak belirlenmiştir.

Zekovi'c, Pavlić, Cvetanović ve Đurović (2016) tarafından kişniş tohumlarından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlarda antioksidan aktivitesi tespiti çalışması yapılmıştır. YCM ile optimizasyon yapılmıştır. Basınç (100-200 bar), sıcaklık (40-70 °C), karbon dioksit akış hızı (0,2-0,4 kg/h) parametreleri ile çalışılmıştır. Ekstraktların antioksidan aktivitesi DPPH metodu ile belirlenmiştir. Optimum özütleme verimi 199,50 bar, 40,15 °C, 0,396 kg/h akış hızı parametrelerinde elde edilmiştir. Bütün örneklerde en çok linolol olduğu tespit edilmiştir. 100 bar basınç, 55 °C sıcaklık ve 0,4 kg/h karbon dioksit akış hızı koşullarında en yüksek linalol verimi elde edilmiştir.

Pavi'c, Jakovljević, Molnar ve Jokić (2019) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) yapraklarından karnosik asit ve karnosolün özütlenmesi ve antioksidan ve antibakteriyel aktivite tayini çalışılmıştır. Basınç, sıcaklık, karbon dioksit akış oranı parametreleri YCM ile optimize edilmiştir. Antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH metodu kullanılmıştır. Karnosol ekstraksiyonunda en önemli parametre basınç iken, karnosik asit ekstraksiyonunda ise hem basınç hem de karbon dioksit akış hızının önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. YCM' ye göre optimum koşullar, 29,5 MPa, 49,1 °C, karbon dioksit akış hızı 3 kg/h, karnosik asit içeriği 105 µg/mg, karnosol içeriği 56,3 µg/mg olarak hesaplanmıştır. Adaçayı ekstraktlarından antioksidan tayini 30 MPa basınç, 40 °C sıcaklık ve 2 kg/h karbon dioksit akış hızı parametrelerinde en yüksek antioksidan aktivite (% 80,0 ± 0,68) elde edilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal özellikleri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı test edilmiştir.



## 6. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada pelemir (*Cephalaria syriaca L.*) tohumundan kuersetin, rutin, kaempferol, apigenin, silibinin ve taksifolin flavonoidlerin süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile özütlenmesi amaçlanmıştır. Deneysel tasarım için YCM kullanılmıştır. Ekstraktların kalitatif ve kantitatif analizleri için HPLC metodu kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde ve toplam antioksidan madde aktiviteleri uygun metotlarla belirlenmiştir.

### 6.1. Kullanılan Cihazlar

- Bitki değirmeni (Retsch)
- Elek seti
- Süperkritik ekstraksiyon cihazı (Applied Separations Spe-ed SFE fırın modeli)
- HPLC cihaz ve bilgisayar (Dionex UV dedektörlü)
- 250\*4,6 mm\*5  $\mu$  inertsil marka HPLC kolonu
- SGE marka uL 250'lik HPLC manuel sıvı enjektörü
- PG Instrument UK marka T80+ UV-VIS Spektrofotometre
- Cam soxhlet deney düzeneği
- Etüv'dür.

### 6.2. Kullanılan Kimyasallar

- Sifonlu sıvı karbon dioksit (%99,9 saflıkta, OKSAN)
- Yardımcı çözücü olarak kullanılan etanol ( $\geq$ %99,9 saflıkta, MERCK)
- HPLC analizlerinde kullanılan kuersetin ( $\geq$ %95 saflıkta, SIGMA-ALDRICH), rutin (analitik saflıkta, SIGMA-ALDRICH), silibinin ( $\geq$ %98 saflıkta, SIGMA-ALDRICH), taksifonin (analitik saflıkta, FLUKA) apigenin ( $\geq$ %95 saflıkta, SIGMA-ALDRICH) kaempferol ( $\geq$  %95 saflıkta, CAYMON) standart maddeleri
- HPLC analizlerinde kullanılan asetonitril ( $\geq$ %99,9 saflıkta) metanol (HPLC saflığında, MERCK) ve etanol (HPLC saflığında, SIGMA-ALDRICH) kimyasal maddeleri
- UV Spektrofotometresinde kullanılan DPPH (2,2 Difenil 1 pikrilhidrazil) standart maddesi
- Gallik asit



- BHA (Bütillenmiş Hidroksi Anisol), BHT (Bütillenmiş Hidroksi Toluen)
- Folin reaktifi
- %20 sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )'tır.

### 6.3. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu

#### Numune hazırlama

Deneysel çalışmalarda kullanılan pelemir tohumu (*Cephalaria syriaca L.*) T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü' nden temin edilmiştir.

Öncelikle numunedeki nem içeriğinin ekstraksiyon verimine olumsuz etkisini önlemek için, pelemir tohumları etüvde 30 °C' de bir gün kurutulmuştur. Daha sonra, numune Resim 6.1 de verilen bitki değirmeninde öğütülmüş, daha küçük boyutları elde edebilmek için kahve değirmeninde tekrar öğütülmüştür. Öğütülen bitkinin boyutları farklı elekler kullanılarak sınıflandırılmıştır. 0,710-0,355 mm aralığındaki numune partikülleri ekstraksiyon işleminde kullanılmıştır.



Resim 6.1. Bitki değirmeni

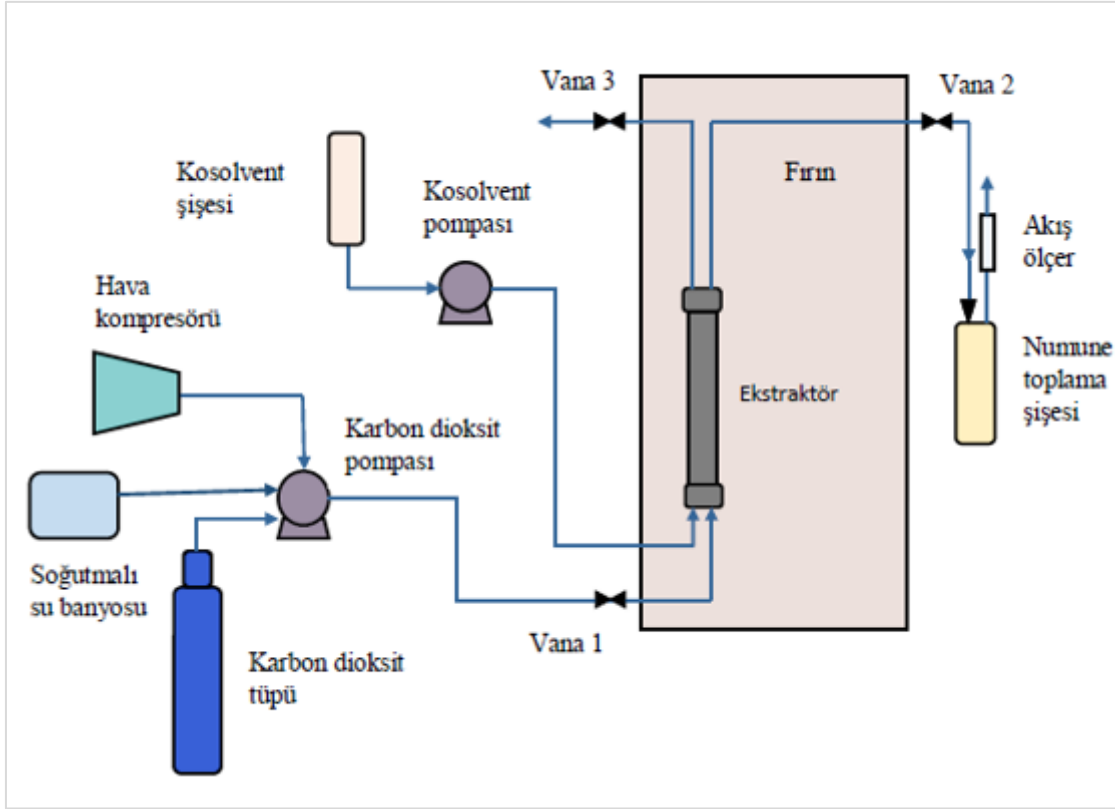
## Deney Sistemi

Ekstaksiyon sisteminin görüntüsü Resim 6.2' de verilmiştir. Sistem sifonlu karbon dioksit tüpü, yüksek basınç pompası, soğutucu, kompresör, fırın içerisine yerleştirilmiş ekstraktör, akış ölçer, numune toplama kabı ve modifiye pompadan oluşmaktadır.



Resim 6.2. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon sistemi

Ekstrakt eldesi için 4 g numune 24 ml hacimli paslanmaz çelik ekstraktöre cam pamuklar arasına yerleştirilmiştir. Ekstraktörden kaynaklanabilecek sızıntıları önlemek için her iki ucuna conta yerleştirilerek kapatılmıştır. Ekstraktör fırın içerisine yerleştirilerek bağlantıları gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla kompresör, karbon dioksit tüpü, devridaim banyo sistemi, pompa ve kosolvent pompası açılmıştır. Pompa basıncı ve fırının sıcaklığı çalışmak istenilen değerlere ayarlanmıştır. İstenilen sıcaklık ve basınca erişildiğinde ekstraksiyon işlemi başlatılmış, belirlenen süre boyunca devam edilmiştir. Karbon dioksit akış hızı fırın çıkışındaki akış ölçer yardımıyla istenilen değerde sabit tutulmuştur. Akış ölçerden sonra sistemde yer alan toplama kabında ekstraksiyon süresi boyunca elde edilen ekstrakt toplanmıştır. Bu özütler HPLC analizi için  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da muhafaza edilmiştir.



Şekil 6.1. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyon sisteminin akış diyagramı

SAE’da basınç ve sıcaklık en önemli parametrelerdir. Ayrıca özütlenmesi hedeflenen bileşenler genellikle polar olduğu için kosolvent (etanol) miktarı da önem taşımaktadır. Bu nedenlerle sıcaklık, basınç ve etanol akış hızı değişken parametreler olarak seçilmiştir. Sabit olan parametreler ise daha önce yapılan benzer çalışmalar referans alınarak ekstraksiyon süresi (120 dakika), numune partikül boyutu (0,710-0,355 mm), karbon dioksit akış hızı (3 L/min) olarak belirlenmiştir. Liu ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmada hurma çekirdeğinden SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile fenoliklerin optimizasyonu yapıp 120 dakika ekstraksiyon süresinde maksimum ekstrakt verimi elde edilmiştir. Ekinci ve Gürü (2014) tarafından yapılan çalışmada şeftali çekirdeğinden SK-CO<sub>2</sub> ile yağ ve  $\beta$ -sitosterol ekstraksiyonunda 0,3-1,7 mm tohumların partikül boyutunun yağ ve  $\beta$ -sitosterol miktarına etkisi incelenmiş ve 0,3-0,7 mm aralığındaki partikül boyutlarında yüksek verim elde edildiği görülmüştür. Chatterje ve Bhattacharjee (2012) tarafından yapılan çalışmada karanfil tomurcuklarından SK-CO<sub>2</sub> ile eugenol ekstraksiyonunda 0,5 mm partikül boyutu ve 2 L/min CO<sub>2</sub> akış hızı sabit parametre olarak belirlenip optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Değişken parametrelerin çalışma aralıkları Design Expert 11.1.2.0 Trial programı ile belirlenerek aşağıda verilmiştir.

Sıcaklık çalışma aralığı	: 26,4-93,7 (°C)
Basınç çalışma aralığı	: 72,0-357,9 (bar)
Etanol kosolventi çalışma aralığı	: 0,6-12,4 (%)

Program tarafından önerilen 20 deneye ait çalışma koşulları Çizelge 6.1 de verilmektedir.

Çizelge 6.1. Design Expert 11.1.2.0 Trial programı tarafından belirlenen ekstraksiyon çalışma koşulları

Standart No	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Etanol kosolventi (%)	CO <sub>2</sub> Akış Hızı (L/min)	Ekstraksiyon Süresi (min)
1	40,0	130,0	3	3,0	120,0
2	80,0	130,0	3	3,0	120,0
3	40,0	300,0	3	3,0	120,0
4	80,0	300,0	3	3,0	120,0
5	40,0	130,0	10	3,0	120,0
6	80,0	130,0	10	3,0	120,0
7	40,0	300,0	10	3,0	120,0
8	80,0	300,0	10	3,0	120,0
9	26,4	215,0	6,5	3,0	120,0
10	93,7	215,0	6,5	3,0	120,0
11	60,0	72,0	6,5	3,0	120,0
12	60,0	357,9	6,5	3,0	120,0
13	60,0	215,0	0,6	3,0	120,0
14	60,0	215,0	12,4	3,0	120,0
15	60,0	215,0	6,5	3,0	120,0
16	60,0	215,0	6,5	3,0	120,0
17	60,0	215,0	6,5	3,0	120,0
18	60,0	215,0	6,5	3,0	120,0
19	60,0	215,0	6,5	3,0	120,0
20	60,0	215,0	6,5	3,0	120,0

#### 6.4. Cephalaria Syriaca Bitkisinin Fenolik Bileşenlerinin Analiz Yöntemi

##### 6.4.1. HPLC yöntemi

Analizlere başlamadan önce kuersetin, rutin, kaempferol, apigenin, silibinin ve taksifolin standartları etanol ile çözülerek 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm ve 100 ppm derişimlerinde

hazırlanan çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Standartlara ait kromatogramlar Ek 1' de verilmiştir.

Elde edilen özütlerin içerisindeki flavonoidlerin varlığı ve miktarsal analizleri için özütler öncelikle santrifüj edilmiştir. Bu işlem kolondaki tıkanmaları önlemek için uygulanmıştır. HPLC cihazı aşağıda verilen şartlara getirilerek, 20 µL numune analiz için manuel olarak enjekte edilmiştir.

A çözücüsü	: % 99,9 deiyonize su ve % 0,1 formik asit
B çözücüsü	: % 75 asetonitril ve %25 metanol
Akış hızı	: 1 mL/min
Gradient	t : 0 .....%0 A ; % 0 B
	t : 0-12 min..... %0-50 A ; %0- 50 B
	t : 12-14 min..... %50 A ; % 50 B
	t : 14-15 min.....%50-0 A; %50-0 B
	t : 15-17 min.....%0 A; % 0 B
Kolon	: 250*4,6 mm*5µ
Dalga Boyu	: 254 nm

Hedeflenen flavonoidlerin derişimleri standartların kalibrasyon eğrilerinden faydalanarak belirlenmiştir. Her bir analiz iki kez tekrarlanarak sonuçların hesaplanmasında aritmetik ortalaması alınmıştır. Resim 6.3'de analizlerde kullanılan UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayarı verilmektedir.



Resim 6.3. UV dedektörlü HPLC cihazı ve bilgisayar

#### 6.4.2. Soxhlet yöntemi

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile karşılaştırabilmek amacıyla pelemir tohumlarından geleneksel ekstraksiyon yöntemi olan soxhlet yöntemi ile de özüt elde edilip, HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Resim 6.4' de soxhlet sistemi görülmektedir.



Resim 6.4. Soxhlet ekstraksiyon sistemi

Soxhlet metodu ile pelemir tohumlarından ekstrakt elde etme işlem basamakları aşağıda belirtilmiştir:

- Pelemir tohumları kurutulup öğütüldü. 0,710-0,355 mm partikül boyutu çalışma parametresi olarak ayarlanmıştır.
- Hazırlanan numuneden 10 g tartılıp kartuşun içerisine alınmıştır.
- Cam soxhlet düzeneği kurulup, ısıtıcının içerisine yerleştirildi. Geri soğutucu düzeneğini, soxhlet cihazının uygun bölümlerine yerleştirildi. Ardından su musluğu açılarak sistem deneye hazır hale getirilmiştir.
- Cam balon joje içerisine 120 mL etanol, kartuşun kenar kısımlarına ise 50 mL etanol koyulmuştur.
- Sistemin sıcaklığı ısıtıcı ile 120° C ye ayarlanmıştır.
- Isıtıcının derecesi damlama hızı 1 damla/s olacak şekilde optimize edilmiştir.
- Ekstraksiyon işlemine 8 saat süre ile devam edilmiştir.
- 8 saat sonunda balon jodede kalan sıvının hacmi ölçüldü. HPLC sistemi ile flavanoidlerin analizi ve miktarsal tayini yapılmıştır. Daha sonra, UV-VIS spektrofotometresi ile toplam antioksidan ve toplam fenolik madde miktarı analizi yapılmıştır.

#### **6.4.3. UV-VIS spektrofotometre yöntemi**

UV-VIS spektrofotometri cihazı kullanılarak numunenin toplam fenolik ve toplam antioksidan içeriklerini belirlemek için analizler yapılmıştır. Resim 6.5' de çift ışın yollu UV-VIS spektrofotometre cihazı görülmektedir.



Resim 6.5. UV-VIS spektrofotometre cihazı

### Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik tayini

#### *Kalibrasyon çözeltileri ve grafiğinin hazırlanması*

Öncelikle % 70' lik metanol çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 10 mg gallik asit standartı ile çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan %70' lik 10 mL gallik asit çözeltisinden 1 ml alınıp 9 ml %70 lik metanol ilave edilmiştir. Çözelti 10 ml ye tamamlanmış oldu. Buradan tekrar 1 ml alınıp 100 ml ye %70 lik metanol ile tamamlandı. Bu stok çözeltiden 20, 40, 60, 80 ve 100 µL alınıp üzerlerine 2420, 2400, 2380, 2360, 2340 µL saf su eklenmiştir. Ardından üzerlerine 0,2 mL seyreltilmemiş folin reaktifi eklenip 3 dk beklenildi. Hazırlanan her bir çözelti üzerine 0,6 mL %20 lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ilave edildi. Karanlık ortamda oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Sonra her bir çözeltinin absorbens değeri UV-VIS spektrofotometre kullanılarak metanol körüne karşı 765 nm' de okundu ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Pelemir tohumu ekstraktlarının absorbens değerleri oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılarak gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır.

#### *Numunelerin çözeltilerinin hazırlanması*

Her bir pelemir tohumu ekstraktından 1 mL alınıp 4 mL metanolde çözülmüştür. Hazırlanan her bir stok çözeltisinden 100 µL alınıp metanol (%100) ile 1 mL' ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 40 µL alınıp üzerine 2,4 mL saf su ve 0,2 mL



seyreltilmemiş folin reaktifi eklenip 3 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan her bir çözeltilerin üzerine 0,6 mL %20' lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  eklenip karanlıkta oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Sonra her bir çözeltinin absorbans değeri 765 nm' de okunmuştur.

### DPPH yöntemi – toplam antioksidan tayini

#### *DPPH (Difenilpikrilhidrazil) kalibrasyon çözeltisinin hazırlanması*

24 mg DPPH (394 g/mol) 1L metanolde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden seyreltme yoluyla 12mg/L, 6mg/L, 3mg/L ve 1.5mg/L olmak üzere farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Sırasıyla her bir çözeltinin absorbans değeri 517 nm'de UV-VIS spektrofotometrede metanol körüne karşı okunmuştur. Bu değerler kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

#### *Numune çözeltilerinin hazırlanması*

Her bir pelemir tohumu ekstraktlarından 1 mL alınıp 4 mL metanol ile çözülmüştür. Elde edilen 5 mL stok çözeltisinden 100  $\mu\text{L}$  alınıp 1 mL' ye tamamlanana kadar metanol ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin her birinden 0,2 mL alınarak üzerine 3,8 mL molaritesi  $6 \times 10^{-5}$  M olan DPPH ile hazırlanan stok çözeltiden ilave edilmiştir. Karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildikten sonra metanol körüne karşı absorbans değerleri okunmuştur. Doğruya en yakın sonucu elde edebilmek için hazırlanan çözeltinin absorbans değerleri üç kere okunup ortalama değerleri alınmıştır.

#### *BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol) ve BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen) standartlarının hazırlanması*

BHA standartından 0,01 g tartılıp 10 mL metanole tamamlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 100  $\mu\text{L}$  alınıp 1 mL metanole tamamlanmıştır. Aynı seyreltme işlemi BHT standardı için de yapılmıştır. BHA ve BHT için hazırlanan çözeltiden 0,2 mL alınıp 3.8 ml molaritesi  $6 \times 10^{-5}$  M olan DPPH ile hazırlanan standart çözeltiden ilave edilmiştir. Karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildikten sonra metanol körüne karşı 517 nm' de absorbans değerleri okunmuştur. Hazırlanan çözeltinin absorbans değerleri üç kere okunup ortalama değerleri alınmıştır.

## 6.5. Deneysel Tasarım Yöntemi

Birçok durumda, bazı kontrol edilebilir değişkenleri (faktörleri) bir yanıtla ilişkilendiren teorik model mevcut olmayabilir veya çok karmaşık olabilir. Bu durumda, değişkenler ve yanıt arasındaki ilişki ampirik olarak elde edilmelidir. YCM Box ve Wilson tarafından önerilmiştir. Ampirik bir modelle ortaya çıkan problemleri analiz etmeyi amaçlayan matematiksel ve istatistiksel tekniklerden oluşmaktadır (Sarabia ve Ortiz, 2009). YCM ile bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisi en iyi şekilde görselleştirilir. Deneysel aralık içinde iki değişken değiştirilip, üçüncüsü merkezi noktada sabit tutulur (Bala, Madhu, Tyagi ve Gupta, 2016). YCM optimizasyona uygulanması ile pahalı analiz yöntemlerinin (sonlu elemanlar yöntemi gibi) maliyetini azaltmayı amaçlamaktadır (Rikards ve Auzins, 2003).

Yapılan deneysel çalışmaların optimizasyonu için Design Expert 11.1.2.0 Trial programı kullanılmıştır. YCM için merkezi kompozit tasarımı kullanılmıştır. Deney sonuçları ve tartışma bölümünde elde edilen model ve sonuçlar ayrıntılı olarak incelenmiştir. SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu sürecine etki eden parametreler literatür çalışmalarından araştırılmıştır. Tez çalışmasında sıcaklık, basınç ve etanol kosolventi ekstraksiyon yöntemine en fazla etki eden parametreler olarak belirlenmiştir. Bu yüzden bu parametreler bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir.

Elde edilen ekstraktlardaki flavonoid miktarı ( $\mu\text{g}$  flavonoid / g bitki) ise bağımlı değişken olarak belirlenmiştir.



## 7. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 7.1. Yüzey Cevap Metoduyla Matematiksel Modelleme

Deneysel tasarım metodu kapsamında bağımsız değişkenler için ( $k=3$ ) için 2k “Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design)” uygulanmıştır. Bağımsız değişkenler sıcaklık, basınç ve etanol akış hızı olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada deney tasarımı; merkezde 6 nokta, merkez dışında 14 nokta olmak üzere toplam 20 noktadan oluşmaktadır.

Çizelge 7.1. Yüzey cevap metodu için seçilen parametreler

Bağımsız değişken	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Etanol kosolventi (%)
Tasarım değişkeni	A	B	C

Sıcaklık, basınç ve etanol akış hızı olarak belirlenen bağımsız değişkenlerin tasarım değişkenlerinin aralığı programdan elde edildi. Çizelge 7.2’ de tasarım değişken aralıkları görülmektedir.

Çizelge 7.2. Sıcaklık, basınç ve etanol kosolventi olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı

Bağımsız değişken	Tasarım değişkeni	Tasarım değişkenlerinin aralığı				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Sıcaklık (°C)	A	26,4	40	60	80	93,6
Basınç (bar)	B	72,0	130	215	300	357,9
Etanol kosolventi (%)	C	0,6	3	6,5	10	12,4

### 7.2. Peleminer Tohumundan Süperkritik CO<sub>2</sub> ile Rutin Ekstraksiyon Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi

Tasarım değişken aralığı temel alınarak programın önerdiği deneysel algoritma ve rutin ekstraksiyon çıktıları Çizelge 7.3’ de verilmiştir.

Çizelge 7.3. Deneysel algoritma ve rutin ekstraksiyon çıktıları

Deney No	A	B	C	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Etanol kosolventi (%)	Rutin miktarı (µg rutin/g tohum)
1	-1,00	-1,00	-1,00	40,00	130,0	3,0	44,22
2	1,00	-1,00	-1,00	80,00	130,0	3,0	30,87
3	-1,00	1,00	-1,00	40,00	300,0	3,0	55,45
4	1,00	1,00	-1,00	80,00	300,0	3,0	35,08
5	-1,00	-1,00	1,00	40,00	130,0	10,0	52,25
6	1,00	-1,00	1,00	80,00	130,0	10,0	39,73
7	-1,00	1,00	1,00	40,00	300,0	10,0	74,29
8	1,00	1,00	1,00	80,00	300,0	10,0	46,48
9	-1,68	0,00	0,00	26,36	215,0	6,5	27,32
10	1,68	0,00	0,00	93,64	215,0	6,5	15,98
11	0,00	-1,68	0,00	60,00	72,05	6,5	41,88
12	0,00	1,68	0,00	60,00	357,9	6,5	62,65
13	0,00	0,00	-1,68	60,00	215,0	0,6	48,27
14	0,00	0,00	1,68	60,00	215,0	12,4	58,29
15	0,00	0,00	0,00	60,00	215,0	6,5	95,73
16	0,00	0,00	0,00	60,00	215,0	6,5	84,73
17	0,00	0,00	0,00	60,00	215,0	6,5	88,37
18	0,00	0,00	0,00	60,00	215,0	6,5	98,28
19	0,00	0,00	0,00	60,00	215,0	6,5	82,45
20	0,00	0,00	0,00	60,00	215,0	6,5	92,62

Programdan elde edilen modellerin varyans analizi (ANOVA testi) sonuçları çizelge 7.4' de verilmiştir.

Çizelge 7.4. Rutin deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri ve parametreler arası ilişkilerin anlamlılığı

Model	F değeri	P değeri
Model	23,01	< 0,0001 (önemli = (significant))
A	11,71	0,0065
B	8,46	0,0156
C	5,52	0,0406
AB	1,15	0,3091
AC	0,1006	0,7576
BC	0,4108	0,5360
A <sup>2</sup>	136,26	< 0,0001
B <sup>2</sup>	37,12	0,0001
C <sup>2</sup>	34,91	0,0001
Uyum eksikliği (lack of fit)	1,78	0,2703 (önemsiz = (not significant))

ANOVA analizinde modelin F- testi değeri 23,01 olarak bulunmuştur. Bu değer modelin geçerli olduğunu göstermektedir. P değerleri ise modeldeki terimlerin önemli olup olmadığını gösterir. 0,05' ten büyük olan değerler ihmal edilir (García-Martínez ve diğerleri, 2017). Yukarıdaki tablo incelendiğinde etanol kosolventli süperkritik karbondioksit ile pelemir tohumundan rutin ekstraksiyonu çalışmasında, etki eden en önemli parametrenin en düşük P-değerine sahip olan sıcaklığın karesi ( $A^2$ ), basıncın karesi ( $B^2$ ) ve etanol kosolventinin karesi ( $C^2$ ) olduğu görülmektedir. Ayrıca sıcaklık (A), basınç (B) ve etanol kosolventi (C) değerleri de bu model için önemli parametreler arasındadır.

Bağımlı değişken (ekstrakt verimi) ve bağımsız değişkenler (sıcaklık, basınç ve etanol kosolventi) arasındaki bağlantının modeldeki uyumunu regresyon katsayısı ( $R^2$ ) gösterir. Çizelge 7.5' te rutin modeli için hesaplanan standart sapma, varyasyon katsayısı ve regresyon katsayısı verilmiştir. Regresyon katsayısının ( $R^2$ ) değeri 0,9539 olarak hesaplandı. Bu değer 1' e yakındır. Bu yüksek değer model ve deneysel verilerin arasında iyi bir uyumun olduğunu gösterir. Uyum eksikliği (Lack of fit) değeri ise anlamlı bir model için önemli olmaması gerekir. Bu değer 0,05' ten büyük olması seçilen deney aralığının model tarafından açıklanmaya uygun olduğunu göstermektedir (García-Martínez ve diğerleri, 2017). Modelde siyalin gürültüye oranını 'Adeq Precision (yeterli doğruluk)' ifadesi belirlemektedir. Bu oranın 4' ten büyük olması istenilmektedir. 14,5015 olarak hesaplanan bu oran yeterli sinyalin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 7.5. Rutin için hesaplanan model istatistikleri

	Değer
Standart sapma	7,36
Varyasyon katsayısı (C.V.%)	12,54
Regresyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9539

Rutin verimini ifade eden denklem Eş. 7.1' de verilmiştir. Sıcaklık (A), basınç (B), etanol kosolventi (C) parametrelerinin gerçek ve kodlanmış değerlerinin 2. Derece modele göre optimizasyonu yapılarak, yanıt olarak rutin miktarı elde edildi. Bu denklem parametrelerin tek başına ve birbirleriyle olan etkileşimi gösteren bir denklemdir.

$$\text{Rutin miktarı} = x_0 + (x_1 \times A) + (x_2 \times B) + (x_3 \times C) + (x_4 \times AB) + (x_5 \times AC) + (x_6 \times BC) + (x_7 \times A^2) + (x_8 \times B^2) + (x_9 \times C^2) \quad (7.1)$$

Pelemir tohumundan süperkritik karbon dioksit ile rutin ekstraksiyonu süreci üzerine Design Expert 11.1.2.0 programı ile hesaplanan katsayılar cinsinden elde edilen eşitlik Eş. 7.2' de verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Rutin miktarı} = & 90,11+(-6,82\times A)+(5,80\times B)+(4,68\times C)+(-2,79\times AB)+ \\ & (-0,8261\times AC)+(1,67\times BC)+(-22,65\times A^2)+(-11,82\times B^2)+(-11,46\times C^2) \end{aligned} \quad (7.2)$$

Bu eşitliğe göre parametrelerin sürece etkisi incelenmiştir.

### 7.3. Parametrelerin Rutin Ekstraksiyon Sürecine Etkisi

Bu bölümde pelemir tohumundan süperkritik karbon dioksit ile rutin ekstraksiyonu sürecine ikili parametrelerin etkisi açıklanmıştır.

#### 7.3.1. Rutin ekstraksiyon miktarına sıcaklık-basınç parametresinin etkisi

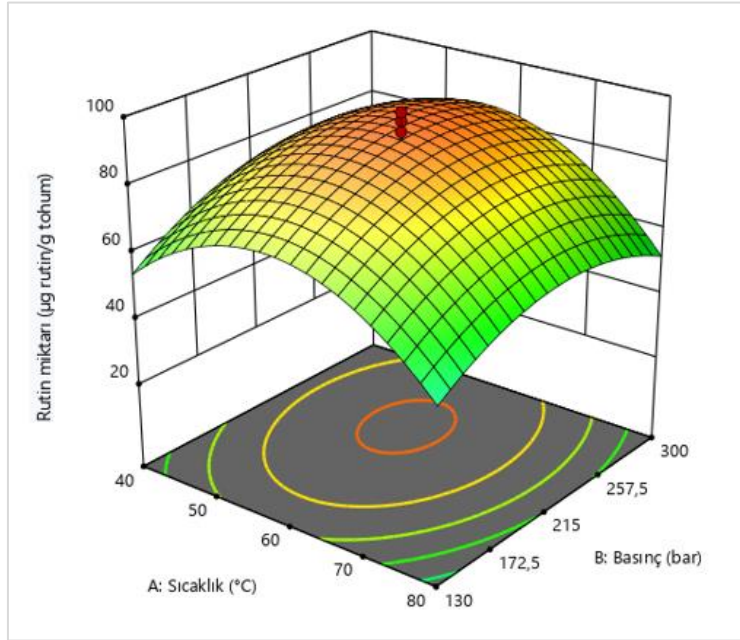
Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile rutin ekstraksiyon sürecine sıcaklık-basınç ikili parametresinin etkisini incelemek amacıyla etanol kosolventi C=0 olarak kabul edildi. Eş. 7.2' de verilen modele ait denklem yeniden düzenlenerek Eş. 7.3' te verilen denklem elde edilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Rutin miktarı} = & 90,11+(-6,82\times A)+(5,80\times B)+(-2,79\times AB)+(-22,65\times A^2)+ \\ & (-11,82\times B^2) \end{aligned} \quad (7.3)$$

Eş. 7.3 incelendiğinde sıcaklık (A) parametresinin önündeki katsayı (-6,82<0) olması sıcaklık parametresinin artması süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile pelemir tohumundan elde edilen rutin miktarını olumsuz etkilediği anlamına gelir. Buna karşılık, basınç (B) parametresinin önündeki katsayı (0<5,80) olması basınç parametresinin artması elde edilen rutin miktarını artırmaktadır. Çizelge 7.3' ten de görüldüğü üzere düşük sıcaklıkta basınça artışı, yüksek sıcaklıktaki basınç artışından daha etkili olmuştur. 40 °C sıcaklıkta 130 bar basınçta ekstrakte edilen rutin miktarı 44,22 µg rutin/g tohum iken bu değer aynı sıcaklık ve akış hızında 300 bar basınçta 55,45' e yükselmiştir. Ancak sıcaklık 80 °C ta iken sabit etanol akış hızında basınç 130 bardan 300 bara çıktığında ekstrakte edilen rutin miktarı 30,87 µg rutin/g tohum'dan 35,08 µg rutin/g tohum 'a yükselmiştir. Liu ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmada SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile hurma

çekirdeği (*Date seed*) kullanılarak toplam fenolik madde miktarı ekstraksiyonu çalışılmıştır. Toplam fenolik içeriğinin maksimum verimi için optimum şartlar 50 °C sıcaklık, 350 bar basınç ve 2 saat ekstraksiyon süresi olarak bulunmuştur. Sıcaklık ve basınç parametrelerinin rutin miktarına etkisi bu çalışma sonucu ile desteklenmektedir.

Sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin etkisi değerlendirildiğinde, sıcaklık (A) ve basınç (B) parametrelerinin her ikisinin de pozitif ya da negatif değerlerinde elde edilen rutin miktarı azalmaktadır ( $-2,79 < 0$ ). Şekil 7.1' de sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin rutin miktarına etkisi yer almaktadır.



Şekil 7.1. Rutin miktarına sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin etkisi

Şekil 7.1 incelendiğinde pelemin tohumunun SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu sürecinde basıncın düşük değerinde (130 bar), sıcaklık 40 °C' den 80 °C' ye doğru arttıkça rutin miktarında azalma görülmüştür. Benzer şekilde, yüksek basınç değerinde (300 bar), sıcaklık 40 °C' den 80 °C' ye doğru arttıkça rutin miktarında azalma gözlenmiştir. Artan basınçla akışkan yoğunluğu artar, bu durum da SK-CO<sub>2</sub>' de bileşiklerin çözünürlüğünü artırmaktadır. Ancak difüzyon katsayısındaki azalma ile bir dereceye kadar dengelenir, bu da çözücünün numunenin içine girme kapasitesinde ve yüksek basınçta ekstraksiyon veriminde azalmaya sebep olur. İç ve dış kütle transfer direncinin ekstraksiyon verimi üzerinde negatif etkisi vardır. Kumhom ve diğerleri (2011) tarafından kosolvent ilaveli SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile



soya fasulyesinden izoflavon ekstraksiyonu çalışmasında yukarıdaki açıklamayı da destekleyen basıncın artmasının pozitif etkisinin negatif etkisini aştığı görülmüştür.

Sabit basınçta sıcaklık arttıkça karbon dioksitin yoğunluğunun azalması, SK-CO<sub>2</sub>' in çözücü gücünün azalmasına sebep olmaktadır (Bimakr ve diğerleri, 2012). Düşük sıcaklık aralıklarında sıcaklık arttıkça elde edilen rutin miktarının artması, sıcaklığın arttıkça ekstraksiyonu yapılan bileşiğin buhar basıncının artmasından dolayı difüzyonun artması ile açıklanabilir. Farklı basınç değerlerinde sıcaklık arttıkça elde edilen rutin miktarının önce artıp sonra azaldığı görülmektedir. Buna benzer şekilde, farklı sıcaklık değerlerinde basınç arttıkça rutin miktarı önce artıp sonra azalmıştır. Sıcaklık ve basınç parametreleri tek başına değerlendirildiğinde; sıcaklık parametresinin elde edilen ekstrakt miktarına olumsuz, basıncın ise olumlu etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak, iki parametrenin birbiriyle etkileşim içerisinde olması ile bu durum açıklanabilir. Peng, Mohd-Nasir, Setapar, Ahmad ve Lokhat (2020) tarafından yapılan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile bamya çiçeği tohumundan tokoferol ekstraksiyonu çalışmasında YCM ile optimizasyon yapılmıştır. Sıcaklık ve basıncın tokoferol ekstraksiyonu üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu grafiğe göre, sıcaklık artırıldığında basınç maksimum noktaya kadar arttıkça elde edilen tokoferol konsantrasyonunun artıp daha sonra basınç arttıkça azalmaya başladığı görülmüştür. Bu iki parametrenin ikili etkileşimi değerlendirildiğinde ileri sürülen yorum bu çalışma ile desteklenmektedir.

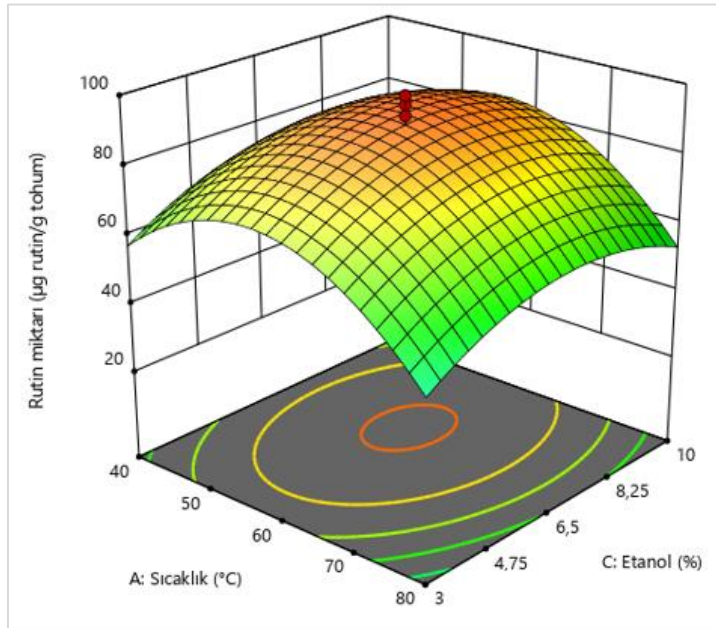
### 7.3.2. Rutin ekstraksiyon miktarına sıcaklık-etanol parametresinin etkisi

Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile rutin ekstraksiyonu sürecine sıcaklık-etanol parametresinin etkisini incelemek için basınç parametresi B=0 olarak kabul edilmiştir. Modele ait denklem yeniden düzenlenerek Eş. 7.4 elde edilmiştir.

$$\text{Rutin miktarı} = 90,11 + (-6,82 \times A) + (4,68 \times C) + (-0,8261 \times AC) + (-22,65 \times A^2) + (-11,46 \times C^2) \quad (7.4)$$

Eş. 7.4 incelendiğinde sıcaklık (A) parametresinin önündeki katsayının negatif (-6,82 < 0) olması rutin miktarını olumsuz etkilemektedir. Etanol kosolventi parametresi ise buna zıt özellik göstermektedir. Etanol kosolventi (C) parametresinin önündeki katsayının pozitif (0 < 4,68) olması rutin miktarını olumlu etkilemektedir. Chai, Yusup, Ruslan ve Chin (2020) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu metodu kullanılarak *Carica papaya linn*

yapraklarından elde edilen ekstraktların YCM ile optimizasyonu çalışmasında sıcaklık, basınç ve karbon dioksit akış hızının aynı olduğu deney şartlarında etanol kosolventinin artması ile ekstraksiyon veriminin arttığı tespit edilmiştir. Buna karşılık basınç, karbon dioksit akış hızı ve etanol kosolventi bağımsız değişkenlerin sabit olduğu deney şartlarında, sıcaklık arttıkça verimin azaldığı gözlenmiştir. Sıcaklık-etanol kosolventi ikili etkileşimi değerlendirildiğinde, ikili etkileşimin (AC) önündeki katsayının negatif ( $-0,8261 < 0$ ) olması elde edilen rutin miktarını düşürmektedir. Şekil 7.2' de sıcaklık-etanol ikili etkileşiminin rutin miktarına etkisi verilmiştir.



Şekil 7.2. Rutin miktarına sıcaklık-etanol ikili etkileşiminin etkisi

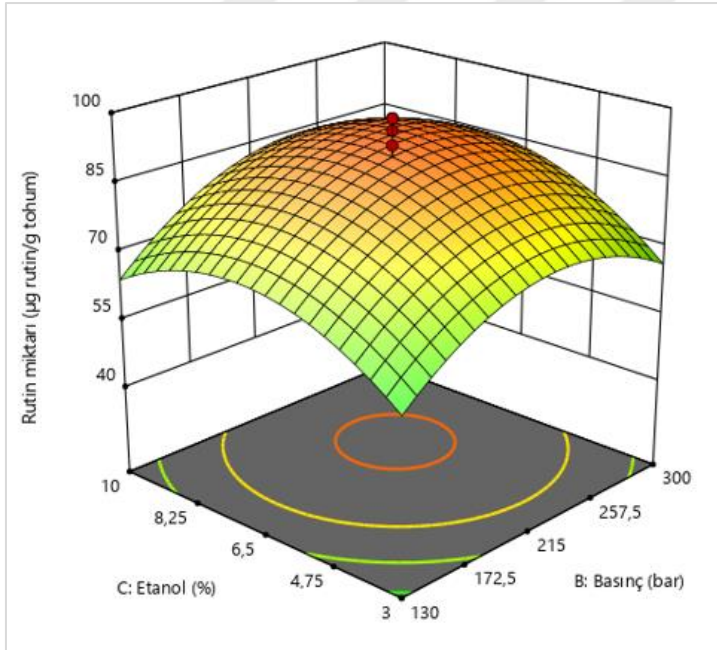
Parametreler tek başına değerlendirildiğinde ise sıcaklık arttıkça ısıya duyarlı bileşiklerin bozunması elde edilen flavonoid miktarını azaltmakta, bu durumun tam tersi olarak etanol oranı arttıkça süperkritik akışkan karışımının polaritesinin artması polar bileşikleri çözme gücünü artırdığından dolayı elde edilen rutin miktarı artmaktadır. Şekil 7.2 incelendiğinde sıcaklık değerleri yükseldikçe rutin miktarı önce artıp sonra azalmıştır. Aynı şekilde etanol kosolventi arttıkça elde edilen rutin miktarı önce artıp sonra azaldığı gözlenmiştir. Ameer, Chun ve Kwon (2017) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile şeker otu (*Stevia rebaudiana*) yapraklarından steviol glikozitleri ve toplam fenolik içeriklerinin YCM ile optimizasyonu çalışmasında bağımsız değişkenler olarak sıcaklık, basınç ve kosolvent konsantrasyonu seçilmiştir. Sıcaklık ve kosolvent yüzdesi ikili parametrenin verim üzerindeki etkisine göre sıcaklık ve kosolvent arttıkça verimin önce artıp sonra azaldığı tespit edilmiştir.

### 7.3.3. Rutin ekstraksiyon miktarına basınç-etanol parametresinin etkisi

Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile rutin ekstraksiyonu sürecine basınç-etanol ikili etkisini incelemek için sıcaklık parametresi (A=0) olarak kabul edilmiştir. Modele ait denklem yeniden düzenlenerek Eş. 7.5 elde edilmiştir.

$$\text{Rutin miktarı} = 90,11 + (5,80 \times B) + (4,68 \times C) + (1,67 \times BC) + (-11,82 \times B^2) + (-11,46 \times C^2) \quad (7.5)$$

Eş. 7.5 incelendiğinde basınç (B) parametresinin önündeki katsayı pozitif (5,80>0) olmasından dolayı, basıncın artması ile rutin miktarının arttığını göstermektedir. Benzer şekilde etanol kosolventi (C) parametresinin önündeki katsayının pozitif (4,68>0) olması, etanol miktarının artması rutin miktarını olumlu etkilemektedir. Basınç-etanol (BC) ikili etkileşimi değerlendirildiğinde, önündeki katsayının pozitif (1,67>0) olması rutin miktarını artırdığını göstermektedir. Şekil 7.3'de basınç-etanol ikili etkileşiminin rutin miktarına etkisi verilmiştir.



Şekil 7.3. Rutin miktarına basınç-etanol ikili etkileşiminin etkisi

Basınç ve etanol parametreleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde her ikisi de yükseldikçe elde edilen miktar artmaktadır. Chai ve diğerleri (2020) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile *Carica papaya linn* yapraklarından elde ettikleri ekstraktların yüzey cevap metodu ile optimizasyonu çalışmasında basınç, sıcaklık ve karbon dioksit akış hızının aynı olduğu

deney şartlarında kosolvent arttıkça elde edilen verimin arttığı gözlenmiştir. Sıcaklık, karbon dioksit akış hızı ve kosolvent parametrelerinin sabit olduğu koşullarda ise basınç arttıkça verimin arttığı gözlenmiştir. Şekil 7.3 incelendiğinde basınç değeri arttıkça rutin miktarı önce artıp sonra azalmıştır. Benzer şekilde etanol kosolventi parametresinin değeri yükseldikçe rutin miktarının önce artıp sonra azaldığı gözlemlenmiştir. Ameer ve diğerleri (2017) tarafından SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile şeker otu (*Stevia rebaudiana*) yapraklarından steviol glikozitleri ve toplam fenolik içeriklerini YCM ile optimizasyon çalışmasında basınç ve kosolvent parametrelerinin birlikte verim üzerindeki etkisine göre basınç ve kosolvent konsantrasyonu arttıkça verimin önce artıp sonra azaldığı gözlenmiştir. İkili etkileşim sebebiyle her bir çalışma kendi çalışma koşulu içinde farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

#### 7.4. Pelemir Tohumundan Süperkritik CO<sub>2</sub> ile Silibinin Ekstraksiyon Verimine İşletim Parametrelerin Etkisi

Tasarım değişken aralığı temel alınarak programın önerdiği deneysel algoritma ve silibinin ekstraksiyon çıktıları Çizelge 7.6' da verilmiştir.

Çizelge 7.6. Deneysel algoritma ve silibinin ekstraksiyon çıktıları

Deney No	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Etanol kosolventi (%)	Silibinin miktarı (µg silibinin/g tohum)
1	40,0	130,0	3,0	0,698596
2	80,0	130,0	3,0	0,33568
3	40,0	300,0	3,0	1,5644
4	80,0	300,0	3,0	0,82565
5	40,0	130,0	10,0	1,33217
6	80,0	130,0	10,0	0,498444
7	40,0	300,0	10,0	2,59095
8	80,0	300,0	10,0	1,06681
9	26,4	215,0	6,5	2,31884
10	93,7	215,0	6,5	0,41084
11	60,0	72,0	6,5	0,23568
12	60,0	357,9	6,5	1,23039
13	60,0	215,0	0,6	0,560394
14	60,0	215,0	12,4	1,85889
15	60,0	215,0	6,5	1,98022
16	60,0	215,0	6,5	1,72394
17	60,0	215,0	6,5	1,55719
18	60,0	215,0	6,5	1,88473
19	60,0	215,0	6,5	2,26578
20	60,0	215,0	6,5	2,10979

Yanıt olarak seçilen silibinin miktarı değerleri için program yardımıyla elde edilen modelin varyans analizi (ANOVA testi) sonuçları Çizelge 7.7’ de verilmiştir.

Çizelge 7.7. Silibinin deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri ve parametreler arası ilişkilerin anlamlılığı

	F değeri	P değeri
Model	21,73	<0,0001 (önemli=(significant))
A (sıcaklık)	64,61	<0,0001
B (basınç)	34,26	0,0002
C (etanol kosolventi)	26,22	0,0005
AB	2,82	0,1240
AC	3,91	0,0761
BC	0,5511	0,4749
A <sup>2</sup>	9,63	0,0112
B <sup>2</sup>	47,33	<0,0001
C <sup>2</sup>	16,24	0,0024
Uyum eksikliği (lack of fit)	0,5248	0,7519 (önemsiz=(not significant))

Varyans analizinde (ANOVA testi) modelin geçerli olduğunu gösteren F-testi değeri 21,73 olarak bulundu. Modeldeki terimlerin anlamlı olup olmadığını P değeri gösterir. Bu değeri 0,05’ ten büyük büyük olan terimler ihmal edilebilir. Çizelge 7.7 incelendiğinde SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile pelemir tohumundan silibinin ekstraksiyonu çalışmasına etki eden en önemli terimlerin sıcaklık (A) ve basıncın karesi (B<sup>2</sup>) olduğu görüldü. Bu model için önemli olan diğer terimler ise, basınç (B) ve etanol kosolventinin karesi (C<sup>2</sup>) olduğu görüldü. Uyum eksikliği (lack of fit) değeri modelin polinom derecesinin uygun olup olmadığı hakkında bilgi verir. Bu model için uyum eksikliği değeri 0,7519 (önemsiz) olarak hesaplandı. Önemsiz olması modelin polinom derecesinin uygun olduğunu ifade etmektedir. Eğer önemli çıkarsa modelin polinom derecesinin artırılmasına ihtiyaç duyulur. Modelde 15,2713 olarak hesaplanan ‘Adeq Precision (yeterli doğruluk)’ ifadesi yeterli sinyalin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 7.8. Silibinin için hesaplanan model istatistikleri

	Değer
Standart sapma	0,2245
Varyasyon katsayısı (C.V.%)	16,60
Regresyon katsayısı (R <sup>2</sup> )	0,9514

Yukarıdaki çizelge incelendiğinde modelin standart sapması 0,2245'tir. Regresyon katsayısı ( $R^2$ ), bağımsız değişkenler (sıcaklık, basınç, etanol kosolventi) ve bağımlı değişken (silibinin miktarı) arasındaki uyumu göstermektedir. Bu değer 0,9514 hesaplandı ve 1' e yakındır. Program tarafından tanımlanan parametrelerin gerçek ve kodlanmış değerler cinsinden Eş. 7.6' da silibinin miktarını ifade eden denklem verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Silibinin miktarı} = & x_0 + (x_1 \times A) + (x_2 \times B) + (x_3 \times C) + (x_4 \times AB) + (x_5 \times AC) + (x_6 \times BC) + \\ & (x_7 \times A^2) + (x_8 \times B^2) + (x_9 \times C^2) \end{aligned} \quad (7.6)$$

SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile pelemir tohumundan silibinin ekstraksiyonu çalışmasında Eş. 7.7' de Design Expert 11.1.2.0. Trial programı ile modelin değişkenler cinsinden silibinin miktarını göstermektedir.

$$\begin{aligned} \text{Silibinin miktarı} = & 1,92 + (-0,4883 \times A) + (0,3556 \times B) + (0,3110 \times C) + (-0,1333 \times A) + \\ & (-0,1570 \times AC) + (0,0589 \times BC) + (-0,1835 \times A^2) + (-0,4068 \times B^2) + \\ & (-0,2383 \times C^2) \end{aligned} \quad (7.7)$$

Eş. 7.7 'deki herbir parametrenin silibinin ekstraksiyon sürecine etkisi incelenecektir.

## 7.5. Parametrelerin Silibinin Ekstraksiyonu Sürecine Etkisi

Bu bölümde SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile pelemir tohumundan silibinin ekstraksiyonu sürecine ikili parametrelerin etkisi incelenmiştir.

### 7.5.1. Silibinin ekstraksiyonu miktarına sıcaklık-basınç parametresinin etkisi

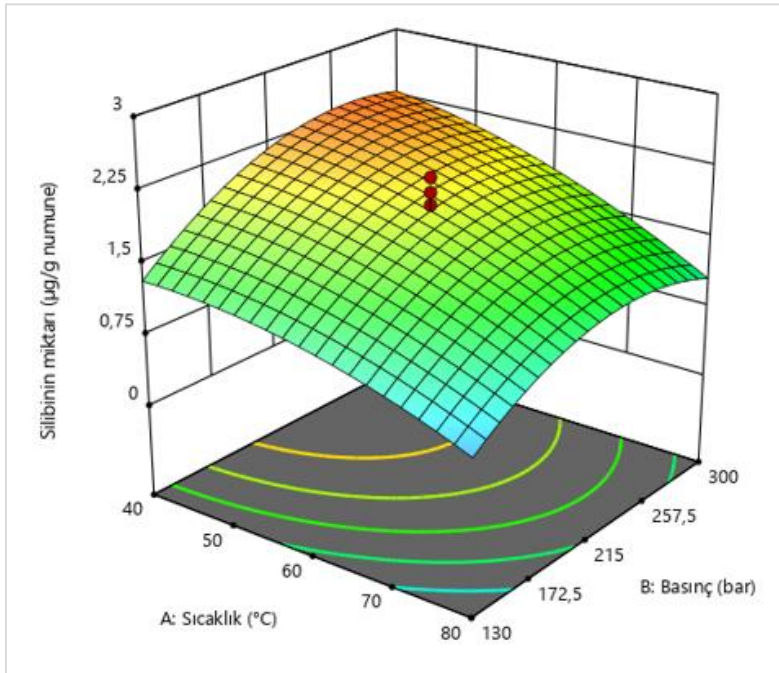
SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile pelemir tohumundan silibinin ekstraksiyonu sürecine sıcaklık-basınç parametrelerinin ikili etkisini incelemek için etanol kosolventi parametresi C=0 olarak kabul edildi. Modele ait Eş. 7.7 tekrar düzenlenerek Eş. 7.8 elde edilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Silibinin miktarı} = & 1,92 + (-0,4883 \times A) + (0,3556 \times B) + (-0,1333 \times AB) + \\ & (-0,1835 \times A^2) + (-0,4068 \times B^2) \end{aligned} \quad (7.8)$$

Eş. 7.8. incelendiğinde sıcaklık (A) parametresinin önündeki katsayının negatif (-0,4883<0) olması sıcaklık parametresinin artması SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile pelemir

tohumundan elde edilen silibinin miktarını olumsuz etkilediği anlamına gelir. Buna karşılık, basınç (B) parametresinin önündeki katsayının pozitif ( $5,80 > 0$ ) olması basınç parametresinin artması elde edilen silibinin miktarını artırmaktadır.

Sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin etkisi değerlendirildiğinde, sıcaklık (A) ve basınç (B) parametrelerinin her ikisinin de pozitif ya da negatif değerlerinde elde edilen silibinin miktarı azalmaktadır ( $-0,1333 < 0$ ). Şekil 7.4' te sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin silibinin miktarına etkisi yer almaktadır.



Şekil 7.4. Silibinin miktarına sıcaklık-basınç ikili etkileşiminin etkisi

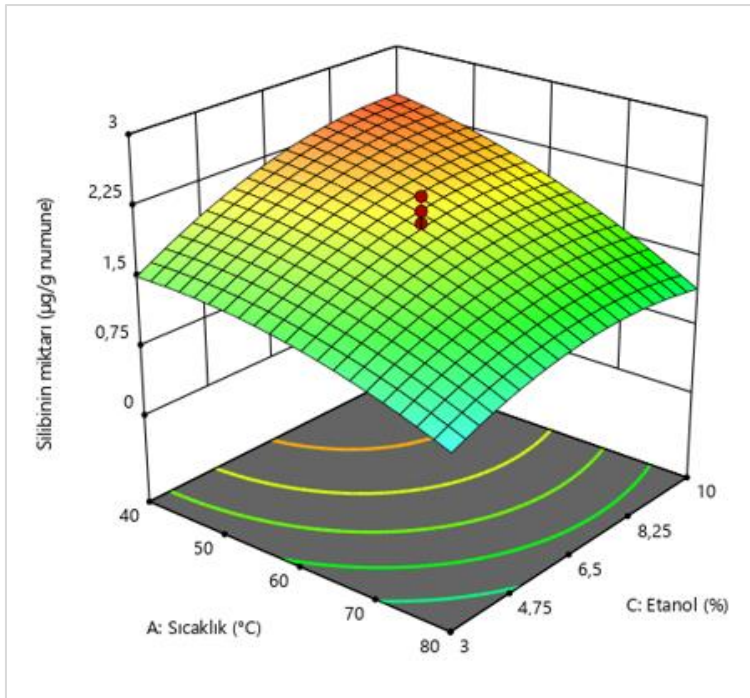
Şekil 7.4 incelendiğinde sıcaklık 40 °C' dan 80 °C' a yükseldiğinde elde edilen silibinin miktarının azaldığı görülmüştür. Basınç arttıkça elde edilen silibinin miktarının önce artıp sonra azaldığı kaydedilmiştir. Sıcaklık parametresinin etkisi tek başına değerlendirildiğinde, sıcaklık arttıkça elde edilen flavonoid miktarında azalma görülür. Buna karşılık, basıncın etkisi tek başına değerlendirildiğinde ise elde edilen miktarın artması gerekir. Ancak, parametrelerin ikili etkileşiminden dolayı beklenenden farklı olmuştur.

### 7.5.2. Silibinin ekstraksiyonu miktarına sıcaklık-etanol kosolventi parametresinin etkisi

Pelemir tohumdan SK-CO<sub>2</sub> ile silibinin ekstraksiyonu sürecine sıcaklık-etanol kosolventi parametresini incelemek için basınç parametresi B=0 olarak kabul edildi. Modele ait olan Eş. 7.7 yeniden düzenlenerek Eş. 7.9 elde edildi.

$$\text{Silibinin miktarı} = 1,92 + (-0,4883 \times A) + (0,3110 \times C) + (-0,1570 \times AC) + (-0,1835 \times A^2) + (-0,2383 \times C^2) \quad (7.9)$$

Eş. 7.9 incelendiğinde sıcaklık parametresinin önündeki katsayının negatif olması (-0,4883<0) pelemir tohumundan silibinin elde etme miktarını azaltmaktadır. Buna tam zıt olarak, etanol kosolventinin önündeki katsayının pozitif olması (0,3110>0) silibinin miktarını artırmaktadır. Sıcaklık-etanol kosolventi ikili parametresi incelendiğinde ise, bu terimin önündeki katsayının negatif olması (-0,1570<0) ekstraksiyonu yapılan silibinin miktarını azaltmaktadır. Şekil 7.5’ te sıcaklık-etanol ikili etkileşiminin silibinin miktarına etkisi verilmiştir.



Şekil 7.5. Silibinin miktarına sıcaklık-etanol ikili etkileşiminin etkisi



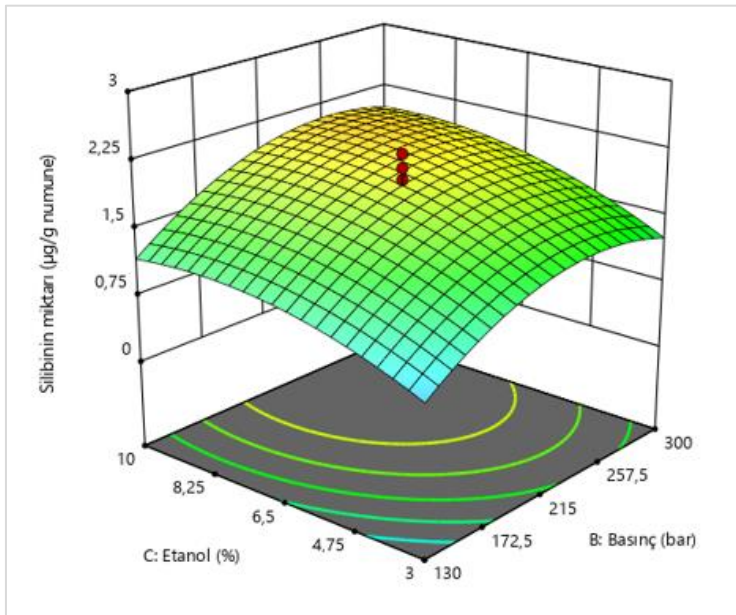
Şekil 7.5 incelendiğinde sıcaklık arttıkça elde edilen silibinin miktarının azaldığı görülmektedir. Etanol kosolventi değeri arttıkça silibinin miktarı artmaktadır. Bu parametreler ayrı ayrı değerlendirildiğinde beklenen bir durumdur.

### 7.5.3. Silibinin ekstraksiyonu miktarına basınç-etanol kosolventi parametresinin etkisi

Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ile silibinin eldesi basınç-etanol kosolventi ikili parametresinin etkisini gözlemlemek için sıcaklık parametresi A=0 kabul edildi. Modele ait olan Eş. 7.7 yeniden düzenlenerek Eş. 6.10 elde edildi.

$$\text{Silibinin miktarı} = 1,92 + (0,3556 \times B) + (0,3110 \times C) + (0,0589 \times BC) + (-0,4068 \times B^2) + (-0,2383 \times C^2) \quad (7.10)$$

Eş. 7.10 incelendiğinde basınç (B) parametresinin önünde bulunan katsayı pozitif ( $0,3556 > 0$ ) olması basınç arttıkça silibinin miktarı artmaktadır. Bu durum etanol kosolventi parametresi ile benzerlik göstermektedir. Etanol kosolventi (C) parametresinin önündeki katsayının pozitif ( $0,3110 > 0$ ) olması silibinin ekstraksiyonu miktarını olumlu etkilemektedir. Basınç-etanol ikili etkileşimi değerlendirildiğinde, bu terimin önündeki katsayının pozitif ( $0,0589 > 0$ ) olması silibinin ekstraksiyon miktarını artırmaktadır. Şekil 7.6' da basınç-etanol ikili etkileşiminin silibinin miktarına etkisi yer almaktadır.

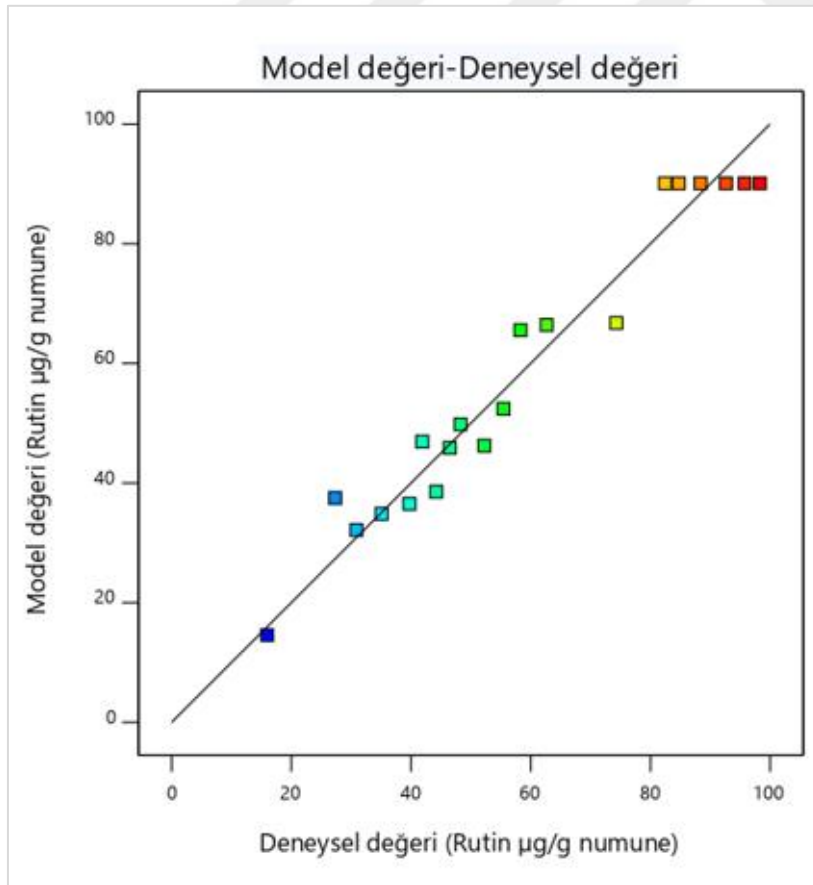


Şekil 7.6. Silibinin miktarına basınç-etanol ikili etkileşiminin etkisi

Şekil 7.6' da görüldüğü gibi basınç (B) arttıkça elde edilen silibinin miktarı önce artıp sonra azalmaktadır. Benzer şekilde etanol (C) arttıkça elde edilen özüt önce artıp sonra azalmıştır. Ancak, basınç ve etanol parametrelerinin değeri yükseldikçe elde edilen silibinin miktarının artması beklenirdi. Parametrelerin ikili etkileşiminden dolayı beklendiği gibi olmamıştır.

### 7.6. Pelemin Tohumundan Süperkritik CO<sub>2</sub> ile Ekstraksiyon Sürecinde Yüzey Cevap Metodu Optimizasyon Sonuçları

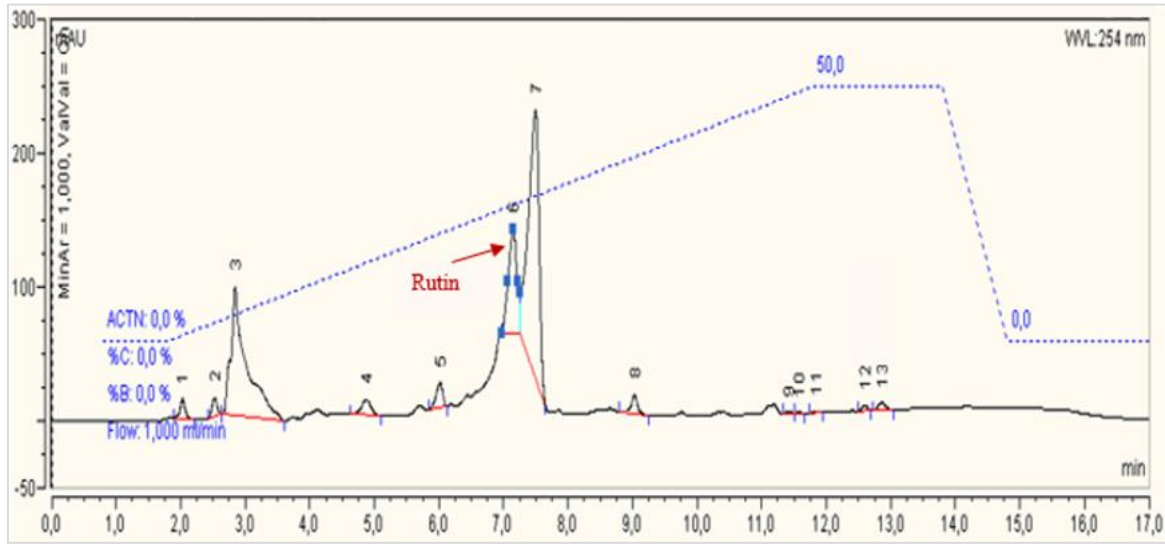
Design Expert programının önerdiği deneysel algoritma ile yapılan 20 adet deneysel çalışmanın ardından elde edilen veriler ile programın önerdiği modelin aynı koşullarda elde ettiği değerler arasındaki ilişki Şekil 7.7' de rutin miktarı için verilmiştir. Deneysel veriler sonucunda optimum koşullar düşük sıcaklık, yüksek basınç ve yüksek etanol kosolventi olarak belirlendiği için modelin öngördüğü değerler ile deneysel çalışma sonucunda elde edilen verilerin uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 7.7. Modelin öngördüğü rutin miktarı ile deneysel elde edilen miktarın kıyaslanması

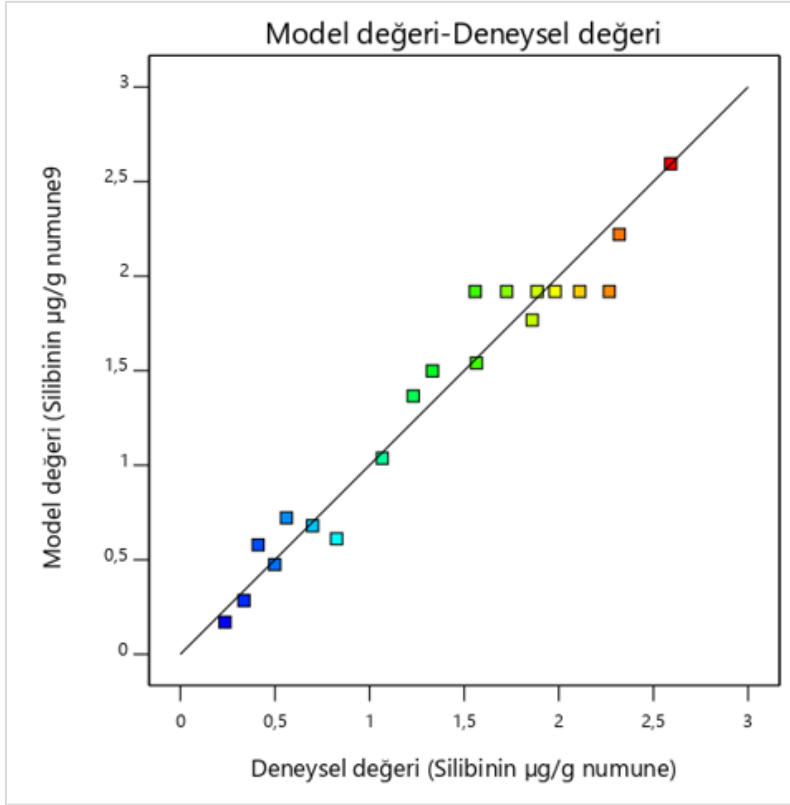
Pelemir tohumundan süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile rutin eldesi çalışmasında optimum koşullar; 60 °C sıcaklık, 215 bar basınç ve %6,5 etanol kosolventi olarak bulunmuştur. Bu optimum şartlardaki elde edilen rutin miktarı ise 90,11 µg rutin/g tohum olarak elde edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmada ise maksimum elde edilen rutin miktarı 98,28 µg rutin/g tohum olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda modelin öngördüğü değer ile deneysel çalışma sonucunda elde edilen değer in uyumlu olduğu görülmüştür.

Şekil 7.8’ de en yüksek rutin miktarının 60 °C sıcaklık, 215 bar basınç ve %6,5 etanol kosolventi parametrelerinde elde edilen çalışmaya ait HPLC kromatogramı verilmiştir.



Şekil 7.8. Rutin miktarının en yüksek elde edildiği 60 °C, 215 bar ve %6,5 etanol çalışma şartlarına ait kromatogram

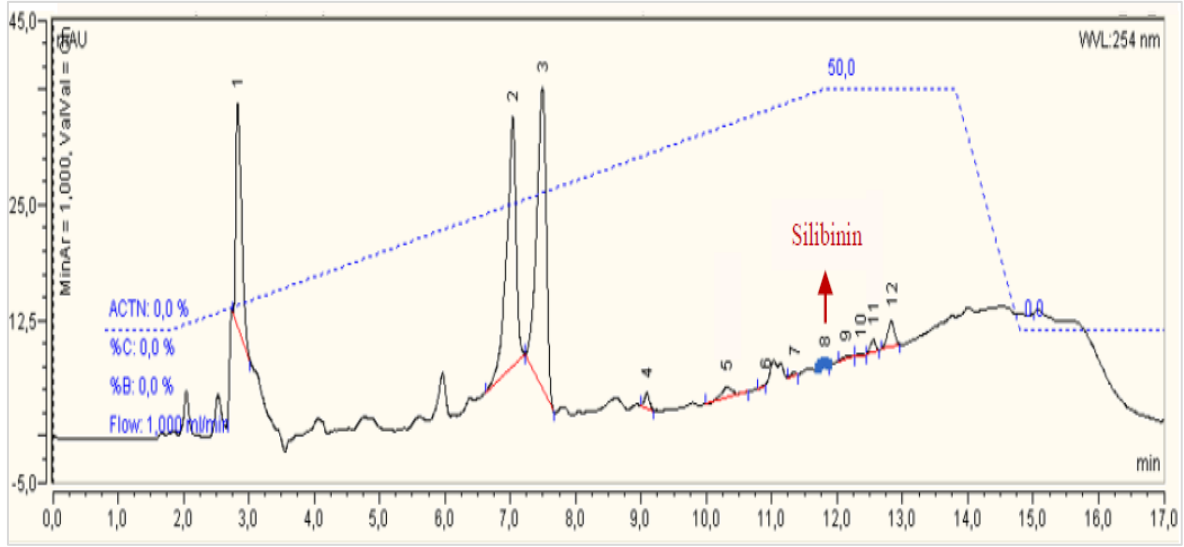
Şekil 7.9’ da silibinin miktarı için deneysel sonuçlar ve modelin öngördüğü değerlerin ilişkisi görülmektedir.



Şekil 7.9. Modelin öngördüğü silibinin miktarı ile deneysel elde edilen miktarın kıyaslanması

Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile silibinin eldesi çalışmasında optimum koşullar; 40 °C sıcaklık, 300 bar basınç ve %10 etanol kosolventi olarak bulunmuştur. Bu optimum şartlardaki elde edilen silibinin miktarı ise 2,59 µg silibinin/g tohum olarak elde edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmada ise maksimum elde edilen silibinin miktarı da 2,59 µg silibinin/g tohum olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda modelin öngördüğü değer ile deneysel çalışma sonucunda elde edilen değer uyumlu olduğu görülmüştür.

Şekil 7.10' da en yüksek silibinin miktarının 40 °C sıcaklık, 300 bar basınç ve %10 etanol kosolventi parametrelerinde elde edilen çalışmaya ait HPLC kromatogramı verilmiştir.

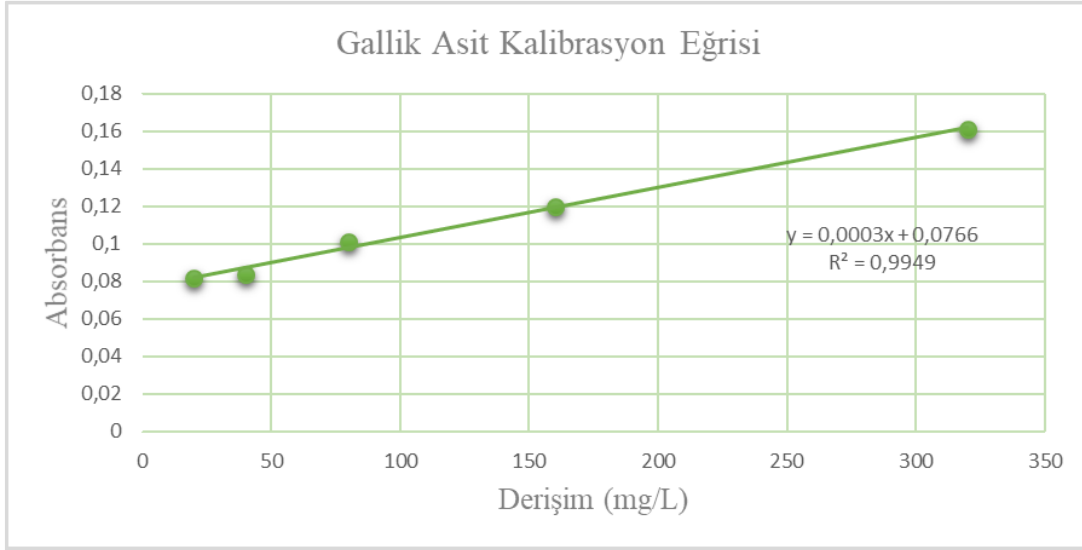


Şekil 7.10. Silibinin miktarının en yüksek elde edildiği 40 °C sıcaklık, 300 bar basınç ve % 10 etanol kosolventi çalışma şartlarına ait kromatogram

### 7.7. Pelemir Tohumundan Süperkritik CO<sub>2</sub> ile Ekstraksiyon Sürecinde Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları

Pelemir tohumundan elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde tayini yaygın bir yöntem olan Folin-Ciocalteu yöntemi ile yapılmıştır. Çoğu antioksidan çalışmalarında örnekteki fenolik içeriğinin tayininde kullanılan bir yöntemdir. Toplam fenolik madde tayininin temeli redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Fenolik bileşikler bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayracını indirgeyip oksitlenmiş forma dönüşürler. Bu yöntem ile bir örneğin indirgeme kapasitesi ölçülmektedir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra indirgenmiş ayracın meydana getirdiği mavi rengin absorbansı UV-VIS spektrofotometre ile 765 nm dalga boyunda referans maddeye karşı okunmuştur. Gallik asit ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisi denklemi yardımıyla gallik asit cinsinden eşdeğeri olan fenolik bileşik miktarı hesaplanmıştır.

Örnekteki toplam fenolik bileşik miktarı ‘mg gallik asit/L’ olarak belirtilmiştir. Şekil 7.11’ de gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği verilmiştir.



Şekil 7.11. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği

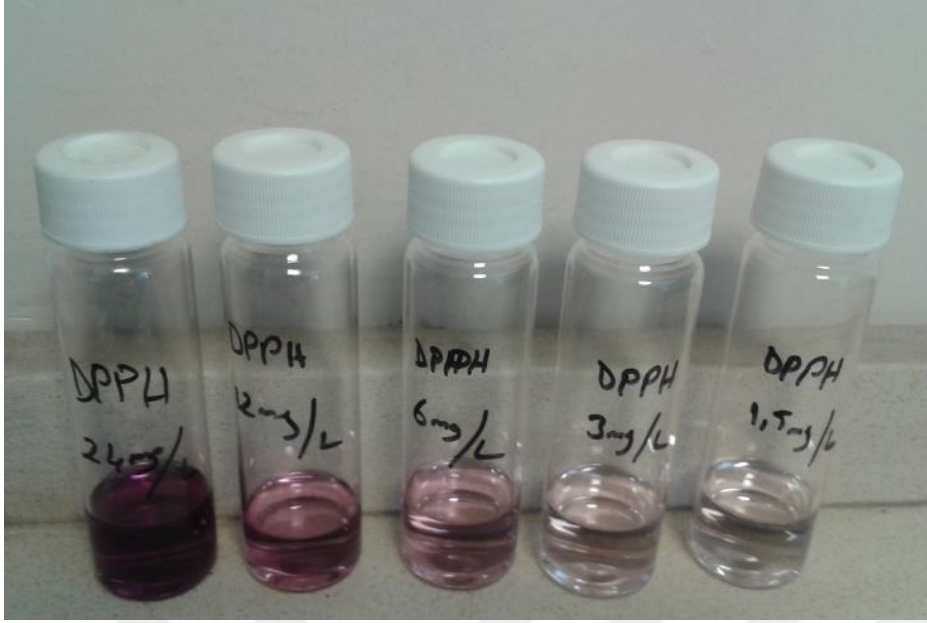
Çizelge 7.9' da pelemir tohumundan süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ve geleneksel soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilen ekstraktların gallik asit eşdeğeri cinsinden (GAE) toplam fenolik madde miktarları verilmiştir. Süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile yapılan 20 deneysel çalışma ile geleneksel soxhlet ekstraksiyonu yöntemi karşılaştırıldığında süperkritik CO<sub>2</sub> yöntemiyle elde edilen ekstraktlarda fenolik madde miktarlarının soxhlet yöntemine göre daha az olduğu görülmüştür. Cadena-Carrera ve arkadaşları (2019) tarafından guayusa yapraklarından etanol kosolventli SK-CO<sub>2</sub> ile ekstraksiyon çalışmasında, çözücü olarak etanol kullanıldığı soxhlet ekstraksiyonu, etanol kosolventli SK-CO<sub>2</sub> ve kosolventsiz SK- CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu çalışmaları ile elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı kıyaslandığında SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriğinin en düşük olduğu, soxhlet ekstraksiyonu ile yapılan çalışmada ise en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, tez çalışmasında elde edilen verileri destekler niteliktedir.

Çizelge 7.9. Süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ve soxhlet yöntemi deneyleri sonucu elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları

Deney No	y=Abs	x=Derişim (µg/ml)	c*v=m	m (mg GAE)/100 g tohum
1	0,311	781,333	2344	58,6
2	0,117	134,667	404	10,1
3	0,420	1144,667	3434	85,9
4	0,288	704,667	2114	52,9
5	0,127	168,000	7056	176,4
6	0,103	88,000	2024	50,6
7	0,176	331,333	7289,3	182,2
8	0,220	478,000	2868	71,7
9	0,170	311,333	8094,7	202,4
10	0,129	174,667	1921,3	48,0
11	0,363	954,667	8592	214,8
12	0,158	271,333	4884	122,1
13	0,280	678,000	2034	50,85
14	0,125	161,333	8550,7	213,8
15	0,139	208,000	5408	135,2
16	0,122	151,333	3783,3	94,6
17	0,142	218,000	3052	76,3
18	0,135	194,667	3893,3	97,3
19	0,195	394,667	4736	118,4
20	0,210	444,667	8893,3	222,3
Soxhlet	0,105	94,667	13253,3	331,3

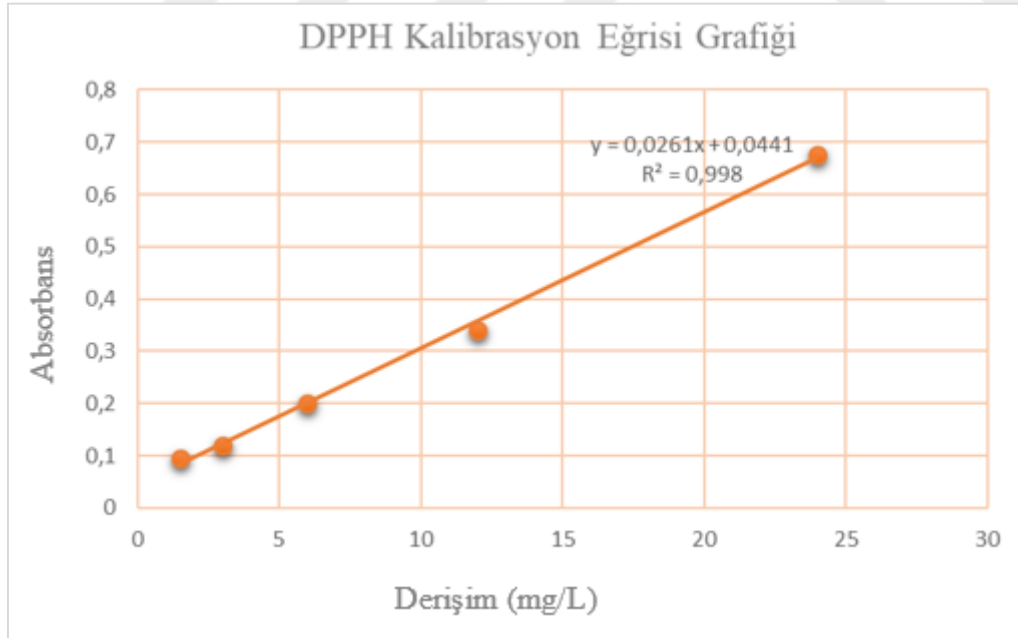
### 7.8. Pelemir Tohumunun Süperkritik CO<sub>2</sub> ile Ekstraksiyon Sürecinde Elde Edilen Ekstraktların Toplam Antioksidan Madde Tayini Sonuçları

Karmaşık matrislerde antioksidanları ayırabilmek için 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikal süpürme testi geliştirilmiştir (McDermott ve diğerleri, 2010). Seyreltme yoluyla hazırlanan farklı derişimlerdeki stok çözeltiler Resim 7.1' de verilmiştir.



Resim 7.1. DPPH kalibrasyonu için hazırlanan çözeltiler

Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu çalışmalarında antioksidan tayini yapmak için Şekil 7.12' de DPPH kalibrasyon eğrisi verilmiştir.



Şekil 7.12. DPPH kalibrasyon eğrisi grafiği

Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ve soxhlet yöntemi deneyleri sonucu elde edilen ekstraktların toplam antioksidan madde tayini sonuçları Çizelge 7.10' da verilmiştir. Çizelge incelendiğinde SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçların 4 no' lu deney



dışında soxhlet ekstraksiyonuna göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir. IC50 (biyokimyasal yarı en büyük inhibitör konsantrasyonu), belirli bir maddenin (inhibitör) bir biyolojik bileşeni %50 oranında inhibisyon için inhibitörün ne kadarının gerekli olduğunu gösteren kantitatif bir ölçümdür. Bu değer DPPH radikal süpürme testi ile belirlenmiştir. IC50' nin daha düşük değerleri daha iyi antioksidan aktivitenin olduğunu göstermektedir. Guayusa yaprakları ile yapılan çalışmada soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen antioksidan aktivitenin etanol kosolventli ve kosolventsiz SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilene göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Cadena-Carrera ve diğerleri, 2019). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar tez çalışması ile benzerlik göstermektedir. Sentetik antioksidanlardan olan Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve Bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT) daha büyük verimliliğe sahip olup, güvenlik açısından ise tartışmaya açıktır (Pujimulyani, Wazyka, Anggrahini ve Santoso, 2004).

Çizelge 7.10. Süperkritik özütleme ve soxhlet deneyleri sonucu elde edilen özütlerin toplam antioksidan madde tayini sonuçları

Numune No (std)	y = Abs	x = Derişim (µg/ mL)	IC50 (µg/ mL)	% inhibisyon değerleri
1	0,663	23,71264	90,2	2,06795
2	0,643	22,94636	87,5	5,02216
3	0,633	22,56322	86,1	6,49926
4	0,583	20,64751	79,3	13,8848
5	0,668	23,90425	90,9	1,32939
6	0,669	23,94253	90,9	1,18168
7	0,641	22,86973	87,2	5,31758
8	0,644	22,98467	87,6	4,87445
9	0,648	23,13793	88,1	4,28360
10	0,657	23,48276	89,4	2,95421
11	0,618	21,98856	84,1	8,71492
12	0,665	23,78927	90,4	1,77253
13	0,646	23,06130	87,9	4,57903
14	0,656	23,44444	89,2	3,10192
15	0,659	23,55939	89,6	2,65879
16	0,638	22,75479	86,8	5,76071
17	0,675	24,17241	91,8	0,29542
18	0,659	23,55939	89,6	2,65879
19	0,641	22,86973	87,2	5,31758
20	0,656	23,44444	89,2	3,10192
Soxhlet	0,595	21,10728	80,9	12,1122
BHA	0,234	23,3838	23,4	74,36458
BHT	0,547	8,61547	63,7	30,45862

Eş. 7.11, Eş. 7.12 ve Eş. 7.13' de verilen denklemlerdenden Çizelge 7.10 oluşturulurken yararlanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Ar - Anum) / Ar] * 100 \quad (7.11)$$

$$\% \text{ inhibisyon BHA} = [(Ar - ABHA) / Ar] * 100 \quad (7.12)$$

$$\% \text{ inhibisyon BHT} = [(Ar - ABHT) / AR] * 100 \quad (7.13)$$

Ar = Referans ( 24 mg/L DPPH çözeltisi) absorbans değeri

Anum = Numune absorbans değeri

ABHA = Bütillenmiş hidroksi anisol absorbans değeri

ABHT = Bütillenmiş hidroksi toluen absorbans değeri

### 7.9. Pelemir Tohumundan Ekstrakte Edilen Diğer Bileşenlere Ait Sonuçlar

Pelemir tohumundan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile ekstrakt elde edilmesi çalışmasında deneysel tasarım için yararlanılan program, ekstraksiyon sürecindeki çalışılan parametreler, analiz edilen bileşikler, toplam fenolik ve toplam antioksidan tayinlerinde yararlanılan analiz metodları Çizelge 7.11' de sunulmuştur.

Çizelge 7.11. Tez çalışmasında pelemir tohumu kullanılarak yapılan çalışma koşulları, analiz metotları ve analiz edilen flavonoidler

Kullanılan deneysel tasarım programı	Ekstraksiyon Metodu	Değişken Parametreler	Sabit Parametreler	Analiz Metodları	Analiz Edilen Flavonoid
Design Expert Trial 11.1.2.0  (Yüzey Cevap Metodu (YCM))  (Merkezi kompozit tasarımı)	SK-CO <sub>2</sub> Soxhlet	Sıcaklık (26,4-93,6 °C)  Basınç (72,0-357,9 bar)  Etanol kosolventi (%0,6-12,4)	Partikül boyutu (0,710-0,355 mm)  Zaman(120 min)  CO <sub>2</sub> akış hızı (3 L/min)	HPLC  UV-VIS Spektrofotometre	Rutin Silibinin Apigenin Taksifolin Kaempferol Kuersetin

Pelemir tohumunda araştırılan kuersetin, kaempferol, apigenin ve taksifolin flavonoidleri Design Expert Trial 11.1.2.0 programında incelendiğinde modele uygun olmayıp, quadratik grafikler oluşmadığından dolayı, bu flavonoidler ile ilgili sonuçlara tez çalışmasında yer verilmemiştir. Bu bileşikler için çalışma parametreleri tekrar düzenlenip farklı bir deneysel tasarım yapılabilir. Optimum parametreleri belirlemek için çok amaçlı optimizasyon (multi-objective optimization) yapılabilir.



## 8. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER

Yapılan literatür araştırması sonucu kosolvent (etanol) kullanılarak pelemir tohumunun (*Cephalaria syriaca L.*) SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Deneysel tasarım için Design Expert 11.1.2.0 Trial programı ile YCM kullanılmıştır. Kuersetin, rutin, kaempferol, apigenin, silibinin ve taksifolin flavonoidlerinin programın öngördüğü modelle uyumlu olup olmadığı incelenmiştir. Deneysel tasarım çalışması sonucunda rutin ve silibinin miktarı için anlamlı quadratik modeller elde edilmiştir. Ancak, kuersetin, kaempferol, apigenin ve taksifolin miktarlarına ait sonuçların programın öngördüğü modelle uyumlu olmadığı gözlenmiştir. Çalışma parametreleri olan sıcaklık-basınç, basınç-etanol ve sıcaklık-etanol ikili etkileşimlerinin flavonoid miktarına etkileri incelenmiştir. Deneysel çalışma sonucunda en yüksek rutin ve silibinin miktarı sırasıyla 98,28 µg rutin/g tohum ve 2,59 µg silibinin/g tohum olarak elde edilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucu programın önerdiği değerler 90,11 µg rutin/g tohum ve 2,59 µg silibinin/g tohum olup deneysel sonuçlar ile oldukça yakındır. SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu çalışmalarında elde edilen ekstrakt miktarı basınç artmasıyla artmaktadır. Basıncın yükselmesi karbon dioksit yoğunluğunu artırdığından dolayı, karbon dioksitin sıvı faz etkisi ve çözünürlüğü artmaktadır. Böylece elde edilen ekstrakt miktarı artmaktadır. Sıcaklık arttıkça elde edilen ekstrakt miktarı azalmaktadır. Çünkü karbon dioksit yoğunluğu azaldıkça karbon dioksitin gaz faz özelliği artmakta dolayısıyla çözme gücü azalmakta ve ekstrakt miktarı da azalmaktadır. Etanol kosolventi miktarının artması elde edilen ekstrakt miktarını artırmaktadır. Karbon dioksit polar olmayan bir akışkan olduğundan dolayı, karbon dioksit polar kosolvent olan etanol ilave edilmesiyle ekstrakt miktarı artmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon süresini kısaltması da diğer bir olumlu etkisidir.

Pelemir tohumlarından etanol kosolvent ilaveli SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ve soxhlet ekstraksiyonu yöntemleriyle elde edilen ekstraktlardaki toplam fenolik madde ve toplam antioksidan madde tayinleri yapılmıştır. Toplam fenolik madde tayini için Folin-Coicicaultu metodu, toplam antioksidan tayini için DPPH metodu kullanılmıştır. Tayinler sonucunda her bir numune için elde edilen çözeltilerin absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometre cihazı kullanılarak okunmuştur. Her iki ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde değerleri kıyaslandığında, soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen

ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Toplam antioksidan aktiviteleri kıyaslandığında ise DPPH radikal süpürme testi ile belirlenen IC50 olarak ifade edilen değerlerin birbirlerine yakın olduğu tespit edilmiştir. Soxhlet ekstraksiyonu sırasında daha yüksek sıcaklıkta çalışıldığı için antioksidan aktivitenin azaldığı düşünülmektedir. Soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle toplam fenolik madde miktarı daha fazla elde edilmesine rağmen, antioksidan aktivite SK-CO<sub>2</sub> ile elde edilen değere yakındır. Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak %100 etanol kullanılmasından dolayı daha fazla flavonoid ekstrakte edilebilmekte ancak bunun yanında istenmeyen diğer bileşenler ve safsızlıklar da çözücü faza geçmektedir. Safsızlıkları uzaklaştırmak için ilave işlemler gerekmesi kimyasal kullanımını arttırdığından dolayı çevreci olmayan ve maliyeti arttıran bir durum oluşturmaktadır. SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu seçiciliği yüksek bir metod olduğu için, çalışma şartları değiştirilerek hedef bileşeni en yüksek oranda elde etmek mümkündür. Soxhlet ekstraksiyonunda uzun zamana ihtiyaç duyulması, çözücünün kaynama sıcaklığına çıkılması ve çok miktarda organik çözücü gerektirmesi gibi dezavantajları nedeniyle SK-CO<sub>2</sub> ısıya duyarlı bileşiklerin özütlenmesinde daha uygun ve çevreci bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen verimin düşük olmasına rağmen ürün kalitesi ve hedeflenen ürüne ulaşma açısından daha avantajlıdır.

Pelemir ülkemiz coğrafyasında yaygın ve buğday tarlalarında kendiliğinden yetişen bir bitkidir. Çevre dostu ve modern bir yöntem olan SK-CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile ilaç etken maddelerinin elde edilmesi, deneysel tasarım yöntemiyle optimizasyon çalışmasının yapılması, toplam fenolik madde miktarı ve toplam antioksidan aktivitenin belirlenmesi çalışmalarının literatüre katkı sağlayabilecek özgün bir çalışma olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ada, R., and Tamkoc, A. (2015). Some Agricultural Characteristics of the New *Cephalaria syriaca* Genotypes which Developed for Arid Areas. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 29(1), 25-30.
- Aherne, S. A., and O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- Aliev, A. M., and Movsumov, I. S. (1981). The chemical composition and pharmacological properties of Dipsacaceae species. *Rastitel'nye Resursy*, 17, 602-612.
- Aliev, A. M., Movsumov, I. S., and Bagirov, E. K. (1975). Alkaloids from certain *Cephalaria* species. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 5, 667.
- Altınığne, N., ve Saygın, E. (1983). Pelemir (*C. syriaca* schrad) tohumu protein fraksiyonları. *Gıda*, 8(4), 193-196.
- Altunbaş, O. (2015). *Pelemir Bitkisinin Pirolizisi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Ameer, K., Chun, B. S., and Kwon, J. H. (2017). Optimization of supercritical fluid extraction of steviol glycosides and total phenolic content from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves using response surface methodology and artificial neural network modeling. *Industrial Crops and Products*, 109, 672-685.
- Arslan , Y., Subaşı, İ., Kodaş, R., ve Katar, D. (2014). Farklı azot ve fosfor dozlarının kuru şartlarda yetiştirilen pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) bitkisinin verim ve verim özellikleri üzerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(2), 33-41.
- Arslan, Z. F., Altun , A. A., and Bilgili, A. (2017). The Past, Present and Future of Weed Problems in the Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Production in Turkey: Şanlıurfa Province Example. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(11), 1312-1322.
- Atanur, O. M. (2008). *Ganoderma lucidum* mantarlarından konvansiyonel ve süperkritik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların tanımlanması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bala, M., Madhu, B., Tyagi, S. K., and Gupta, R. K. (2016). Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of safflower seed oil using response surface methodology. *Asian Journal of Chemistry*, 28(7), 1579-1583.
- Benito-Román, O., Varona, S., Sanz, M. T., and Beltrán, S. (2019). Valorization of rice bran: Modified supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 80, 273-282.

- Bennett, G. F. (2007). Advanced Physicochemical Treatment Processes. In L. K. Wang, Y. T. Hung and N. K. Shamma, (Eds.), *Journal of Hazardous Materials*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 569-570.
- Bezerra, F. W. F., de Oliveira, M. S., Bezerra, P. N., Cunha, V. M. B., Silva, M. P., da Costa, W. A., Pinto, R. H. H., Cordeiro, R. M., da Cruz, J. N., Chaves Neto, A. M. J., and Carvalho Junior, R. N. (2020). Extraction of bioactive compounds. In Inamuddin, A. M. Asiri, and A. M. Isloor (Eds.), *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Supercritical Carbon Dioxide as Green Solvent*. Amsterdam: Susan Dennis, 149-167.
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Ganjloo, A., Taip, F. S., Salleh, L. M., and Sarker, M. 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, 912-920.
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat J., and Zaidul, I. M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing*, 89(1), 67-72.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- Blanchard, L. A., Xu, G., Stadtherr, M. A., and Brennecke, J. A. (2003). Phase Behavior and Its Effects on Reactions in Liquid and Supercritical Carbon Dioxide. In J. M. DeSimone and W. Tumas (Eds.), *Green Chemistry Using Liquid and Supercritical Carbon Dioxide*. Manhattan, New York: Oxford University Press, pp. 3-16.
- Böke Sarıkahya, N., Pekmez, M., Arda, N., Kayce, P., Yavaşoğlu, N.Ü. and Kırmızıgül S. (2011). Isolation and characterization of biologically active glycosides from endemic *Cephalaria* species in Anatolia . *Phytochemistry Letters*, 4(4), 415–420.
- Bunaciu, A. A., Danet, A. F., Fleschin, Ş., and Aboul-Enein, H. Y. (2016). Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(5), 389-399.
- Buszewski, B., Rafińska, K., Cvetanović, A., Walczak, J., Krakowska, A., Rudnicka, J., and Zeković, Z. (2019). Phytochemical analysis and biological activity of *Lupinus luteus* seeds extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Phytochemistry Letters*, 30, 338-348.
- Cabezas, R., Avila, M. F., Torrente, D., Gonzalez, J., El-Bachá, R. S., Guedes, R., and Barreto, G. E. (2015). Natural Antioxidants in Dementia: An Overview. In C. R. Martin and V. R. Preedy (Eds.), *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. Waltham, MA: Academic Press, 827-836.
- Cadena-Carrera, S., Tramontin, D. P., Cruz, A. B., Cruz, R. B., Müller, J. M., and Hense, H. (2019). Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as cosolvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 152, 104543.

- Camel, V. (2013). Environmental Application: Supercritical Fluid Extraction. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering Abstracts*.
- Cellat, K. (2011). *Bazı endemik türlerin uçucu yağ bileşenlerinin ekstrakte edilmesi ve içeriklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Chai, Y. H., Yusup, S., Ruslan, M. H., and Chin, B. L. (2020). Supercritical fluid extraction and solubilization of *Carica papaya* linn. leaves in ternary system with CO<sub>2</sub>+ ethanol solvents. *Chemical Engineering Research and Design*, 156, 31-42.
- Chatterjee, D., and Bhattacharjee, P. (2013). Supercritical carbon dioxide extraction of eugenol from clove buds. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2587-2599.
- Chen, B., and Xu, M. (2019). Natural Antioxidants in Foods. In P. Varelis, L. Melton, and F. Shahidi (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry*. Cambridge, MA: Oliver Walter, 180-188.
- Çalışkan, Ö. A., Anil, H., and Stephenson, G. R. (1994). Cephalaria saponin A, a new bidesmosidic triterpene saponin from *Cephalaria transsylvanica*. *Journal of natural products*, 57(7), 1001-1003.
- Çelik, H. T., and 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.
- Daraee, A., Ghoreishi, S. M., and Hedayati, A. (2019). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of chlorogenic acid from sunflower (*Helianthus annuus*) seed kernels: modeling and optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 144, 19-27.
- Dinçer, S., Baran, N., Uzun, İ. N., and Deniz, S. (2007). A Second Option in Special Separation Operations: Supercritical Fluid Processes. *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 25 (2), 106-128.
- Ekinci, M. S., and Gürü, M. (2014). Extraction of oil and  $\beta$ -sitosterol from peach (*Prunus persica*) seeds using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 319-323.
- Farombi, E. O., Akinmoladun, A. C., and Owumi, S. E. (2019). Anti-cancer Foods: Flavonoids. In M. Melton, F. Shahidi, and P. Varelis (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry*. Cambridge, MA: Oliver Walter, 224-236.
- Frankel, E. N. (2014). *Lipid Oxidation* (Second edition). Cambridge, UK: Woodhead, 209-258.
- García-Martínez, N., Andreo-Martínez, P., Quesada-Medina, J., de los Ríos, A. P., Chica, A., Beneito-Ruiz, R., and Carratalá-Abril, J. (2017). Optimization of non-catalytic transesterification of tobacco (*Nicotiana tabacum*) seed oil using supercritical methanol to biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 131, 99-108.



- Gazaryan, I. G., and Ratan, R. R. (2017). Oxidative Stress and Movement Disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Psychology Abstracts*.
- Gemedé, H. F., and Ratta, N. (2014). Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(4), 284-289.
- Gioxari, A., Kogiannou, D. A. A., Kalogeropoulos, N., and Kaliora, A. C. (2016). Phenolic Compounds: Bioavailability and Health Effects. In B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Kidlington, Oxford: Academic Press, 339-345.
- Gođevac, D., Vajs, V., Menković, N., Tešević, V., Janačković, P. T., and Milosavljević, S. (2004). Flavonoids from flowers of *Cephalaria pastricenis* and their antiradical activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 69(11), 883-886.
- Gonçalves, S., and Romano, A. (2020). Application of supercritical CO<sub>2</sub> for enhanced oil recovery. In Inamuddin, A. M. Asiri, and A. M. Isloor (Eds.), *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Supercritical Carbon Dioxide as Green Solvent*. Amsterdam: Susan Dennis, 67-84.
- Gordon, M. H. (2003). Antioxidants: Natural Antioxidants. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Kidlington, Oxford: Academic Press, 261-265.
- Gupta, R., Mishra, A., and Pathak, A. K. (2014, December). *Supercritical Fluid technology a boon for pharmaceutical Particle Manufacturing*. Paper presented at the Science and Technology For Human Development, Indian.
- Hossain, M. S., Mohamed, S. H., Khalid, A. M. B., Balakrishnan, V., Sarker, M. Z. I., and Ab Kadir, M. O. (2020). Avenues in Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Fractionation of Lipids. *Reference Module in Food Science Abstracts*.
- Ibáñez, E., Mendiola, J. A., and Castro-Puyana, M. (2016). Supercritical Fluid Extraction. In B. Caballero, Finglas, P. M., and Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Kidlington, Oxford: Academic Press, 227-233.
- Joseph, A., and Mathew, S. (2019). Imidazolium-based room temperature ionic liquids for electrochemical reduction of carbon dioxide to carbon monoxide. In Inamuddin, A. M. Asiri, and S. Kanchi (Eds.), *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Ionic Liquids as Green Solvents*. Cambridge, MA: Susan Dennis, 343-363.
- Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.
- Karaoğlu, M. M. (2006). *Cephalaria syriaca* addition to wheat flour dough and effect on rheological properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 37-40.
- Karaoğlu, M. M. (2012). Effect of *Cephalaria syriaca* addition on rheological properties of composite flour. *International Agrophysics*, 26, 387-393.

- Katar, D., Arslan, Y., Subasi, I., and Kudas, R. (2012). The effect of different sowing dates on yield and yield components of *Cephalaria* (*Cephalaria syriaca*) under Ankara/Turkey ecological condition. *Biological Diversity and Conservation*, 5(3), 48-53.
- Kirmizigul, S., and Anil, H. (1994). Transsylvanoside A, an acidic triterpene glycoside from *Cephalaria transsylvanica*. *Phytochemistry*, 35(4), 1075-1076.
- Kirmizigul, S., and Rose, M. E. (1997). Hederagenin glycosides from the flowers of *Cephalaria transsylvanica*. *Planta medica*, 63(01), 51-54.
- Kirmizigul, S., Anil, H., Uçar, F., and Akdemir, K. (1996). Antimicrobial and antifungal activities of three new triterpenoid glycosides. *Phytotherapy Research*, 10(3), 274-276.
- Kumhom, T., Elkamel, A., Douglas, P. L., Douglas, S., Pongamphai, S., and Teppaitoon, W. (2011). Prediction of isoflavone extraction from soybean meal using supercritical carbon dioxide with cosolvents. *Chemical Engineering Journal*, 172, 1023-1032.
- Kusumawati, I., and Indrayanto, G. (2013). Natural Antioxidants in Cosmetics. In A. Ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Kidlington, Oxford: Elsevier, 485-505.
- Lang, Q., and Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies: a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.
- Li, D., Sun-Waterhouse, D., Wang, Y., Qiao, X., Chen, Y., and Li, F. (2019). Interactions of Some Common Flavonoid Antioxidants. In P. Varelis, L. Melton, and F. Shahidia (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry*. Amsterdam: Oliver Walter, 644-649.
- Li, J. Z., Zhang, J., and Wang, M. (2016). Extraction of flavonoids from the flowers of *abelmoschus manihot* (L.) medic by modified supercritical CO<sub>2</sub> extraction and determination of antioxidant and anti-adipogenic activity. *Molecules*, 21(7), 810.
- Liu, H., Jiao, Z., Liu, J., Zhang, C., Zheng, X., Lai, S., Chen, F., and Yang, H. (2013). Optimization of supercritical fluid extraction of phenolics from date seeds and characterization of its antioxidant activity. *Food Analytical Methods*, 6(3), 781-788.
- Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- Liza, M. S., Rahman, R. A., Mandana, B., Jinap, S., Rahmat, A., Zaidul, I. M., and Hamid, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). *Food and Bioproducts Processing*, 88, 319-326.
- Manivannan, G., and Sawan, S. P. (1998). The Supercritical State. In J. McHardy, and S. P. Sawan (Eds.), *Supercritical Fluid Cleaning Fundamentals Technology and Applications*. Westwood, New Jersey: Noyes Publications, 1-20.
- Manjare, S. D., and Dhingra, K. (2019). Supercritical fluids in separation and purification: A review. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(3), 463-484.

- Marrelli, M., Conforti, F., Araniti, F., and Statti, G. A. (2016). Effects of saponins on lipid metabolism: A review of potential health benefits in the treatment of obesity. *Molecules*, 21(10), 1404.
- McHugh, M. A., and Krukonis, V.J. (1994). *Supercritical fluid extraction principles and practice* (2nd Ed.). Boston McGraw Hill's, Butterwort-Heinemann, 5-18.
- Medina, K. T., Diaz, M. P., Espitia, N., and Davila, J. A. (2019). Transport Phenomena Associated to Supercritical Extraction. *Reference Module in Food Science Abstracts*.
- Mendiola, J. A., Herrero, M., Castro-Puyana, M., and Ibáñez, E. (2013). Supercritical Fluid Extraction. In M. A. Rostagno, and J. M. Prado (Eds.), *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Dorchester: The Royal Society of Chemistry, 196-231.
- Movsumov, I. S., Garaev, E. A., and Isaev, M. I. (2006). Flavonoids from *Cephalaria gigantea* flowers. *Chemistry of natural compounds*, 42(6), 677-680.
- Movsumov, I. S., Garaev, E. A., and Isaev, M. I. (2009). Flavonoids from *Cephalaria grossheimii*. *Chemistry of natural compounds*, 45(3), 422-423.
- Musselman, L. J. (2000). Zawan and Tares in the Bible. *Economic Botany*, 54(4), 537-542.
- Mustafaeva, K., Elias, R., Balansard, G., Suleimanov, T., Mayu-Lede, V., and Kerimov, Y. (2008). Iridoid glycosides from *Cephalaria kotschyi* roots. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(1), 132-133.
- Nagy, B., and Simándi, B. (2008). Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46(3), 293-298.
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., and Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687-704.
- Özyurt, D. (2005). *Toplam flavonoid miktarının geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile tayini*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pasi, S., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., and Chinou, I. B. (2002). A new lignan glycoside and other constituents from *Cephalaria ambrosioides*. *Natural Product Letters*, 16(6), 365-370.
- Pavić, V., Jakovljević, M., Molnar, M., and Jokić, S. (2019). Extraction of carnosic acid and carnosol from sage (*Salvia officinalis* L.) leaves by supercritical fluid extraction and their antioxidant and antibacterial activity. *Plants*, 8, 1-16.
- Peng, W. L., Mohd-Nasir, H., Setapar, S. M., Ahmad, A., and Lokhat, D. (2020). Optimization of process variables using response surface methodology for tocopherol extraction from Roselle seed oil by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 143, 111886.

- Pujimulyani, D., Wazyka, A., Anggrahini, S., and Santoso, U. (2004). Antioxidative Properties of White Saffron Extract (*Curcuma mangga* Val) in The B-Carotene Bleaching and DPPH-Radical Scavenging Methods. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 11(2), 35-40.
- Rahal, N. B., Barba, F. J., Barth, D., and Chevalot, I. (2015). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil, fatty acids and flavonolignans from milk thistle seeds: Evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 275-282.
- Ramsey, E. D., Guo, W., Liu, J. Y., and Xu, X. H. (2011). Supercritical Fluids. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*. Second Edition. Amsterdam: Pergamon, 1007-1026.
- Rikards, R., and Auzins, J. (2003). Response surface method for optimum design of composite stiffened shells. In K. J. Bathe (Ed.), *Computational Fluid and Solid Mechanics 2003*. Kidlington, Oxford: Elsevier, 2355-2358.
- Rohn, S. (2019). Covalent Interactions Between Proteins and Phenolic Compounds. In M. Melton, Shahidi, F., and Varelis, P. (Ed.), *Encyclopedia of Food Chemistry*. Cambridge, MA: Oliver Walter, 544-549.
- Sánchez-Camargo, A. P., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., and Herrero, M. (2014). Supercritical Fluid Extraction. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering Abstracts*.
- Sarabia, L. A., and Ortiz, M. C. (2009). Response Surface Methodology. In S. D. Brown, Tauler, R., and Walczak, B. (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*. First edition. Slovenia: Elsevier, 345-390.
- Sarikahya, N. B., Goren, A. C., and Kirmizigül, S. (2019). Simultaneous determination of several flavonoids and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 173, 120-125.
- Sarikahya, N. B., Pekmez, M., Arda, N., Kayce, P., Yavaşoğlu, N. Ü., and Kırmızıgül, S. (2011). Isolation and characterization of biologically active glycosides from endemic *Cephalaria* species in Anatolia. *Phytochemistry Letters*, 4(4), 415-420.
- Sarikahya, N. B., Ucar, E. O., Kayce, P., Gokturk, R. S., Sumbul, H., Arda, N., and Kirmizigül, S. (2015). Fatty acid composition and antioxidant potential of ten *Cephalaria* species. *Records of Natural Products*, 9(1), 116-123.
- Sezgin, M., Tezcan, H., Şahin, M., Arslan, Y., Subaşı, İ., Demir, İ., ve Koç, H. (2017). Bazı Pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) Çeşitlerinin Türkiye'nin Farklı Ekolojik Koşullarında Verim ve Kalite Değerlerinin Belirlenmesi. *Tarım ve Doğa Dergisi*, 20, 192-195.
- Shankar, K., and Mehendale, H. M. (2014). Oxidative Stress. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. Cambridge, MA: Academic Press, 735-737.

- Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G., and Jiang, Y. (2004). Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *Journal of Medicinal Food*, 67-78.
- Shi, J., Yi, C., Xue, S. J., Jiang, Y., Ma, Y., and Li, D. (2009). Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 431-436.
- Sodeifian, G., Ardestani, N. S., Sajadian, S. A., and Moghadamian, K. (2018). Properties of *Portulaca oleracea* seed oil via supercritical fluid extraction: Experimental and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 135, 34-44.
- Suryawanshi, B., and Mohanty, B. (2018). Modeling and optimization: Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Pongamia pinnata* (L.) seed oil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 2660-2673.
- Tabatadze, N., Elias, R., Faure, R., Gerkens, P., De Pauw-Gillet, M. C., Kemertelidze, E., Chea, A., and Ollivier, E. (2007). Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Cephalaria gigantea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(1), 102-105.
- Temelli, F., Saldaña, M. D. A., and Comin, L. (2012). Application of Supercritical Fluid Extraction in Food Processing. In J. Pawliszyn (Ed.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*. Cambridge, MA: Academic Press, 415-440.
- Tirado, D. F., and Calvo, L. (2019). The Hansen theory to choose the best cosolvent for supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\beta$ -carotene from *Dunaliella salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 145, 211-218.
- Tirado, D. F., Tenorio, M. J., Cabañas, A., and Calvo, L. (2018). Prediction of the best cosolvents to solubilise fatty acids in supercritical CO<sub>2</sub> using the Hansen solubility theory. *Chemical Engineering Science*, 190, 14-20.
- Tisserand, R., and Young, R. (2014). *Essential Oil Safety* (second edition). China: Churchill Livingstone, 5-23.
- Türk, M. (2014). *Particle Formation with Supercritical Fluids: Challenges and Limitations*. (First Edition). Amsterdam: Elsevier, 13-45.
- Wang, W., Han, S., Zha, X., Cheng, J., Song, J., and Jiao, Z. (2019). Response surface optimization of supercritical carbon dioxide extraction of tea polyphenols from green tea scraps. *Journal of AOAC International*, 102(2), 451-456.
- Yang, X. L., Zheng, H. Y., Hu, S. P., Luo, Z. M., and Zhang, X. Y. (2008). Study on Extraction Technology and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction Residue of *Humulus Lupulus*. *Food Science*, 11.
- Yasuji, T., Takeuchi, H., and Kawashima, Y. (2008). Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(3), 388-398.

Yazicioglu, T., Karaali, A., and Gökçen, J. (1978). *Cephalaria syriaca* seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(4), 412-415.

Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S. M., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., and Mirsadeghi, S. (2019). Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 182-193.

Zeković, Z., Pavlič, B., Cvetanović, A., and Đurović, S. (2016). Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Process optimization, chemical profile and antioxidant activity of lipid extracts. *Industrial Crops and Products*, 94, 353-362.



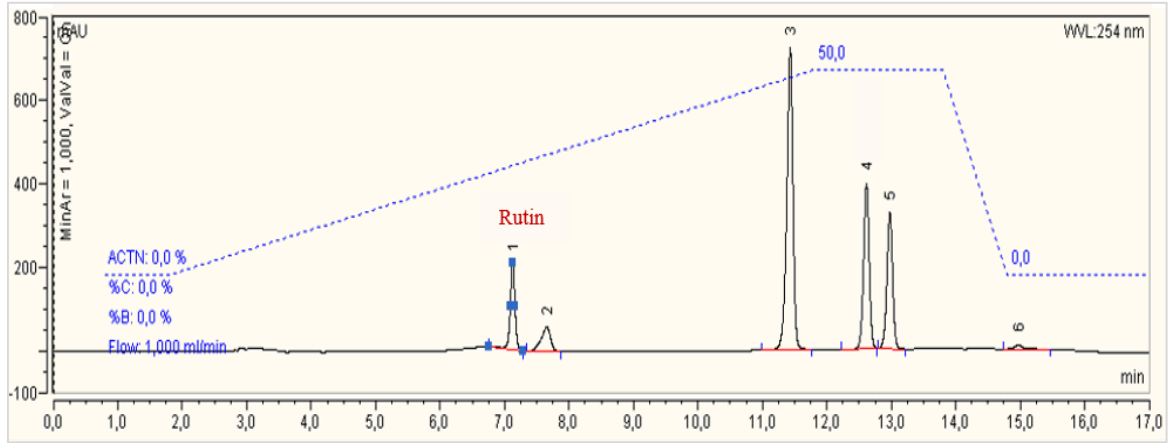




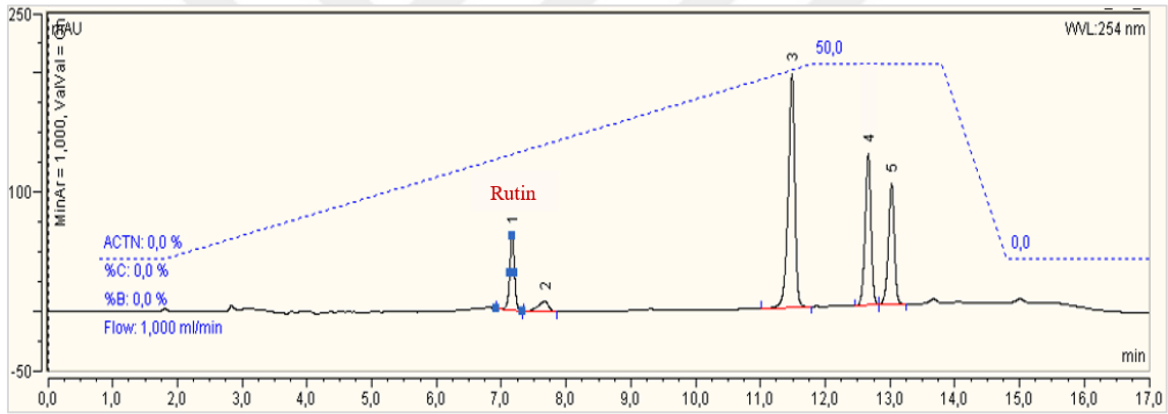
**EKLER**



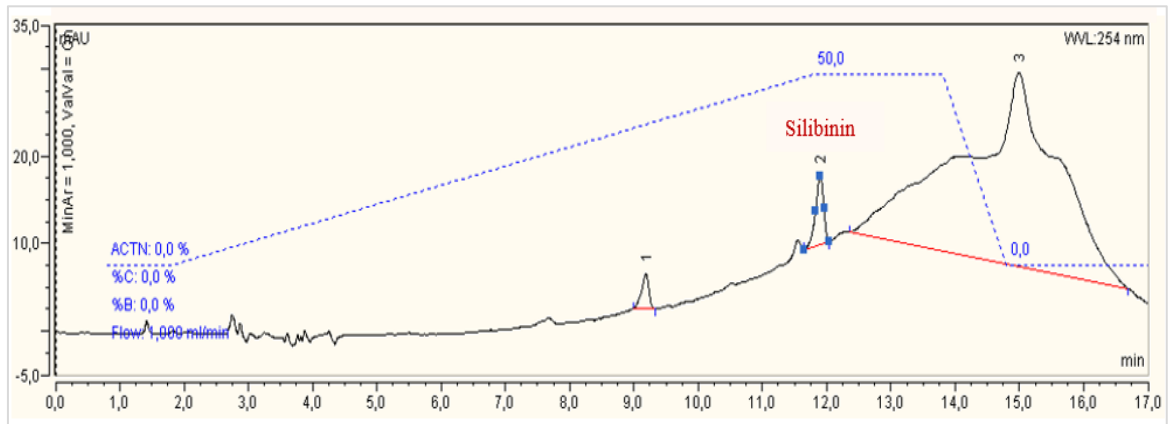
## EK-1. Standartlara ait kromatogramlar



Şekil E1.1. Rutin, kuersetin, apigenin ve kaempferol bileşiklerine ait 50 ppm' lik karışım standartına ait HPLC analizi



Şekil E1.2. Rutin, kuersetin, apigenin ve kaempferol bileşiklerine ait 20 ppm' lik karışım standartına ait HPLC analizi

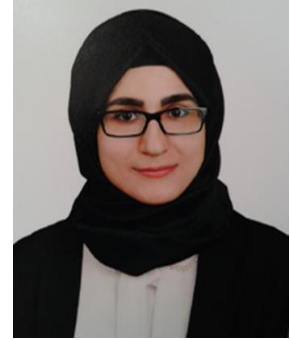


Şekil E1.3. Silibinin ve taksifolin bileşiklerine ait 10 ppm' lik karışım standartına ait HPLC analizi

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : CANER, Sümeyye  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 11.03.1992, Konya  
 Medeni hali : Bekar  
 Telefon : (0538) 716 52 74  
 e-mail : sumeyye.caner06@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	2016
Lise	Enis Şanlıoğlu Anadolu Lisesi	2010

### İş Deneyimi

İş Deneyimi, Yıl	Yer	Görev
-	-	-

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

1. Caner, S., Gürü, M., İçen, H., Nuralın, L. (2019). *Deneyisel Tasarım Yöntemi ile Süperkritik Şartlarda Pelemin Tohumundan Silibinin Özütlemesi*. ISMS 6. Uluslararası Fen, Mühendislik ve Mimarlık Bilimlerinde Akademik Çalışmalar Sempozyumu, Ankara.

### Hobiler

İllüstrasyon, Takı tasarımı, Gezi



*GAZİ GELECEKTİR..*