



**SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYONU İLE DEVE
DİKENİNDEN İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN ÖZÜTLENMESİ**

Hatice Tuğba ÇELİK

**DOKTORA TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2014

Hatice Tuğba ÇELİK tarafından hazırlanan “SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYONU İLE DEVE DİKENİNDEN İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN ÖZÜTLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Metin GÜRÜ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Hasan Serdar ÖZTÜRK

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. İrfan AR

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Ayşe TOSUN

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
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.

Hatice Tuğba ÇELİK

24.06.2014

SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYONU İLE DEVE DİKENİNDEN İLAÇ
ETKEN MADDELERİNİN ÖZÜTLENMESİ
(Doktora Tezi)

Hatice Tuğba ÇELİK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2014

ÖZET

Silybum marianum (Deve dikenini) 2000 yıldır tedavi amaçlı olarak kullanılan bir bitkidir. *Silybum marianum* tohumu silymarin bileşiklerince, özellikle silibince, zengindir. Kanseri, akciğeri, karaciğeri, beyini, siroz ve alkol, uyuşturucu zehirlenmesinde tedavi edici olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı deve dikeninden süperkritik CO₂ ile maksimum verimde silibin A ve silibin B bileşiklerinin elde edilmesidir. Bu kapsamda sıcaklık (40-80 °C), özütlenme süresi (0-120 min), basınç (160-220 bar), CO₂ akış hızı (3-5 mL/min) ve tanecik büyüklüğü (0,3025-0,925mm) parametrelerinin özütlenme sürecine ve silibin A ile silibin B bileşiklerinin verimine etkisi incelendi. Tohum içerisinde yer alan esansiyel yağların; silibin A ve silibin B bileşiklerinin verimi üzerine etkisi araştırıldı. Yüzey Cevap Yöntemi kapsamında Design Expert 6.08 Trial programı ile sıcaklık, basınç, akış hızı parametrelerinin özütlenme verimine etkisini incelendi. Süperkritik CO₂ ile deve dikenini tohumunun özütlenmesine etki eden en önemli parametrenin sıcaklık ve basınç terimlerinin olduğu görüldü. Optimum koşullarda modelin ve deneysel verilerin sonuçlarının birbirleriyle uyumlu olduğu belirlendi.

Süperkritik CO₂ özütlenme ile elde edilen numune içerisinde yer alan ve ilaç etken maddesi olan silibin A ve silibin B bileşikleri, UV-Vis spektrometrisi, HPLC yöntemi ile kalitatif ve kantitatif olarak analizleri gerçekleştirildi. Deneysel çalışmaların sonucunda maksimum verimin elde edildiği en uygun koşullar 40 °C sıcaklık, 180 bar basınç, 4 mL/min CO₂ akış hızı, 0,3025 mm tanecik büyüklüğü olarak bulundu. Bu koşullarda elde edilen maksimum özüt, silibin A ve silibin B verimleri sırasıyla 327; 2,29 ve 1,92 mg/g tohum olarak belirlendi. Zamanla alınan deve dikenini tohumu özütü verilerinden düşük sıcaklık ve tanecik boyutunda, yüksek basınç ve akış hızında özüt veriminin başlangıç hızının belirgin şekilde arttığı görüldü. Deve dikenini tohumu özütü içerisindeki yağın GC-FID ile analiz yapıldı ve deve dikenini tohumunun özütünde linoleik asit (%54) ve oleik asidin (%22) baskın olarak geldiği saptandı.

Bilim Kodu : 912.1.023

Anahtar Kelimeler : Deve dikenini Tohumu, Süperkritik Özütlenme, Yüzey Cevap Metodu

Sayfa Adedi : 155

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

EXTRACTION OF PHARMACEUTICAL ACTIVE COMPONENT
FROM *Silybum marianum* BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION
(Ph.D. Thesis)

Hatice Tuğba ÇELİK

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
June 2014

ABSTRACT

Silybum marianum (milk thistle) is a plant that has been used medicinally for over 2000 years. *Silybum marianum* seeds are rich silymarin compounds, especially silybin. It has been used for the treatment of cancer, liver, kidney, cardiac, brain and cirrhosis and poisoning of alcohol, drugs or toxins.

The purpose of this study was to obtain the maximal yield of silibin A and silibin B compounds from *Silybum marianum* seeds using supercritical carbon dioxide extraction. The effect of parameters such as extraction time (0-120 min), temperature (40-80 °C), pressure (160-220 bar), CO₂ flow rate (3-5 mL/min), particle size (0.3025-0.925 mm) were investigated on the yield of silybin A and silybin B compounds and extraction process. The effect of essential oil in milk thistle seeds on the yield of silibin A and silibin B compounds was determined. The extraction yield was examined as the effect of temperature, pressure and CO₂ flow rate parameters by Design Expert 6.08 Trial programs with response surface method. It was observed that the most important parameters are the term of temperature and pressure which were effective for the milk thistle seeds extraction by supercritical CO₂. The results of model and experimental data were found to be compatible with each other at optimal conditions.

The silymarin compounds within milk thistle extracts were determined by UV-Vis Spectrophotometer and HPLC. The optimal experimental conditions were found to be temperature of 40 °C, pressure of 180 bar, CO₂ flow rate of 4 mL/min, 0.3025 the particle size for the maximum silibin yield. The maximum yields of extract, silibin A and silibin B compounds were obtained respectively 327, 2.29 ve 1.92 mg/ g seeds at these conditions. The initial ratio of the extract yield was significantly observed to rise at low temperature and particle size, high pressure and flow rate from milk thistle extract data. The milk thistle seed extract was performed with the GC-FID. As a result of this analysis linoleic acid (54%) and oleic acid (22%) were detected predominantly.

Science Code : 912.1.023

Key Words : Milk thistle seed, Supercritical Extraction, Response Surface Methods

Page Number : 155

Adviser : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

TEŞEKKÜR

Akademik yaşantım boyunca tüm çalışmalarımı destekleyen ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Metin GÜRÜ'e, çalışmalarında önerileriyle bana yol gösteren ve her konuda yardımlarını gördüğüm hocalarım Prof. Dr. İrfan AR ve Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman fikir ve önerilerini benimle paylaşan ve çalışmalarımda yardımcı olan Ebru TUNA'ya, eşim Mehmet Emin ÇELİK'e ve aileme tüm içtenliğimle teşekkürü borç biliyorum.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri “Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu İle Deve Dikeninden Silybine Özütlenmesi” başlıklı 06/2013-04 kodlu proje ve “BİDEB2211 - Yurt İçi Doktora Burs Programı” kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. <i>Silybum Marianum</i>.....	5
2.1. Botanik Özellikleri.....	5
2.2. <i>Silybum marianum</i> Bitkisinin Yapısında Bulundurduğu Kimyasallar.....	7
2.3. <i>Silybum marianum</i> Bitkisinin Farmakolojik Etkileri.....	12
2.4. Ekonomik Önemi.....	13
3. SÜPERKRİTİK AKIŞKANLA ÖZÜTLEME.....	17
3.1. Süperkritik Akışkan.....	17
3.2. Süperkritik Akışkanın Seçimi.....	18
3.3. Süperkritik Akışkan Özütleme Sistemi.....	19
3.4. İşletme Parametrelerinin Seçilmesi.....	20
3.5. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Avantajları.....	22
3.6. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Dezavantajları.....	23
4. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	25
4.1. Geleneksel yöntemlerle Silymarin Bileşiklerinin Özütlenmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	25
4.2. Süperkritik Şartlarında Özütleme Uygulamaları.....	28

	Sayfa
4.3. <i>Silybum marianum</i> Bitkisinin Yapısında Bulunan Kimyasalların Analizi.....	37
4.3.1. İnce tabaka kromatografi analizi.....	38
4.3.2. UV-Vis spektrometri analizi.....	38
4.3.3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi analizi.....	39
4.3.4. Kapiler elektroferez analizi.....	41
4.3.5. Ultra performanslı sıvı kromatografi analizi.....	41
5. MATERYAL VE METOD.....	43
5.1. Materyal	43
5.2. Deve Dikeni Tohumuna Süperkritik CO ₂ Özütlemesi Öncesinde Uygulanan İşlemler.....	43
5.2.1. Deve dikeni bitkisinin toplanması.....	43
5.2.2. Parçacık boyutunun belirlenmesi.....	45
5.2.3. Deve dikeni tohumundan ön özütleme ile yağ uzaklaştırılması.....	45
5.3. Süperkritik CO ₂ Özütlenmesi.....	46
5.3.1. Deney sistemi.....	47
5.3.2. Deney yöntemi.....	48
5.4. Silibin Bileşiklerinin Analiz Yöntemi.....	50
5.4.1. UV-Vis spektrometrik yöntem.....	51
5.4.2. HPLC yöntemi.....	51
5.5. Özüt İçerisinde Bulunan Yağların Bileşenlerinin ve Miktarlarının Belirlenmesi.	56
5.5.1. Özüt içerisindeki yağ bileşenlerinin türevlendirme işlemi.....	57
5.5.2. Yağ bileşenlerinin gaz kromatografisi ile aydınlatılması.....	57
6. DEVE DİKENİ TOHUMUNDAN ÖN EKSTRAKSİYON İLE YAĞ UZAKLAŞTIRILMASI VE SONUÇLARIN SÜPERKRİTİK CO₂ ÖZÜTLEMESİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	59
6.1. Hegzan ile özütlemenin deve dikeni tohumunun gözenek yapısı üzerine etkisi	60

	Sayfa
6.1.1.Klasik özütleme öncesi tohumlar.....	60
6.1.2. Klasik özütleme sonrası tohumlar.....	61
6.2. Ön İşlem Sonrasında Tohumların Süperkritik CO ₂ Özütlemesi.....	63
6.3.Süperkritik Özütleme Sonrası Tohumların Gözenek Yapısı.....	64
7. SÜPERKRİTİK CO₂ ÖZÜTLEME İLE DEVE DİKENİNİN ÖZÜTLEMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMA PARAMETRELERİN ETKİSİ.....	67
7.1. Sürenin Özütleme Verimine Etkisi.....	67
7.2. Sıcaklığın Özütleme Verimine Etkisi.....	68
7.3.Basıncın Özütleme Verimine Etkisi.....	70
7.4. Akış Hızının Özütleme Verimine Etkisi.....	72
7.5.Tanecik Büyüklüğünün Özütleme Verimine Etkisi.....	74
8. MATEMATİKSEL MODELLEME.....	77
8.1 Yüzey Cevap Yöntemi.....	77
8.2. Parametrelerin Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecine Etkisi.....	82
8.2.1. Özütleme sürecine sıcaklık-basınç parametresinin etkisi.....	82
8.2.2.Özütleme sürecine sıcaklık-akış hızı parametresinin etkisi.....	83
8.2.3. Özütleme sürecine basınç-akış hızı parametresinin etkisi.....	85
8.3. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecinde Yüzey Cevap Analizi Optimizasyon Sonuçları.....	86
9.UV-VIS SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE SİLYMARİN BİLEŞİKLERİNİN TAYİNİ.....	89
10.SÜPERKRİTİK CO₂ ÖZÜTLEME DENEYLERİNİN HPLC ANALİZ SONUÇLARI.....	91

	Sayfa
11. SÜPERKRİTİK CO₂ ÖZÜTLEMESİ İLE DEVE DİKENİNDEN SİLİBİN ELDE EDİLMESİNE ÇALIŞMA PARAMETRELERİNİN ETKİLERİ.....	95
11.1. Özütleme Süresinin Silibin Bileşiklerine Verimine Etkisi.....	95
11.2. Sıcaklığın Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi.....	97
11.3. Basıncın Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi.....	98
11.4. Akış Hızının Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi.....	100
11.5. Tanecik Büyüklüğünün Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi.....	102
11.6. Genel Optimizasyon Sonuçları.....	104
12. ÖZÜT İÇERİSİNDEKİ YAĞLARIN TAYİNİ.....	109
13. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER.....	113
KAYNAKLAR.....	117
EKLER.....	127
EK-1. Silymarin İçerikli Üretilen İlaçların İsimleri ve İmalatını Sağlayan Firmalar.....	128
EK-2. Silymarin Bileşiklerine Ait Kromotogramlar.....	132
EK-3. Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması.....	134
EK-4. Standart Çözeltilerinin Hesaplamaları.....	145
EK-5. Kalibrasyon Grafiği.....	147
EK-6. Hesaplamalar.....	152
ÖZGEÇMİŞ.....	154

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Silybum marianum</i> bitkisinin sistematikteki yeri.....	5
Çizelge 2.2. Silymarin içerikli üretilen ilaçların isimleri ve imalatını sağlayan firmalar.....	14
Çizelge 3.1. Bir akışkanın sıvı, gaz ve süperkritik bölgedeki fizikokimyasal özellikleri.....	18
Çizelge 3.2. Süperkritik akışkanların fiziksel özellikleri.....	19
Çizelge 4.1. Süperkritik Akışkan Özütlemesi İçin Deneysel Tasarım Uygulamaları (T: sıcaklık; P: Basınç, t: Özütleme Süresi, v/v: İkinci Çözücü hacim oranı	34
Çizelge 4.2. HPLC analizi ile ilgili çalışma koşulları.....	40
Çizelge 4.3. Silymarin içeren flavolignan bileşiklerinin kantitatif analizi için önerilen yöntemlerin avantajları ve dezavantajları.....	42
Çizelge 5.1. HLPC programı.....	52
Çizelge 5.2. GC-FID analizinin gerçekleştirildiği sıcaklık programı.....	58
Çizelge 6.1. Klasik özütleme öncesi ve sonrasında deve diken tohumuna ait yüzey alanı ve gözenek çap verileri.....	63
Çizelge 6.2. Süperkritik özütleme öncesi ve sonrasında deve diken tohumuna ait yüzey alanı ve gözenek çap verileri.	65
Çizelge 8.1. Yüzey Cevap Yöntemi için seçilen parametreler.....	77
Çizelge 8.2. Sıcaklık, basınç ve akış hızı olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı...78	78
Çizelge 8.3. Deneysel algoritma ve özütleme çıktıları.....	79
Çizelge 8.4. Deve diken tohumunun süperkritik CO ₂ ile özütlemesi deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri.....	80
Çizelge 8.5. Modele ait katsayılar, F testi ve standart sapma değerleri.....	81
Çizelge 8.6. Optimum deney koşulları.....	87
Çizelge 11.1. Deve diken tohumundan elde edilen özüt ve silibin miktarları için uygun parametre değerleri ve bu değerlerdeki özüt ve silibin bileşiklerinin miktarları.....	105

Çizelge**Sayfa**

Çizelge 12.1. Deve dikeneni tohumu yağının yağ asidi bileşimi.....	111
--	-----

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Silybum marianum</i> Bitkisinde yer alan bazı flavolignan türevi bileşiklerin açık yapıları.....	8
Şekil 2.2. Taksifolin ve koniferil alkol ile peroksidatif bağlanma reaksiyonu ile silibin sentezi.....	11
Şekil 3.1. Saf bir maddenin basınç-sıcaklık diyagramındaki mikroskopik davranışları.....	17
Şekil 3.2. Süperkritik akışkan özütleme sisteminin şematik gösterimi.....	20
Şekil 4.1. Deneysel tasarım için uygulanacak akım şeması.....	33
Şekil 5.1. Çalışma için izlenen yol.....	44
Şekil 5.2. Süperkritik CO ₂ Özütlemesi akım şeması.....	49
Şekil 5.3. HPLC programı soft ware görüntüsü.....	53
Şekil 5.4. 100 ppm standart maddeye ait kromatogram	54
Şekil 5.5. 40°C' sıcaklıkta 30, 60, 90 dakikalarda elde edilen numunelere ait kromatogramlar a)Pembe:30 min, b)Mavi:60 min C) Siyah: 90 min.....	55
Şekil 6.1. Klasik özütleme öncesi BET çoklu verilerine göre oluşturulmuş izoterm eğrisi.....	60
Şekil 6.2. Klasik özütleme öncesi BJH desorpsiyon verilerine göre oluşturulmuş gözenek boyut dağılımı eğrisi.....	61
Şekil 6.3. Klasik özütleme sonrası numunenin BET çoklu verilerine göre oluşturulmuş izoterm eğrisi.....	62
Şekil 6.4. Klasik özütleme sonrası numunenin BJH desorpsiyon verilerine göre oluşturulmuş gözenek boyut dağılımı eğrisi.....	62
Şekil 6.5. Süperkritik CO ₂ özütlemesi sonrasında numunenin BET çoklu verilerine göre oluşturulmuş izoterm eğrisi.....	64
Şekil 6.6. Süperkritik CO ₂ özütlemesi sonrasında numunenin BJH desorpsiyon verilerine göre oluşturulmuş gözenek boyut dağılımı eğrisi.....	65
Şekil 7.1. Süperkritik CO ₂ özütleme sürecine özütleme süresinin etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 200 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, karbon dioksit akış hızı 4mL/min).....	67

Şekil	Sayfa
Şekil 7.2 Süperkritik CO ₂ özütleme sürecine sıcaklığın etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	68
Şekil 7.3. 40, 60, 80 °C sıcaklıklardaki 120 dakika sonunda elde edilen mg ürün/ g tohum miktarı (basınç 200 bar, karbon dioksit akış hızı: 4 mL/min, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm).....	69
Şekil 7.4. Süperkritik CO ₂ özütleme sürecine basıncın etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	70
Şekil 7.5. 120 dakikanın sonunda Süperkritik CO ₂ özütleme verimine basıncın etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	71
Şekil 7.6. Süperkritik CO ₂ özütleme sürecine Karbon dioksit akış hızının etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	72
Şekil 7.7.120 dakikanın sonunda Süperkritik CO ₂ özütleme verimine karbon dioksit akış hızının etkisi (sıcaklık 40 °C, Basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	73
Şekil 7.8. Süperkritik CO ₂ özütleme sürecine Karbon dioksit akış hızının etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 *dakika).....	75
Şekil 7.9.Tanecik boyutunun ürün verimine etkisi.....	75
Şekil 8.1. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecine Sıcaklık-Basıncın Etkisi (Akış Hızı:4 mL/min).....	83
Şekil 8.2. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecine Sıcaklık-Akış hızı etkisi (Basınç 180 bar).....	84
Şekil 8.3. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO ₂ ile Özütleme Sürecine Basınç-Akış hızı etkisi (Sıcaklık:40 °C).....	86
Şekil.8.4. Yüzey Cevap Yöntemi sonuçları ile deneysel verilerin uyumu ve parametrelerin etkisi.....	88
Şekil 10.1. Ön işlem uygulanmış numuneye ait kromatogram.....	94
Şekil 10.2. Phenomenex-C18 HPLC silymarin bileşikleri kromatogramı.....	95
Şekil 10.3. Ön işlem uygulanmış numuneye ait kromatogramın literatür verilerine göre adlandırılmış hali.....	95

Şekil	Sayfa
Şekil 11.1. Özütleme süresinde elde edilen a) mg silibin/ g tohum verileri b) mg özüt/g tohum verileri.....	97
Şekil 11.2. Sıcaklığın silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, basınç: 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	99
Şekil 11.3. Basıncın silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	100
Şekil 11.4. Akış hızının silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	102
Şekil 11.5. Tanecik büyüklüğünün silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika).....	104
Şekil 12.1. GC-FID kromatogramı.....	110

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Silybum marianum</i>	6
Resim 2.2. Deve dikenini tohumları a)Toplanmış b) Bitki üzerinde.....	6
Resim 5.1. Deve dikenini tohumu ve çiçeği.....	45
Resim 5.2.Süperkritik özütlenme ünitesi.....	47
Resim 5.3. UV-Vis Spektrometresi için hazırlanan çözelti.....	50
Resim 5.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı.....	52
Resim 6.1. Ön özütlenme sonunda elde edilen çözeltinin sonuçları a) hegzan ile özütlenme, b)metanol ile özütlenme.....	59
Resim 6.2. Süperkritik CO ₂ özütlenme sonuçları a) Hegzan ile ön özütlenme b)Ön işlem yok.....	63

1. GİRİŞ

Deve dikenini (*Silybum marianum*) Asteracea ailesinin bir üyesi olup tüm bitkisel ilaçların en eskisidir. Bu bitkinin özellikle tohumları 2000 yıldan beri tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Eski Yunan kaynaklarında karaciğeri koruyucu ajanlar olarak geçmektedir. 20. yüzyılda deve dikenini genellikle safra yolları şikayetlerinde siroz, sarılık, hepatit, kimyasal ya da ilaç zehirlenmelerinde tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte meme kanseri ve depresyon tedavilerinde de kullanılmaktadır (Corchete 2008).

Deve dikenini, yol kenarlarında, çayırlarda, arazilerde yetişmekte ve kontrolsüz olarak yayılmaktadır. Başçıkları, dikenli ve açık yeşil renkli yapraklar ile enginarı andıran mor renkli küçük çiçeklerden oluşur. Tohumları bitkinin baş kısmında koyu renklidir. Yaprakları soluk yeşil renkli, beyaz damarlı, kenarları derin dişli ve dikenlidir. Tohumlar temmuz-ağustos aylarında olgunlaşır (Corchete, 2008, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2012). Deve dikenini Kuzey Afrika, Anadolu, Güney Avrupa ve Kuzey Rusya Federasyonunda doğal olarak yetişirken, 19 yüzyılda Avrupalılar tarafından Amerika'ya taşınmıştır. Son zamanlarda ise Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya ve Çin'de yetiştirilmeye başlanmıştır. Ülkemizde Ege, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde sıkça görülmektedir (Demirezer, 2007;WHO, 2012).

İlk olarak 1958 yılında deve dikeninin tohumundan aktif bileşenler alınmıştır. Bu bileşiklerin tıbbi olarak aktif özellikleri silymarin bileşiklerinden ileri gelmektedir. 1968 yılında Wagner ve arkadaşları flavolignan olarak bilinen ve kompleks bir karışım olan silymarin bileşiklerini elde etmeyi başarmışlardır. Silymarin bileşiklerini oluşturan silidianin, silikristin ve silibin bileşiklerinin karakterizasyonu yapılmış ve en aktif bileşen silibin olarak bulunmuştur (Corchete 2008).

Klinik, histolojik ve laboratuvar verileri dikkate alındığında karaciğeri koruyucu olarak görev yapmakta, antioksidatif ve serbest radikal oluşumunu engelleyici özellik taşımaktadır. Silymarin lökotrin salgılanmasını sağlayarak iltihap giderici etki yapmaktadır. Hipokolestrolamik, kalp koruyucu, nöroaktif ve nöroprotektif aktivite göstermekte kanser önleyici olarak davranmaktadır (Corchete 2008). 2001 yılında Amerika

ABD’de deve dikenini satışı oranının %13 arttığı belirlenmiştir. Almanya’da ise deve dikenini özütünün satışı 180 milyon doları geçmiştir (Duan Carrier, Clausen, 2004).

Silymarin bileşikleri; karaciğer hücrelerinde ribozomal RNA moleküllerini uyararak protein sentezlenmesine yardımcı olur (Corchete 2008, Abouzeid, 2012). Silymarin bileşikleri karaciğerin dışında kolon, mide vb. gibi kanserlerin iyileşme sürecinde de kullanılmaya başlanmıştır. Dolaşım faaliyetlerini düzenlemekte, vücut direncini artırmaktadır. Safra kesesi hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Mideyi kuvvetlendirir, hazmı kolaylaştırır ve sindirim sistemi hastalıklarına iyi gelir. Migrene karşı faydalıdır. Antioksidan etkileri ile cilt kanserine karşı koruyucudur. Karaciğer enzimlerinin aktivitesini artırır, toplam kolesterolü düşürür. HDL kolesterolü artırırken, LDL kolesterolün karaciğerden uzaklaştırılmasını çabuklaştırır. Damar tıkanıklığını önlemeye yardımcı olur. Diyabet hastalarında deve dikenini kan şekerini, insülin seviyesini azaltır. Deve dikenini çok zehirli bir mantar türü olan *Amanita phalloides*'lerin zehirli etkisinden karaciğeri korur (Agarwal, Agarwal, Ichikawa, Singh, Aggarwal, 2006, Corchete, 2008; Sidhu ve Saini, 2012).

Sentetik olarak üretimi zor olan silymarin bileşikleri deve dikenini bitkisinin özütlemesi ile elde edilebilmektedir. Özütleme çalışmalarının geliştirilmesiyle bu bileşiklerin üretimi daha da artacaktır. Ancak klasik özütleme yöntemlerinin de bazı problemleri vardır. Petrol eteri, etil asetat gibi özütleme amacıyla kullanılan pek çok kimyasal çözücü üründen tamamıyla uzaklaştırılmamaktadır (Reverchon ve De Marco 2006).

Yepyeni bir ayırma teknolojisi olan süperkritik akışkan özütlemesi kısa zamanda gıda, biyokimya, kimya, ilaç ve kozmetik endüstrilerinin ilgi odağı haline gelmiştir. Üniversitelerin araştırma merkezleri, gıda, kimya ve ilaç endüstrisinin önde gelen firmaları süperkritik akışkan özütlemesi konusundaki çalışmalarını giderek yoğunlaştırmakta, pilot sistemlerde elde edilen bulgular süratle endüstriyel üretim olarak hayata geçirilmektedir. Süperkritik akışkan çözücü özellikleri 1879’larda çalışılmaya başlanmış olup, bu çalışmalar ancak 1970’lerde endüstriyel uygulamalara aktarılabilmektedir. Almanya’da yapılan ilk çalışmalar yağ ve asfalt üretimi üzerine gerçekleştirilmiştir. 1980’den itibaren hızlanan çalışmalar gıda endüstrisinde yoğunlaşmıştır. Standart hale gelen proseslerin yanı sıra yeni uygulama alanları araştırılmaktadır (Herrero, Cifuentes, Ibanez 2006, Reverchon ve diğerleri 2006).

Doktora tez çalışmasının amacı deve dikenini tohumundan süperkritik CO₂ ile ilaç aktif maddesi olan ve kanser tedavisi başta olmak üzere pek çok alanda kullanılan silymarin bileşiklerinden silibin A ve silibin B bileşiklerinin maksimum verimde özütlenmesidir.

Bu kapsamda;

- Deve dikenini bitkisi tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlenmesi çalışması için gerekli olan deve dikenini bitkisi toplanarak, ön işlemlerden geçirildi.
- Deve dikenini tohumundan süperkritik CO₂ özütlenmesi ile çeşitli parametrelerin ürün verimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Farklı sıcaklık, basınç, CO₂ akış hızı, özütlenme süresi ve tanecik büyüklüklerinde deneyler gerçekleştirilerek, elde edilen sonuçlar doğrultusunda Yüzey Cevap Yönteminin maksimum ve minimum çalışma aralıkları belirlendi.
- Yüzey Cevap Yöntemi kapsamında Design Expert 6.08 Trial programı ile sıcaklık, basınç, akış hızı parametrelerinin özütlenme verimine etkisini gösteren ön algoritma oluşturuldu. Programın sunduğu koşullardaki yeni deneyler yapılmış olup, bu sonuçlar doğrultusunda, 2.dereceden model önerildi, optimum koşullar ve bu koşullardaki % verim (g ürün/g tohum) değeri hesaplandı. Deney sonuçları ile modelin önerdiği sonuçların uyumlu olduğu görüldü.
- Özütlenme öncesi yapılan ön denemelerin özütlenen numune içerisindeki yağ oranını nasıl etkilediği ve aynı zamanda tohumun gözenek yapısı üzerinde ne tür etkiler yaptığına yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Süperkritik CO₂ özütlenmesi öncesinde ve sonrasında deve dikenini tohumunun gözenek çapı ve yüzey alanı araştırıldı.
- Süperkritik CO₂ özütlenme ile elde edilen numune içerisinde yer alan ve ilaç etken maddesi olan silibin A ve silibin B bileşiklerini, UV-Vis spektrometrisi, HPLC yöntemi ile kalitatif ve kantitatif olarak analizleri gerçekleştirildi. UV-Vis spektrometrik yöntem özüt içerisindeki silymarin bileşiklerini 2,4-Dinitrofenil hidrazin ile türevlendirme işlemi gerçekleştirildi, özütlenen numune içerisindeki silymarin bileşiklerinin miktarı % silibin cinsinden bulundu. HPLC ile silibin A ve silibin B bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif analizi üzerine çalışmalar gerçekleştirildi. Silibin A ve silibin B bileşiklerine ait piklerin ayrı ayrı analizlenebilmesi için çalışmalar yapıldı. Silibin A ve silibin B bileşiklerinin HPLC ile analizinin yapılabilmesi için laboratuvarında hali hazırda bulunan kolon (150*4,6 mm*3µ) ile yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu kapsamda

taşıyıcı faz bileşimi ve akış hızı, tampon etkisi, numune derişimi, çalışma programı ve analiz süresi gibi pek çok parametre incelendi.

- Analiz yöntemi ve çalışma koşulları belirlendikten sonra, silibin A ve silibin B standardından faydalanarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Oluşturulan bu analiz yöntemi ile deve diken tohumunun süperkritik CO₂ özütlemeye deneylerinde elde edilen numuneler analizlendi. Bu sonuçlara göre silibin A ve silibin B piklerinin iç içe geçmiş tek pik şeklinde geldiği görüldü. HPLC analizinde yaşanan problemlerin çözülmesi için analiz öncesinde numuneye ön işlemler uygulandı. Matriks ortamının olumsuz etkisinin azaltılması için zenginleştirme işlemi gerçekleştirildi. Döner buharlaştırıcı altında uçucu bileşenlerin uzaklaştırılması, kullanılan tohum miktarının artırılması, perdeleme etkisi yaratan yağın diğer özütlemeye ile ortamdaki uzaklaştırılması vb. gibi parametrelerin etkisi araştırıldı. Yağımsı bileşiklerin uzaklaştırılması için ön ayırma işlemi gerçekleştirildiğinde HPLC analizinde olumlu sonuçlar elde edildi. Farklı sıcaklık, basınç, CO₂ akış hızı ve tanecik büyüklüklerinde gerçekleştirilen deneylerden alınan özüt içerisindeki Silibin A ve silibin B bileşiklerinin analizi yapıldı ve bu parametrelerin silibin A ve silibin B bileşiklerinin verimi üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışıldı. Özüt içerisinde bulunan yağın silibin A ve silibin B bileşiklerinin verime etkisi araştırıldı.
- Özütlenen numuneler içindeki yağ miktarının belirlenmesi için transesterleşme işlemi uygulandı ve Gaz Kromatografi Alev İyonizasyon Dedektörü (GC-FID) cihazı ile analizi yapıldı.

Yukarıda bahsedilen doktora tez konusu kapsamında yapılan çalışmaların detayları aşağıda sunulmaktadır.

2. *Silybum marianum*

Bu bölüm *Silybum marianum* bitkisine ait botanik özellikleri, yapısında bulundurduğu önemli kimyasal bileşikleri, farmakolojik olarak göstermiş olduğu etkileri ve ekonomik analizini içermektedir.

2.1. Botanik Özellikleri

Silybum türleri adını Eski Yunan filozofu Dioscorides'den almaktadır. Duriex yaptığı araştırmalarına göre deve dikenini alacalı yapraklı *S. Marianum* (L.) Gaernt ile tamamı yeşil yapraklı *S. eburneum* Coss olmak üzere iki tür içermektedir. Bununla birlikte Hetz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bu iki bitki cinsinin arasında belirgin bir fark olmadığı belirtilmiştir. Çoğu araştırmacıya göre ise *Silybum marianum* bitkisi tek cinstir. *Silybum marianum* 'un Latince eş anlamlıları *Carduum marianum* L., *Carduus marianum* L., *Cnicus marianum* 'dur. Halk arasında ise isimleri devekengeli, Meryem Ana dikenini ya da sütlükengel olarak da bilinmektedir (Corchete 2008, Altın, 2006).

Silybum marianum Asteracea ailesi içerisinde yer almaktadır. Bu bitkinin tedavi amaçlı olarak kullanılması çok eski yıllara dayanmaktadır. Sistematikteki yeri Çizelge 2.1 de verilmiştir (Altın, 2006).

Çizelge 2.1. *Silybum marianum* bitkisinin sistematikteki yeri (Altın, 2006).

Bölüm:	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf:	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım:	Asterales
Familya:	Asteraceae (Papatyagiller)
Cins:	<i>Carduus</i> , <i>Carlina</i> , <i>Cirsium</i>

Deve dikenini her türlü toprağa uyum sağlayabilmektedir. Bitkinin çoğaltılması için tohumu ilkbahar sonunda veya sonbaharda ekilmesi gerekmektedir. Ilıman iklimlerde kendi kendine dökülen tohumlardan da çıkıp büyümektedir. İki yıllık otsu bir bitki olup, gövde

30-100 cm yükseklikte, yeşil ve yumuşaktır (Resim 2.1). Yaprakları soluk yeşil, beyaz damarlı veya alacalı, sap kenarları dikenlidir. Gövde tek ya da dikenli taç yapraklarıyla dallanmıştır. Çiçekleri kırmızı-mor rengindedir (Demirezer, 2007; WHO 2012).



Resim 2.1. *Silybum marianum*

Deve dikeni tohumları bitkinin baş kısmında, ince tüy şeklindeki çiçeklerin altında gelişir. Yuvarlak ve uzun şeklindeki tohumlar; sert 6-8 mm uzunluğunda, koyu kahverengi ve parlaktır. Temmuz-ağustos ayında olgunlaşır (Corchete 2008).



Resim 2.2. Deve dikeni tohumları a) Toplanmış b) Bitki üzerinde

Yol kenarlarında, çayırarda, arazilerde kendiliğinden yetişmekte ve kontrolsüz olarak yayılmaktadır. Deve dikenini kışı rozet yapraklarla geçirir. Çiçek oluşturması için soğuğa ihtiyaç vardır. Her bir çiçeğin kafasında yaklaşık olarak yüz tohum bulunur. Her bitkide 10-50 kafadan oluşur. Ortalama bir bitkide 3000 adet tohum vardır. Bunların %94'ü canlıdır. Tohumların büyüklüğü sıcaklık ve neme bağlıdır. Tohumlar 9 yıl ya da daha uzun süre boyunca canlı kalabilir (Corchete 2008).

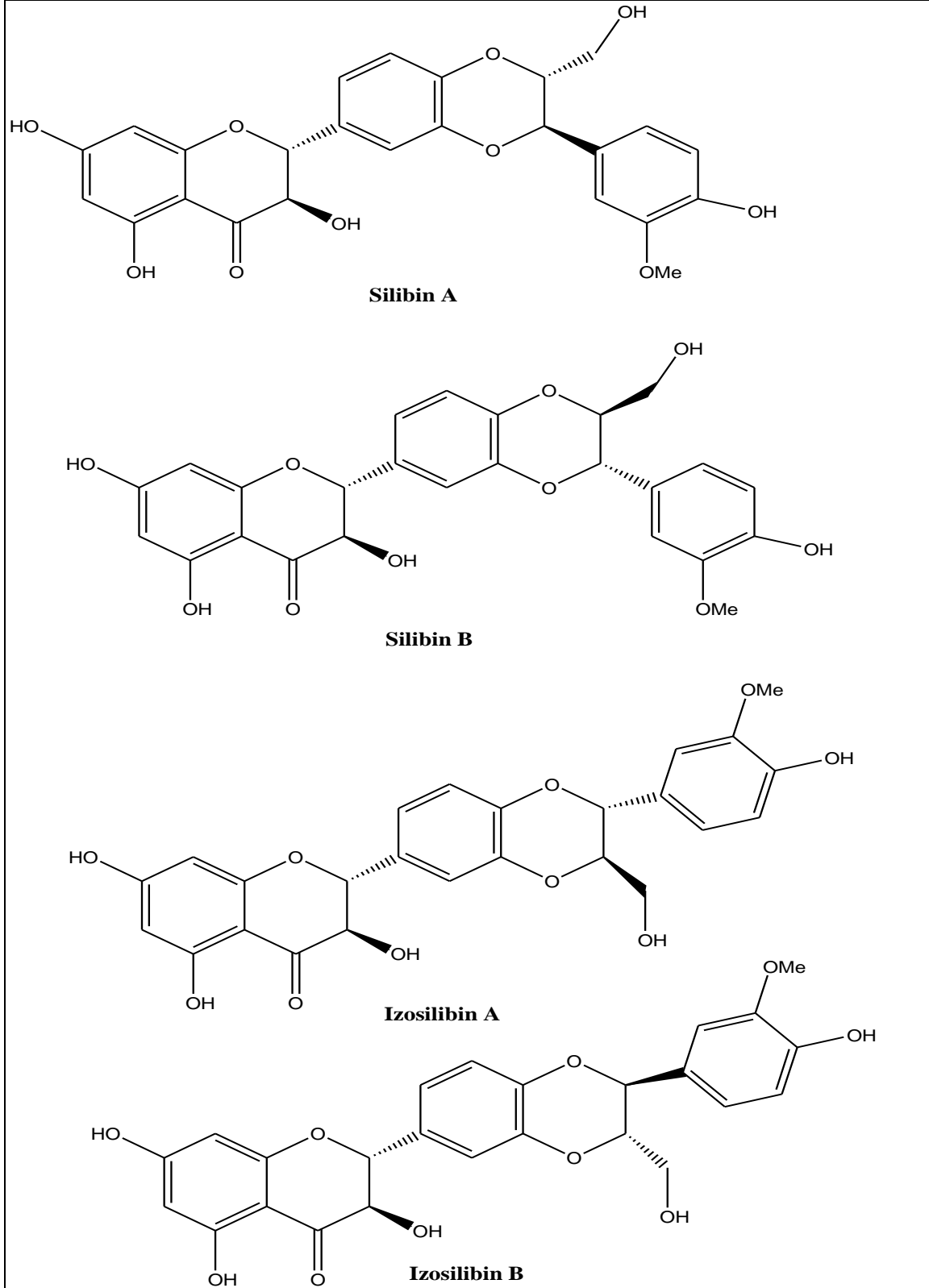
2.2. *Silybum marianum* Bitkisinin Yapısında Bulundurduğu Kimyasallar

Bu bitkinin bileşiminde karaciğeri koruyucu etken maddeler ve kendine has diğer maddeler bulunmaktadır. Yapısında flavonolignan türevi bileşikler (silymarin vb.), Flavonoidler, yağ asitleri, proteinler ve az miktarda tokoferol, sterol ve diğer bileşikler bulunmaktadır. (Demirezer, 2007).

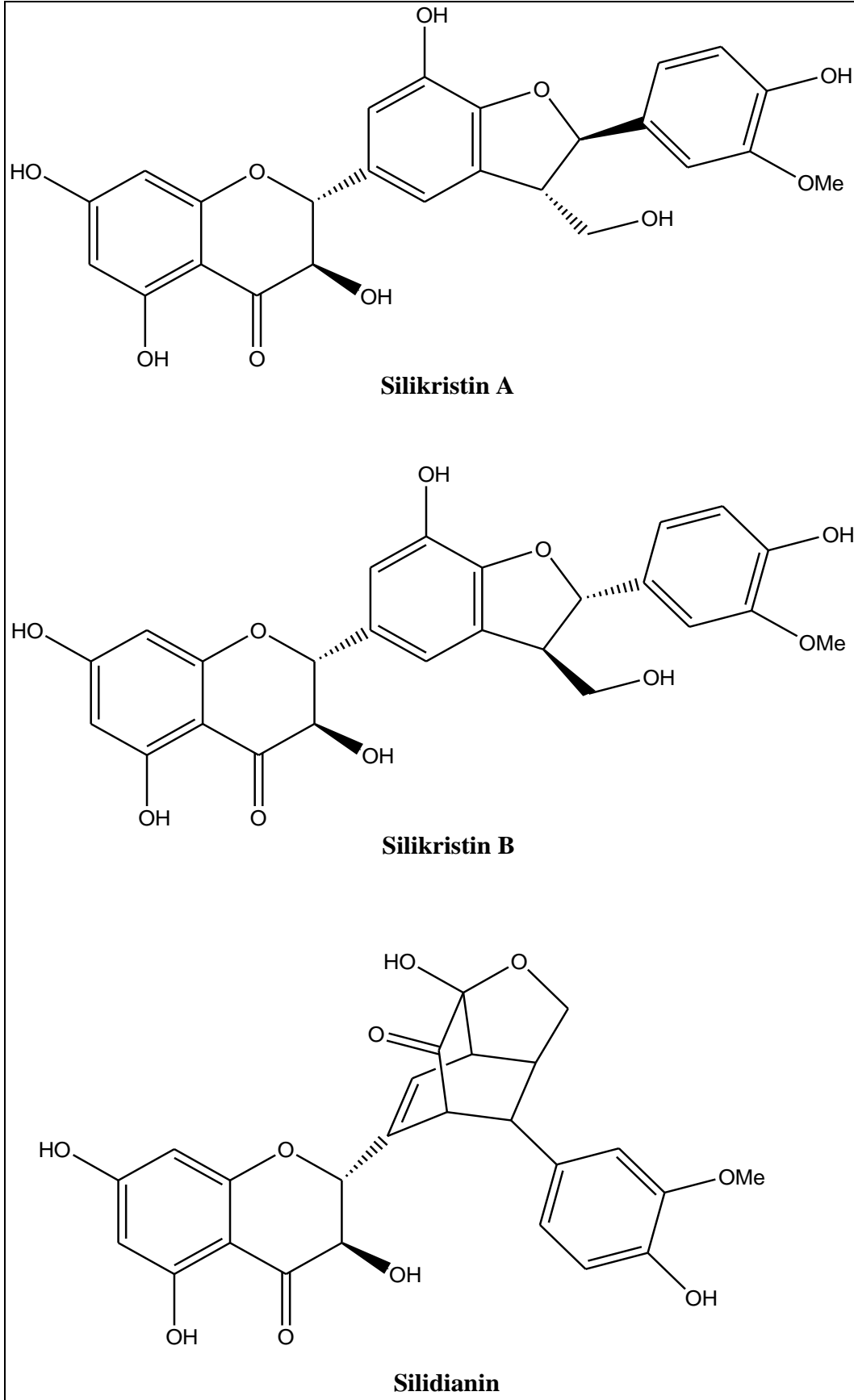
Flavolignanlar

Silybum marianum bitkisinin tohumunda %1,5-3 flavolignan bulunmaktadır. Bu miktar bitkinin yetiştiği iklime, bitki örtüsü gibi ortam koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Flavanolignan türevi en önemli bileşikler silibin, silikristin ve silidianin karışımı olarak geçen silymarin bileşikleridir. Bu bileşiklerin %50'ini silibin oluştururken silidianin ve silikristin %20-30'luk bir kısmını içermektedir. Bu bileşikler biyolojik aktiflikleri nedeniyle kimya, farmostatik, klinik ve toksikolojik araştırmalarda ilgi çekmektedir. Açık yapıları Şekil 2.1.'de verilmiştir (Corchete 2008, Ahmadi, ve diğerleri 2010).

Silibin bileşikler silibin ve izosilibin olarak ayrılmaktadır. Bununla birlikte silibin ve izosilibinin; silibin A, silibin B ve izosilibin A, izosilibin B şeklinde iki adet diastereomeri mevcuttur. Benzer şekilde silikristinin de A ve B olmak üzere iki adet diastereomer vardır. Diğer flavonolignan türevi bileşikler ise silymonin, silandirn, silyhermin, ve neosilyhermin A ve B olarak sıralanabilir (Corchete 2008).

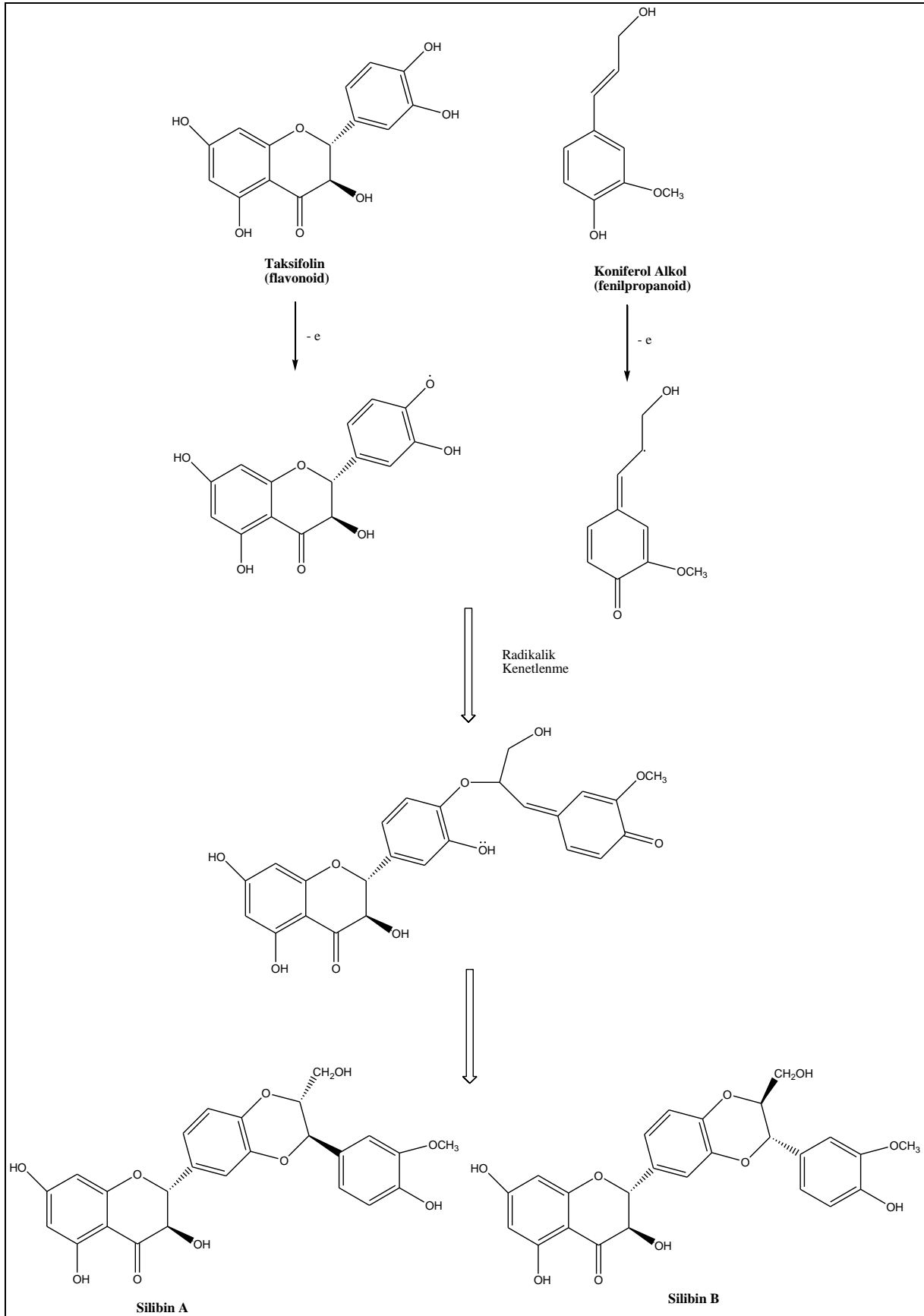


Şekil 2.1. *Silybum marianum* bitkisinde yer alan bazı flavolignan türevi bileşiklerin açık yapıları (Corchete 2008).



Şekil 2.1.(Devam) *Silybum marianum* bitkisinde yer alan bazı flavolignan türevi bileşiklerin açık yapıları (Corchete 2008).

Freudenberg hipotezine göre flavolignanların biyosentezinde silibin A ve silibin B, izosilibin A ve izosilibin B taksifolin ile koniferil alkolün peroksidaz enzimiyle reaksiyonundan sentezlenmiştir. Silibinin oluşum mekanizması Şekil 2.2’de yer almaktadır. Radikaller başlangıçta enantiyoseçici olarak oksidatif kenetlenme ile bağlanmıştır. Biyosentezin son basamağında ise termodinamik kontrollü olarak OH grubunun silibinin iskeleti olan 2,3-trans substiute 1,4-benzodioksana bağlanmasıyla meydana gelmiştir. Benzer biyosentetik süreçler meyve içinde 1,4-benzodioksan ile fenil propanoid arasında oksidatif bağlanma ile diğer flavolignanların oluşumu sağlanmaktadır. Bunlar oksidatif kenetlenme basamağındaki enantiyoseçiciliğe bağlıdır. Bu da kimyasal türler arasındaki kimyasal farklılıkların oluşmasını açıklamaktadır (AbouZid, 2012; Dewick 2002).



Şekil 2.2. Taksifolin ve koniferil alkol ile peroksitatif bağlanma reaksiyonu ile silibin sentezi (AbouZid, 2012).

Flavonoid

Silybum marianum bitkisinde ise flavonoid olarak apigenin, krisoeriol, eriodiktiol, kaemferol, naringerin, kuersetin, dihidrokuarsetin türevleri ve taksifolin bulunmaktadır (AbouZid 2012).

Yağ Asitleri

Silybum marianum bitkisinde yaklaşık olarak %20-30 yağ asiti bulunmaktadır. Bunlar lineoik asit, linolenik asit, mistrik asit, oleik asit, palmitik, stearik asit ve diğer yağ asitleridir. Bu karışımda en büyük yüzdeyi %60 ile lineoik asit oluşturmaktadır (Corchete 2008).

Diğer Bileşikler

Toprak üstü kısımlarında alüminyum, β -karoten, Mn, P, Ca, Cr, Co, Fe, Mg, Na, Zn, K, Se, fumarik asit ve proteinler yer almaktadır.

Tohumda ise %25-30 protein, %0,038 tokoferol, % 0,68 sterol (kolsterol, kamfesterol, stigmasterol, sitosterol), musilaj, dehidrokonihiril alkol, histamin, kemferol, kesretin, taksifolin, tiramin gibi bileşikler bulunmaktadır.

2.3. *Silybum marianum* Bitkisinin Farmakolojik Etkileri

Silymarin bileşiklerinin ve özellikle de silibin bileşiğinin literatürde pek çok kullanım alanına sahip olduğu görülmüştür. Faydaları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- ❖ Kanser önleyici,
- ❖ Karaciğer, mide, dalak, bağırsak, böbrek ve akciğer hastalıklarında,
- ❖ Siroz önleyici,
- ❖ Antidepresant,
- ❖ Mantar zehirlenmelerinde,
- ❖ Kabızlık ve hazımsızlık giderici,
- ❖ Öksürük giderici,

- ❖ Kusturucu ilaç olarak,
- ❖ Safra kesesi hastalıklarında,
- ❖ Kandaki fazla kolesterolün giderilmesinde,
- ❖ Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde
- ❖ Enfeksiyonlara karşı,
- ❖ Migren,
- ❖ Bulantı giderici,
- ❖ İdrar söktürücü olarak
- ❖ Sedef Hastalığında,
- ❖ Deri Kanserinin tedavisinde kullanılır (Corchete,2008,Agarwal ve diğerleri 2006; Sidhu ve diğerleri, 2012).

Deve dikenini tohumu özellikle karaciğer kanseri ve diğer karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Deve dikenini tohumu başta kimyasal ilaçların (karbontetraklorür, galaktozamin, tiyoasetamid, preosidim, parasetamol, azotiyofirin, indometachin, izoniazid, lorazepam, tolbutomid, klofibrat, estradiol, halotfan, fosfatasit alt türevleri, benzipren) zehirli mantarların ve alkolün zararlı etkilerinden karaciğeri koruduğu görülmüştür (Agarwal ve diğerleri 2006).

Yapılan klinik çalışmalarda antikanserojenik, antioksidan, antihepatotoksik, antiinflammatory, antihiperlipidemik, hipoglisemik, antipsöriatik, hepatoprotektif, nöroprotektif gibi pek çok etkisinin olduğu gözlenmiştir (Sidhu ve diğerleri, 2012).

2.4. Ekonomik Önemi

Amerika Birleşik Devletleri'nde, devedikeni bitkisel ürünler kategorisinde birinci sırada satılmaktadır. 2000 yılında, devedikeninin perakende satışı 1999 yılına göre % 14'lük bir artış göstererek 8.900.000\$ bulmuştur Bu değer gün geçtikçe artmaktadır (Post-White, Ladas, Kell 2007). *Silybum marianum* en çok Almanya'da üretilmektedir. Kaliforniya da da üretimi çok fazladır (Altın, 2006).

Çok sayıda *Silybum marianum* drug ve preparatlar yurt dışında eczane ve marketlerde satılmaktadır. Aşağıda silymarin içerikli üretilen drug isimleri ve imalatını sağlayan firmaların bir bölümü verilmiştir. Diğerleri ise EK-1'de yer almaktadır (Medindia, 2012).

Çizelge 2.2. Silymarin içerikli üretilen drug isimleri ve imalatını sağlayan firmalar (Medindia,2012).

No	Genel Adı	Markası	İmalatçı Firma
1	Silymarin	Lymo, Siliv (100 ml)	Alpic Remedies Ltd.
2	Silymarin	Hepatoz (70 mg) Hepatoz (140 mg) Hepatoz (100 ml)	Klintoz Pharmaceuticals Pvt Ltd
3	Silymarin	S -Meri	Taurus Laboratories Pvt. Ltd.
4	Silymarin	Silicon, Silicon 140 Silicon Susp., Silicon Susp 200 Lecivit –S, Lecivit -S 200	Lifeline Biotech Ltd.
5	Silymarin	Prohep Forte, Prohep Forte (70 mg)	Lupin Laboratories Ltd.
6	Silymarin	Siliv Sylo Lyma	Finecure Pharmaceuticals Ltd
7	Silymarin	Livarin	Sidhballi Formulation
8	Silymarin	Hepsil (70 mg)	Pramukh Swami Pharma Ltd.
9	Silymarin	Osilma, Osilma (70 mg) Osilma (140 mg)	Osho Pharma Pvt.Ltd.
10	Silymarin	Silyrin Silyrin B Silyrin (35 mg) Silyrin (140 mg)	Talent Laboratories

Deve dikenini içerisinde bulunan faydalı bileşikler, laboratuvar ortamında sentetik olarak sentezlendiklerinde vücutta aynı etkiyi göstermediği tespit edildiğinden yapılan çalışmalar bu bileşiklerin direkt olarak bitkiden alınması şeklindedir. Literatürde silymarin bileşiklerinin deve dikeninden özütlenmesi soksile cihazıyla gerçekleşmektedir. Genellikle özütlemenin gerçekleşmesi için gerekli olan organik çözücü etil asetat, petrol eteri, etanol, metanol ve asetonitril şeklinde sıralanabilir (Corchete 2008). Bununla birlikte deve dikeninden flavolignan özütlenmesinde edilen bileşiklerin veriminin kısa sürede maksimum düzeye ulaşabilmesi ve bozunmadan elde edilebilmesi için süperkritik akışkan özütlenmesi gibi yeni yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte mikrodalga, ultrasonik dalgalar ile özütlenme gibi diğer yöntemlerde mevcuttur (Zheng ve diğerleri, 2009).

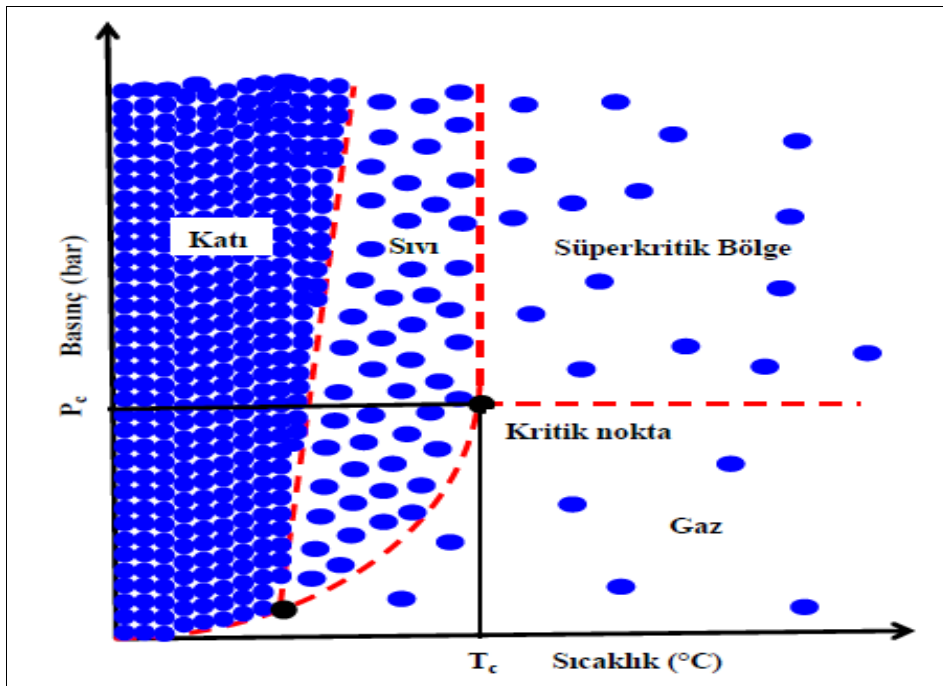
Doktora tez konusu kapsamında süperkritik CO₂ ile deve diken tohumundan silibin A ve B bileşiklerinin özütlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla Bölüm 3’de süperkritik akışkan özütlemesi ile ilgili olarak bilgilere yer verilmektedir.

3. SÜPERKRİTİK AKIŞKANLA ÖZÜTLEME

Doğal maddelerden süperkritik özütleme ile önemli bileşiklerin ayrılması süperkritik akışkan teknolojisinin en çok çalışılan alanıdır. Son 10 yıldır tohum, meyve, yaprak, çiçek gibi bitkilerden yağlar, ilaç etken maddeleri gibi değerli bileşikler süperkritik akışkan ile özütlenmektedir. Antioksidanlar, farmostatik renk verici maddeler ve pestisitler üzerinde pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde süperkritik akışkanlar, fizikokimyasal özellikleri, süperkritik akışkan özütleme sisteminin işleyişi, avantajları ve dezavantajları, işletme parametrelerinin seçimi gibi konularda bilgi verilmektedir.

3.1. Süperkritik Akışkan

Bir akışkanın sıcaklığı ve basıncı kritik noktanın üzerinde ise “Süperkritik akışkan” olarak adlandırılır. Saf bir maddenin katı, sıvı, gaz ve süperkritik bölgedeki mikroskopik davranışları Şekil 3.1’de verilmiştir (Cansell, Aymonier, Loppinet-Serani 2003).



Şekil 3.1. Saf bir maddenin basınç-sıcaklık diyagramındaki mikroskopik davranışları (Cansell ve diğerleri, 2003).

Süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri dikkate alındığında, süperkritik akışkanlar gaz ve sıvı arasında yer alır. Bu özellik diğer çözücülere göre daha iyi

performans sergilemesini sağlar. Süperkritik akışkanın sıvı, gaz ve süperkritik bölgedeki yoğunluk, viskozite ve difüzyon katsayılarını gösteren çizelge aşağıda verilmektedir. (Wang Ling, Giang, 2003).

Çizelge 3.1. Bir akışkanın sıvı, gaz ve süperkritik bölgedeki fizikokimyasal özellikleri

Fizikokimyasal Özellik	Sıvı	Süperkritik Akışkan	Gaz
Yoğunluk (kg/m ³)	600-1600	200-1000	1
Viskozite (kg/m.s)	1,0x10 ⁻³	1,0x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵
Difüzyon katsayısı (m ² /s)	1,0x10 ⁻⁹	1,0x10 ⁻⁷	1,0x10 ⁻⁴

Süperkritik akışkan kütle transfer özelliği bakımından gazlara çözünürlük özelliği bakımından ise sıvılara benzemektedir. Yoğunluğun artması ile süperkritik akışkan; sıvı özelliği göstererek, çözme gücü artmaktadır ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedir. Bununla birlikte süperkritik akışkanlar; sıvılara göre daha kolay taşınır ve katıların içine kolaylıkla difüzenirler. Özütlenecek maddeyi sıvılara göre daha kolay bulunduğu yapıdan uzaklaştırabilmektedirler. Özütleme prosesinin işletme koşulları; süperkritik akışkanın yoğunluğu, viskozitesi vb. gibi fizikokimyasal özelliklerini etkilemesi nedeniyle önem taşımaktadır (İçen ve Gürü, 2008).

3.2. Süperkritik Akışkanın Seçimi

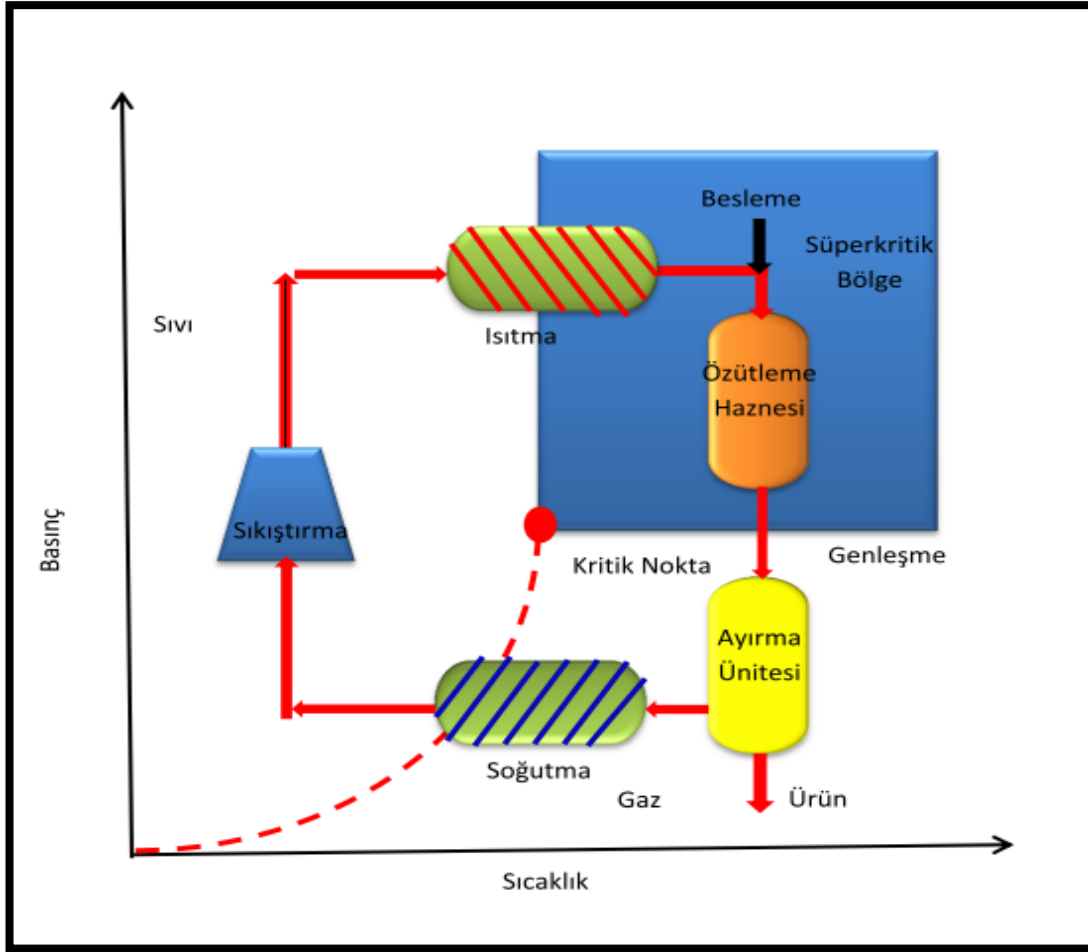
Gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan değerli maddelerin özütlenmesinde kullanılacak süperkritik akışkanın seçimi son derece önemlidir. Bu seçimde, hammaddenin akışkan içinde çözünürlüğü; kimyasal kararlılığı; ekonomik ve kolay bulunabilen bir akışkan olması ve akışkanın toksik, patlayıcı ve yanıcı olmaması gibi güvenlik sorunları göz önünde tutulmalıdır. Çizelge 3.2’de biyolojik uygulamalarda en çok kullanılan çözücülerin kritik sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerleri verilmiştir. Amonyak, n-pentan, metanol ve toluenin kritik sıcaklıklarının yüksek olması nedeniyle, sıcaklığa duyarlı olan doğal maddelerin özütlenmesi için uygun çözücü olmadıkları görülmektedir (Çalimli 2003).

Çizelge 3.2. Süperkritik akışkanların fiziksel özellikleri (Çalimli 2003)

Çözücü	T _c (K)	P _c (MPa)	r _c (kg.m ⁻³)
Etilen	282,5	5,0	220
Karbondiyoksit	304,3	7,4	470
Etan	305,4	4,9	200
Propan	369,9	4,3	220
Amonyak	405,4	11,3	240
n-pentan	469,6	3,4	240
Metanol	512,7	8,1	270
Toluen	591,8	4,1	290
Su	647,7	22,1	320

3.3. Süperkritik Akışkan Özütleme Sistemi

Süperkritik akışkan olarak kullanılacak akışkan öncelikle sıkıştırılarak istenilen basınç değerine getirilir. Buradan bir ısıtıcı yardımıyla akışkan çalışılacak sıcaklık değerine ayarlanır. Böylece süperkritik akışkan haline getirilerek ekstraktöre gönderilir. Ekstraktörde bulunan madde ile teması sonucu, süperkritik akışkanda çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basıncı düşürülür. Basıncının düşürülmesi sırasında çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. Ayırıcıdan alınan akışkanın geri kazanımı için bir soğutucuda sıcaklığı düşürülebilmektedir. Soğutucudan çıkan akışkan tekrar sisteme beslenmek üzere giriş akımıyla karıştırılır. Elde edilen ürün ayırıcının altından toplanır (Novasep,2012). Süperkritik akışkan özütleme sisteminin işleyişini gösteren akım şeması aşağıda verilmiştir (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Süperkritik akışkan özütleme sisteminin şematik gösterimi (Novasep, 2012).

3.4. İşletme Parametrelerinin Seçilmesi

İşletme koşullarının seçilmesinde özütlenecek bileşik ya da bileşikler önemlidir. Moleküler ağırlık ve polarite durumuna göre hesaba katılır. Isıl kararsız bileşikler için süperkritik akışkan sıcaklığı kritik nokta civarında çalışılır. Sabit basınç altında sıcaklık arttıkça süperkritik akışkanın yoğunluğu azalır, böylece süperkritik çözücünün çözme gücü azalır, ancak özütlenecek bileşiklerin basınçları yükselir. Böylece bu bileşiklerin akışkan fazdan geçişi artar (Herrero ve diğerleri, 2006, Reverchon ve diğerleri, 2006).

Önemli bir proses parametresi ise basıncın süperkritik akışkanın seçiciliğine etkisidir. Genellikle basınç yükseldikçe çözücü gücü artar ve özütleme seçiciliği azalır. Çoğunlukla çözücü gücü verilen koşullarda süperkritik akışkanın yoğunluğu ile ifade edilir. Örneğin süperkritik CO₂ yoğunluğu yaklaşık 0,15 ile 1 g/cm³ arasında değişir ve bu değer sıcaklığa

ve basınca bağlıdır. Bu değişim lineer olmayıp, istenilen özellikler CO₂'in özelliklerini gösteren tablolar kullanılarak sağlanabilir (Reverchon ve diğerleri 2006).

Süperkritik akışkan özütlemesinde önemli diğer parametreler ise akışkanın hızı, ekstrakte edilecek maddenin tanecik boyutu ve özütleme süresidir. Bu parametrelerin tam olarak belirlenmesiyle istenen ürünlerin en kısa zamanda özütlenmesi tamamlanır. Özütleme prosesini çözünürlük ve kütle transfer direnci etkilemektedir. Özütleme süresi, prosesi kontrol eden mekanizma ile ilişkilidir. Tüm prosesin hızı en yavaş basamağa bağlıdır. Eğer dış kütle transfer direnci ya da denge; prosesi kontrol ediyorsa bu durum süperkritik akışkanın akış hızı ile ilgili parametredir. Ekstraktöre süperkritik çözücü besleme miktarı özütleme hızını belirler. Eğer iç kütle transferi prosesi kontrol ediyorsa tanecik boyutu önemli rol oynamaktadır. Tanecik boyutunun azalması çözücünün difüzyonunu artırır. Buna karşın tanecik boyutu çok küçük ise özütleme yatağı içindeki kanallarda bazı problemler yaratabilir. Çözücünün bir kısmı özütleme haznesi içindeki kanallarda ilerlerken ekstrakte edilecek materyale temas etmez. Bu da prosesin veriminin kaybına neden olur. Genellikle tanecik çapı yaklaşık 0,25 ile 2 mm arasında tercih edilir. Optimum boyut matriks içindeki su içeriği miktarına ve sıvı bileşiklerin özütleme miktarına bağlıdır. Öğütme ile çok küçük taneciklerin üretimi uçucu bileşenlerin kaybolmasına neden olmaktadır. Proses veriminin maksimuma gelmesinde akış hızı ile tanecik boyutu arasındaki ilişkiye bağlıdır (Sulu 2012, Herrero ve diğerleri 2006, Reverchon ve diğerleri 2006).

Süperkritik akışkan özütlemesi sürecinde diğer bir değişken; aşamalı olarak özütlemenin gerçekleştirilmesi ve ortak çözücü eklenmesidir. Aşamalı özütleme; prosesin her bir aşamasında farklı sıcaklık ve/veya basınç değerlerinin kullanılmasıyla elde edilir. Bu yöntemle özel bileşiklerin süperkritik akışkan içinde farklı çözünürlük göstermesiyle aynı ortamdan ayrılmasını sağlar. Örneğin ilk özütleme koşulları düşük CO₂ yoğunluğu (Ör:0,29 g/cm³, 90 bar, 50 °C), 2 aşamada yüksek CO₂ yoğunluğu gerçekleştirilerek yapılabilir (Ör: 0,87 g/cm³, 300 bar, 50 °C). Pek çok çözünen bileşik, örneğin uçucu yağlar, ilk aşamada ekstrakte edilirken, az çözünenler örneğin antioksidanlar iki aşamada ekstrakte edilir.

Süperkritik akışkan özütlemesi sürecinde ortak çözücü ilavesinin özütleme süresini ve verimini olumlu yönde etkilemektedir. Örneğin polar moleküller için süperkritik CO₂'e

sıvı çözücü ilavesi çözücünün gücünü attırır. Süperkritik CO₂ polar bileşiklerde düşük afiniteye sahipken, polar olmayan bileşikler için iyi çözücüdür. Çeşitli yazarlar çok az miktarda sıvı çözücü ilavesinin (Ör: Etil alkol) süperkritik CO₂ çözücülüğünü artırdığını belirtmişlerdir. Ortak çözücü ilavesi süperkritik CO₂'in çözücü gücünü yenilemektedir. Ancak bu yöntemin dezavantajı, çözücü gücünün artmasıyla ürün seçiciliği azaltmaktadır. Bununla birlikte ortak çözücüler çoğunlukla atmosferik basınçta sıvı olduğu için özütleme ünitesinde özütlenen bileşiklerle birlikte toplanır (Reverchon ve diğerleri 2006).

Süperkritik akışkan özütlemesi teknolojisi üzerine yapılan ilk çalışmalar yüksek basınçta (>350 bar) yapılmıştır (Ör: Terpenler, yağ asitleri vb.). Bunun amacı süperkritik akışkanın çözücü gücünün artırılmasıdır. Çözücü gücü ile seçicilik arasında bir optimizasyon oluşturularak, süperkritik akışkan özütleme prosesinin işletme koşulları belirlenmiş istenen bileşiklerin istenmeyen bileşiklerden seçimli olarak ayrılması sağlanmıştır. Başarılı bir özütleme yapabilmek için sadece bileşiğin çözünürlüğü önemli değildir. İstenmeyen ürünlerin ayrılması, ham materyallerin yapısından kaynaklanan kütle transfer direnci ve bileşiklerin bir bölümünün özütlemesi de prosesi etkilemektedir. Materyalin doğal yapısının mikroskobik özellikleri kütle transfer direncinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Çeşitli tanecik boyutlarında ve süperkritik akışkanın kalma sürelerinde yapılan bazı özel deneyler bu durumu daha da iyi açıklamaktadır. Çözünürlük ve kütle transferi arasındaki karmaşık ilişki süperkritik akışkan performansı ile aydınlatılabilir (Reverchon ve diğerleri 2006).

3.5. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Avantajları

Doğal kaynaklardan yararlı bileşiklerin süperkritik akışkan ile özütlenmesi üzerine yüzlerce kaynak bulunmaktadır. Klasik yöntemlere göre pek çok avantajı vardır.

Süperkritik akışkan güç/seçicilik oranını dengelemektedir. Ortamı kirletici ve çevreye zarar verici çözücülerin ortamdaki kaldırılmasını sağlar. Hegzan, pentan ve bütan gibi hidrokarbonlar azot oksit, sülfür heksaflorür ve florlu hidrokarbonlar gibi bileşikler süperkritik akışkan özütlemesinde çözücü olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte en popüler çözücü ise CO₂'dir. Popülerliğinin sebebi kolay ulaşılması, güvenli olması, toksik olmaması ve diğer çözücülere göre maliyetinin düşük olmasıdır. Süperkritik koşulları; düşük basınçta ve oda koşullarına yakın sıcaklıktadır (Reverchon ve diğerleri 2006). Pek

çok çalışmada bitkisel yağların CO₂ içinde rahatlıkla çözüldüğünden bahsedilmektedir (Skerget, Kotnik, Knez, 2003, Akanda ve diğerleri 2012). CO₂ gazı ürün içinde başka kirliliğe yol açmaz. Diğer bir özelliği polar olmayan bileşenler için seçici olmasıdır. Süperkritik fazda karbondioksit gazının viskozitesi düşüktür, difüzyon daha hızlı olur, yani katı hammaddelerin dokusuna çok hızlı nüfuz eder ve verimliliği artırır. Düşük sıcaklıkta çalışıldığı için aroma ve vitaminler zarar görmez. Ayrıca temel proses (özütleme+ayırma) diğer yöntemlere göre daha ucuz ve endüstriyel ölçekte basit olarak nitelendirilir (Sulu 2012, Herrero ve diğerleri 2006).

Aynı gaz tekrar tekrar kullanıldığı için ekonomiktir. Çevre kirliliğine yol açmaz. Sistemin sıcaklığı ve basıncının ayarlanmasıyla viskozite, difüzyon katsayısı, dielektrik sabiti, süperkritik gaz yoğunluğu ve çözünürlük özellikleri kontrol edebilir, ham materyal ve ekstrakte edilecek ürüne göre ayarlanabilmektedir(Sulu 2012).

Süperkritik akışkan özütleme sistemini çalıştırmak için kullanılan enerji sadece elektrik enerjisidir. Geleneksel çözücü özütlemesinde olduğu gibi ısıtma ve buhar işlemi gerektirmez. Genellikle kurulan tesisler 600 L, 1000 L gibi hacimlere sahiptir. Aynı işi yapan geleneksel tesislerle karşılaştırılınca hacim olarak daha az yer kaplar, daha az işçilik gerektirir. Farklı basınç ve sıcaklık kombinasyonları kontrol edilerek son ürünü bileşenlerine ayırmak mümkündür. Saf ve kaliteli ürünler elde edilebilir. Son üründe çözücü kalıntısı bulunmamaktadır (Sulu 2012, Çalimli 2003).

3.6. Süperkritik Akışkan Özütlemesinin Dezavantajları

Süperkritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta (>80 atm) gerçekleşmesinden dolayı yüksek yatırım maliyeti gerektirmektedir. Son derece önemli olduğu halde ihmal edilen diğer bir dezavantajı ise, en saf CO₂ tüplerinin içeriğinde bile varolan %1-2'lik oksijenin, antioksidanlar gibi oksijene hassas bileşikler ile tepkimeye girip az miktarda da olsa bozunmalarına neden olmasıdır (Cocero, Gonzalez, Perez, Alonso, 2000).

4. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Literatür araştırması; Silymarin Bileşiklerinin Özütlenmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar, Bitkilerin Süperkritik şartlarda Özütlenmesi Uygulamaları ve *Silybum marianum* Bitkisinin Yapısında Bulunan Kimyasalların Analizi olarak üç kısımda derlenmiştir.

4.1. Geleneksel Yöntemlerle Silymarin Bileşiklerinin Özütlenmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Deve dikenini olarak bilinen *Silybum marianum*'un tohumlarında karaciğer kanseri başta olmak üzere pek çok hastalığa karşı tedavi edici ve hastalıklardan koruyucu etki gösteren flavolignan ve dihidroflavanol bileşikleri bulunmaktadır. Bunlar silymarin bileşikleri olarak bilinmektedir. Silibin, izosilibin, silykristin, silydianin önemli aktif flavolignanlardır. Silymarin bileşikleri arasında en aktif bileşen; literatürde silibinin, silybin gibi farklı isimlerle anılan silibindir. Genellikle deve dikeninin kuru tohumlarında bulunur (Agarwal ve diğerleri 2006).

Silymarin bileşiklerinin eldesi genellikle literatürde deve dikeninden organik bir çözücünün özütlenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Organik çözücü olarak genellikle etilasetat, petrol eteri, etanol, metanol ve asetonitril kullanılmaktadır (Corchete, 2008). *Silybum marianum* bitkisinden flavolignan tipi bileşiklerin özütlenmesine yönelik olarak literatürde gerçekleştirilen yayınlar aşağıda verilmektedir.

Endüstriyel anlamda silymarin bileşiklerinin üretimi için bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. *Silybum marianum* bitkisinin meyvesi ısıtılmadan yalnızca ezilerek içerisindeki yağın büyük bir kısmı uzaklaştırılır. Sıkıştırılan kütle ayrılır, sıkıştırma ile kalan artıklar da etil asetat ile alınır. Tüm numune etil asetat ile özütlenerek ortamda kalan çözücü buharlaştırılır (AbouZid, 2012).

Wallace ve Carrier (2003) flavolignan ve dihidroflavanol bileşiklerini içeren deve dikeninden silymarin bileşiklerinin ve taksifolinin özütlenmesini araştırmışlardır. Çözücü olarak etanol, metanol, asetonitril ve aseton kullanılmıştır. Organik çözücüler içerisinde maksimum verim etanol için sağlanmıştır. Etanol içindeki yağsız tohumda taksifolin,

silikristin, silidianin, silibinin A ve silibinin B'nin maksimum verimleri sırasıyla 0,6; 4,0; 0,4; 4,0 ve 7,0 mg/g yağsız tohum olarak bulunmuştur. Ancak etanolün zamanla bazı bozunmalara potansiyel oluşturduğu görülmüştür. Eğer silibin A diastereomeri incelenecekse, silibin A/silibin B oranı yüksek olması nedeniyle metanolün özütleme çözücüsü olarak seçilmesi anlamlıdır. Bununla birlikte yağın tohumdan uzaklaştırılması önemli bir işlemdir. Yağdan arındırılmış materyalde silymarin bileşikleri 2 kat verimle elde edilmiştir.

Barreto ve Carrier (2003) 50, 70, 85 ve 100 °C sıcaklıklardaki su ile deve dikeninden silymarin bileşiklerini özütlemeye çalışmışlardır. 100 °C 'de 210 dakikanın sonunda tohumdaki taksifolin ürünü 1,2 mg/g'dır. Bu değer yağı alınmış tohumun etanol ile soksile özütlemesinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak, tohumdaki silikristin silibin A ve silibin B verimleri sırasıyla 5,0; 1,8 ve 3,3 mg/g tohum olarak bulunmuştur.

Benthinin deve dikenini tohumunun özütlemesi üzerine gerçekleştirdiği çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. Öncelikle numune 4 saat boyunca petrol eteri ile özütleme yapılmıştır. İkinci aşamada ise 5 saat boyunca metanol ile özütleme gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem Deutsches Arzneibuch yöntemi olarak bilinir. Özütleme maksimum verimi olarak ise 11 mg silibin/g tohum elde edilmiştir (Barreto, Carrier, 2003).

Duan, Carrier, Clausen (2004) deve dikeninden silymarin bileşiklerinin özütlemesi için 100-140 °C aralığındaki sıcaklıklarda özütleme çözücüsü olarak sıcak su kullanılmıştır. Ortalama tane büyüklüğü 0,4 mm olacak şekilde deve dikenini tohumları kahve değirmeniyle öğütülmüştür. 0,5 g numune özütleme ünitesine yerleştirilmiştir. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen özütleme sonuçlarına göre sıcaklığın artışıyla doğrusal olarak bir artış gözlemlenmemiştir. Çünkü bu bileşiklerin bir kısmının sıcaklığın artmasıyla bozunduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bu bileşenler sıcaklık 100°C' den 140 °C'ye artırıldığında, özütleme süresi 200 dakikadan 55 dakikaya azalmaktadır. Ancak 100 °C'nin üzerine çıkıldıkça silymarin bileşiklerinin yavaş yavaş bozulmaya başladığı gözlemlenmiştir.

Quaglia, Bossù, Donati, Mazzanti ve Brandt (1999) yaptığı çalışmada *Silybum marianum* meyvesinden Silibin, izosilibin, silikristin, silidianin, taksifolin bileşiklerini ekstrakte etmişlerdir. Özütleme 4 saat boyunca petrol eteri ile soksile cihazında gerçekleştirilmiştir.

Özütleme sonucu elde edilen numune HPLC ile analiz edilmiştir. 5 g deve dikenini meyvesinden elde edilen silibin, silikristin, silidianin ve taksifolin miktarları 58; 33; 37,5 ve 16,5 mg olarak bulunmuştur.

Khan, Khattak ve Zahoor (2011) ise deve dikenini bitkisinin tohumlarının inorganik bileşiklerini alev fotometresi yardımıyla analizlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada tohumlar deiyonize su ile yıkanmış olup, 120 °C de bir gece bekletilmiştir. Tohum tozları 600 °C kül fırında bekletildikten sonra numuneler 100 mL deiyonize su içinde bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre deve dikenini tohumunda Na, K, Cl, Ca, HCO₃, NO₃, SO₄ inorganik yapılara rastlanmıştır.

Subramaniam, Vaughn, Carrier ve Clausen (2008) *Silybum marianum* bitkisinden Silibin A, silibin B, izosilibin A, izosilibin B, silikristin, silidianin, taksifolin gibi flavolignanları özütlemişlerdir. Özütleme yöntemi olarak soksile cihazından faydalanmışlardır. %1,2 NaOH, %1,5 H₂SO₄, %2 NaHCO₃ içerikli deiyonize su çözücüleri ön işlem için kullanılmıştır. 0,4 mm büyüklüğündeki öğütülmüş olan 8 g deve dikenini tohumu 24 saat boyunca bu çözücüler içinde bir çalkalayıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Bu çalışma incelendiğinde klasik özütleme öncesinde ağırlıkça %1,5 H₂SO₄ ile muamele edildiğinde flavolignan miktarının önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Silibin A, silibin B, silikristin ve silidianin miktarları 3,15; 4,43; 3,12 ve 19,12 mg/g tohum olarak bulunmuştur. Bu çalışma ile petrol eteri yerine daha az zararı olan bir çözücü kullanılması hedeflenmiştir. Ancak en yüksek verim %1,5 H₂SO₄ ilavesinde elde edilmiştir.

Xin, Xianzhe ve Chenghai (2008) yaptığı bir çalışmada ise mikrodalga yardımıyla deve dikeninden silymarin özütlemesinde en uygun koşullarda en yüksek verimi elde etmeyi araştırmışlardır. Yapılan çalışmada öncelikle tohumlar 12 saat boyunca kurutulmuş, ardından bir öğütücü yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz numune 40 mesh'lik elekten geçirildikten sonra petrol eteri ile 60-90 °C yıkanarak yağ ortamdaki alınmıştır. Kalan kısım iyice kurutulduktan sonra etanol ile seyreltilip 10 dakikadan boyunca mikrodalga cihazı ile mikrodalga uygulanmıştır. Bu çalışmada optimum koşullar özütleme süresi 50 dakika, sıcaklığı 130 °C, etanol derişimi %85 olarak bulunmuştur. Bu koşullarda özütleme verimi klasik yöntemle göre 3 kat artarak 59,33 mg/g olarak bulunmuştur

Deve dikenini olarak bilenen *Silybum marianum* bitkisi; bitkisel ilaçların en eskisi olmasına karşın içerisindeki yararlı bileşiklerin (özellikle silymarin bileşikleri) alınması literatürde çoğunlukla klasik özütlenme olarak geçmektedir. Oysa petrol eteri, etil asetat vb. gibi çözücüler hem çevreye zarar vermekte hem de elde edilen özütten tamamıyla uzaklaştırılmamaktadır. Bu sebeple özütlenme veriminin yüksek olduğu ve çözücü etkisinin çevreye ve elde edilen ürüne zararının en az olduğu yöntemler dikkate alındığında karşımıza süperkritik CO₂ özütlenmesi yöntemi çıkmaktadır.

4.2. Süperkritik Özütlenmesi Uygulamaları

Son yıllarda endüstriyel öneme sahip doğal ürünlerin ayırma ve saflaştırma süreçlerinin incelenmesi yoğun araştırma konuları arasındadır. Doğal ve sentetik yöntemler ile üretilen birçok kimyasal ve biyokimyasal endüstriyel ürünler klasik ayırma yöntemleriyle kolay bozunabilmeleri nedeniyle süperkritik akışkan özütlenmesi alternatif bir ayırma prosesidir. Özütlenme yöntemlerinden biri olan süperkritik akışkan özütlenmesi gıda, biyokimya, ilaç ve kozmetik endüstrilerinin ilgi odağı haline gelmiştir (Herrero, Cifuentes, Ibaniez, 2006, Reverhon, De Marco 2006).

Bu bölümde çeşitli bitki, tohum, yaprak ve çiçek gibi doğal materyallerin süperkritik akışkan ile özütlenme uygulamaları verilmiştir. Çalışma deneysel ve deneysel tasarım olmak üzere iki sınıfta verilmiştir.

Bocevskaja ve Sovov'a (2007) civanperçemi çiçeğinden süperkritik CO₂ ile esansiyel yağları eldesi üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Deneyler 10 MPa basınç ve 40–60 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Özütü oluşturan önemli esansiyel yağlar %26,4 kamfor, %9,6 1,8-kineol, %16,7 bornil asetat %9,0 terpinen ve %7,6 terpinolen olarak bulunmuştur.

Uquiche, Huerta, Sandoval ve Valle, boldo yapraklarından süperkritik CO₂ ile esansiyel yağların eldesi üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Boldo Şili'nin kıyı kesimlerine özgü bir bitki türüdür. Yapraklarında esansiyel yağlar, alkaloidler ve flavonoidler bulunur. Başta Latin Amerika'da olmak üzere, defne yaprağına benzer bir şekilde çeşitli yemeklerde kullanılmaktadır. Deneyler ve 40 °C sıcaklıkta ve 10 MPa basınç altında

gerçekleştirilmiştir. Düşük sıcaklık ve hızlı sıkıştırmanın esansiyel yağların verimi üzerine çok fazla etki ettiği sonucuna varmışlardır.

Çoban Sarımsağının (Tiger nuts, Topalak, Kökü fındığa benzer üst kısmı yeşil bir bitki türü) süperkritik CO₂ ile esansiyel yağların eldesi üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. 40-80 °C sıcaklık, 20-40 MPa basınç ve 60-360 dakika boyunca özütleme süresinin yağ verimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En yüksek yağ verimi 210 dakika özütleme süresinde, 30,25 MPa basınç ve 60 °C sıcaklıkta 260 mg/g olarak bulunmuştur (Lasekan ve Abdulkarim 2012).

İçen ve Gürü (2010) çay sapı ve lifi atıklarından süperkritik CO₂ ile özütlemesi sonucu kafein elde etmişlerdir. Süperkritik CO₂ özütlemesine %5'lik etanol ilavesiyle özütleme süresinin 7 saat' den 2 saate kısalmıştır. Çay sapı ve lifi atıklarından maksimum kafein verimi 14,95 mg/g çay sapı atığı ve 18,92 mg/g çay lifi atığı olarak bulunmuştur.

Porto, Voinovich ve Decorti (2012) kenevir tohumu yağının süperkritik CO₂ ile özütlemesini çalışmışlardır. Deneyler 40, 50 ve 60 °C sıcaklıkta, 250, 300 ve 350 bar basınçta, 0,59; 0,71 ve 0,83 mm tanecik büyüklüğünde gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar 40 °C, 300 bar ve 0,71 mm olarak bulunmuştur. Bu koşullardaki maksimum yağ verimi %21,50 olarak bulunmuştur.

Rebolleda, Rubio, Beltrán, Sanz, Luisa ve Sanjosé, (2012) yaptığı çalışmada mısır tohumu yağının süperkritik CO₂ ile özütlemesine sıcaklık, basınç CO₂ akış hızı parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Deney koşulları 20,0–53,0 MPa, 35–86 °C ve 4–9 kg CO₂/h aralığında gerçekleştirilmiştir. Klasik özütleme ile karşılaştırıldığında, mısır tohumu yağının düşük asitlik sayısına sahip olduğu iyi kalitede elde edildiği ve yüksek antioksidant kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

Kanola yağının lipaz katalizli süperkritik CO₂ ile serbet yağ asitlerinin özütlemesi/reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Katalizör olarak tutuklanmış lipaz enzimi olan *Mucor miehei* kullanılmıştır. Proses 24 MPa basınçta ve 35 °C 'de gerçekleştirilmiştir. Proses için CO₂ akış hızı ve enzim miktarının ürün verimine etkisi incelenmiştir. Süperkritik özütleme/süperkritik reaksiyon sistemi oluşturulmaya çalışılmıştır. Reaksiyon ve özütleme

sistemlerinin birleştirilmesiyle gıda, kozmetik, farmostatik, deterjan gibi alanlarda kullanılan gliserol, triglisrit vb. bileşiklerin verimi artmıştır (Rezaei, F. Temelli, 2001).

Bu çalışmada Salgın (2007) jojoba tohumunun süperkritik CO₂ ve süperkritik CO₂+etanol çözücüsü kullanılarak özütlemesini gerçekleştirmişlerdir. Deneyler 25, 35 ve 45 MPa basınçta, 343 ve 363 K sıcaklıkta, $3,33 \times 10^{-8}$; $6,67 \times 10^{-8}$ ve $13,33 \times 10^{-8}$ m³s⁻¹ akış hızında, $4,1 \times 10^{-4}$, $6,1 \times 10^{-4}$, $8,6 \times 10^{-4}$ ve $1,2 \times 10^{-3}$ m tanecik büyüklüğünde, %2, 4 ve 8 etanol çözücüsü varlığında gerçekleştirilmiştir. Yüksek basınçta ve minimum etanol çözücüsü varlığına özütleme verimi artmış ve 30-60 dakika aralığında jojoba yağının özütlemesi tamamlanmıştır.

Bu çalışmada Uribe, Perez, Kauil, Rubio ve Alcocer, (2011) chia tohumundan süperkritik CO₂ ile yağ özütlemesini çalışmışlardır (Chia bitkisi Meksika'da Aztek Hintlileri tarafından 1492 öncesinde gıda, ilaç ve boya olarak kullanılmaktadır). Chia tohumu yağı doymamış yağ asitlerini özellikle omega-3 linolenik asit (%54–67) ve omega-6 linoleik asitlerini (%12–21) içermektedir. Deneyler 136, 272, 408 bar basınçta ve 40, 60, 80 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. 408 bar basınçta ve 80 °C sıcaklıkta maksimum verim %7,18 olarak bulunmuştur. Verime basıncın etkisi sıcaklıktan daha fazla olduğu görülmüştür.

Xu, Dong, Mu ve Sun (2011) nilüfer çiçeği arı poleninden süperkritik CO₂ ile yağ, karotenoid, skualen ve steroller (kampesterol, stigmasterol, β-sitosterol ve β-amyrin) özütlemesi üzerine çalışmışlardır. Maksimum miktarda karotenoid, skualen ve steroller içeren özüt verimi 38,2 MPa basınçta ve 49,7 °C sıcaklıkta bulunmuştur. GC-FID analizinde ise yağ bileşimi analiz yapılmış, toplam yağ asitlerinin yaklaşık olarak %22 doymamış yağ asitlerini içerdiği görülmüştür.

Berna, Taarrega, Blasco ve Subirats (2000) portakal kabuğunun süperkritik CO₂ ile esansiyel yağların eldesi üzerinde çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Susuz portakal kabuğuna sahip Satsuma ve naveline çeşitleri kullanılmıştır. Çözücünün hızı artıkça özütleme hızına etkisi artmıştır.

U. Salgın, S. Salgın (2013) *Pinus pinea L.* bitkisinden (Kozalak çamı fıstığı(KÇF)) süperkritik CO₂ ve süperkritik CO₂+etanol çözücüsü kullanılarak özütlemesini gerçekleştirmişlerdir. 20-50 MPa basınç, 40-60 °C sıcaklık, 0,061-0,259 kg h⁻¹ CO₂ akış

hızında, 362,5 ve 725 µm partikül büyüklüğü, %2,5 ve 5 etanol çözücüsü parametrelerinin özüt verimine etkisi incelenmiştir. Yüksek basınçta ve minimum etanol çözücüsü varlığına özütleme verimi artmış ve 30-60 dakika aralığında jojoba yağının özütlenmesi tamamlanmıştır. Deney sonuçları 30 MPa basınçta elde edilen özütleme veriminin organik çözücü özütlemesinden daha iyi olduğunu göstermiştir ve bu koşullarda elde edilen özütleme verimi 0,477-0,488 g KÇF yağı/g kuru KÇF olarak bulmuşlardır. %5'lik etanol çözücü ile süperkritik CO₂ birlikte 30 MPa, 40 °C ve 0,194 kg⁻¹ çözücü akış hızında ise 90 min sonunda 0,472 g KÇF yağı/g kuru KÇF olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada Yang, Wei ve Hong, (2014) ultrasound süperkritik CO₂ karanfil tomurcuklarından yağ eldesini ve yağ içerisindeki öjenol, β-karyofilen (caryophyllene), öjenil asetat ve α-humulen miktarını araştırmışlardır. 30, 40, 50 °C sıcaklık ve 10, 15, 20 MPa basınç altında deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda süperkritik CO₂ ile süperkritik CO₂+ultrasound sonuçları kıyaslandığında yağın verimi %13,5 oranında artmıştır.

Maki kaktüsü (*Nitraria tangutorum*) tohumunun süperkritik CO₂ ile yağ eldesini çalışmışlardır. Süperkritik CO₂ ile tohumun özütleme verimi %12,92'dir ve bu değer klasik çözücü özütlemesi yöntemi ile elde edilen değerden daha fazladır. Gaz kromatografi sonuçlarına göre özüt %97 doymamış yağ asitlerini içermektedir (Liu, Mei, Wang, Shao, Tao, 2014).

Karabiberin süperkritik CO₂ ile esansiyel yağların eldesini çalışmışlardır. Deney koşulları 15-30 MPa basınç, 40-50 °C sıcaklık ve 40-80 dakika aralığı özütleme süresi olarak belirlenmiştir. Esansiyel yağların analiz GC-MS ve GC-FID kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karabiber özütü içerisindeki önemli bileşenlerin derişimi %3'den büyüktür. β-karyofilen %24,34; limonen %15,84; sabinen %15,04; 3-karen %9,44; β-pinen %9,27 ve kopaen %4,52 olarak bulmuşlardır (Bagheri, Manap, Solati, 2014).

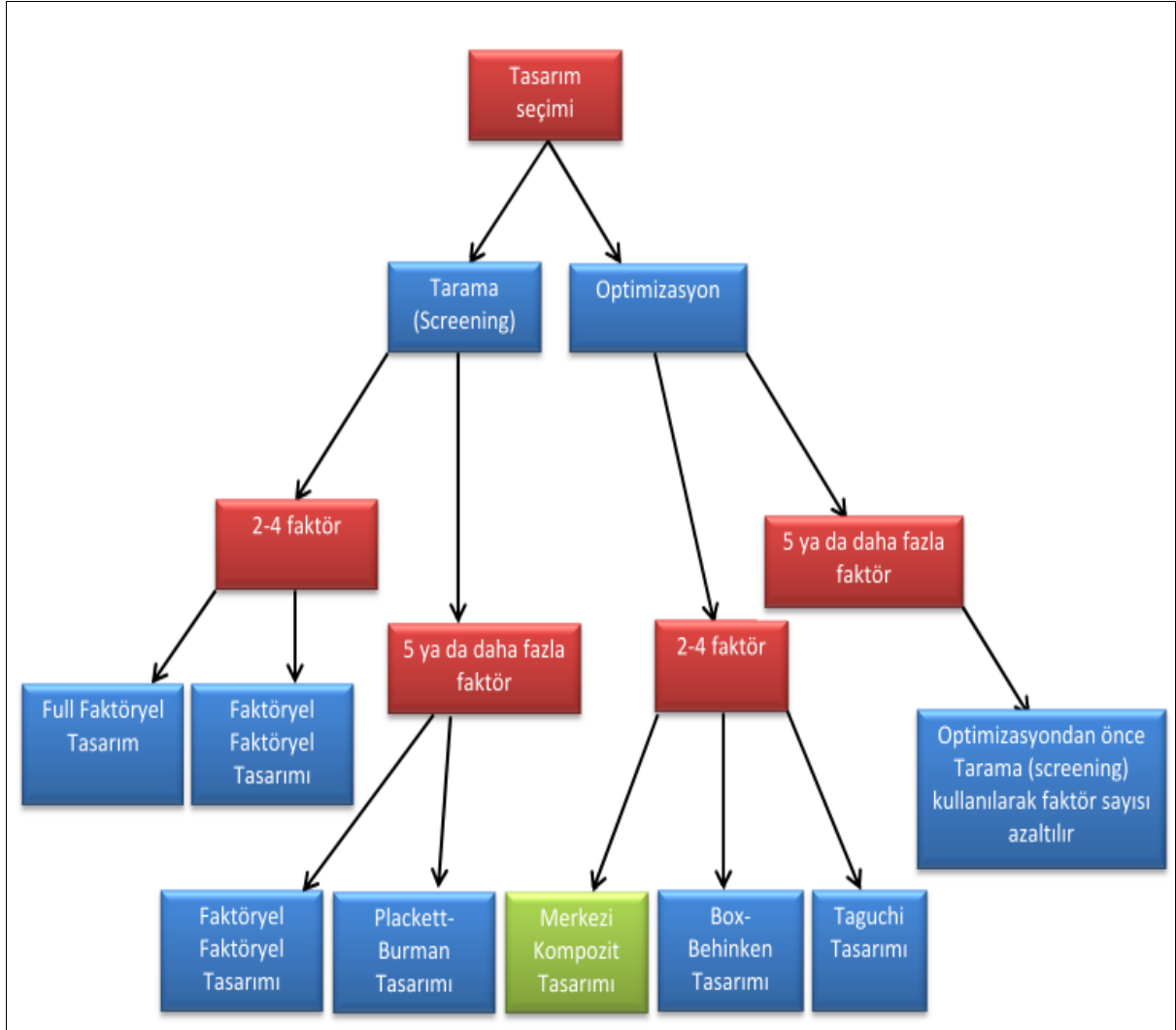
Kha, Phan-Tai, Nguyen (2014), Gac yağının süperkritik CO₂ özütlemesini ve yağ içerisindeki karotenoid miktarının belirlenmesi üzerine çalışmışlardır. Bu amaçla özütleme öncesi sıcak hava ile kurutma, tanecik büyüklüğü ve ön enzimatik muamelenin özütleme verimine etkisini araştırmışlardır. En yüksek yağ verimini %0,1 (m/m) enzim derişiminde elde etmişlerdir. 50 °C ön kurutmada ve 0,45 mm tanecik büyüklüğünde ön işlemler

gerçekleştirilmiş, 200 bar basınç ve 50 °C sıcaklıkta süperkritik CO₂ özütlemesi deneyi gerçekleştirildiğinde özütleme verimi % 34 g/g; β-karoten 83 mg/100 mL yağ; ve likopen 508 mg/100 mL yağ olarak elde edilmiştir.

Durante, Lenucci, D'Amico, Piro, Mita (2014) balkabağından (*Cucurbita moschata* Duch.) süperkritik karbon dioksit ile E vitamini ve karotenoid üretimi üzerine çalışmışlardır. Vakum altında kurutulduğunda (%8 nem uzaklaştırıldığında) özüt içerisindeki toplam E vitamini ve karotenoid miktarı; dondurarak kurutma ve öğütme (70 mesh) yöntemi ile karşılaştırıldığında, sırasıyla 12 ve 8,5 kat artmıştır. İkinci defa öğütüldüğünde (35 mesh) karotenoid verimi 1,6 kat artmıştır. Ayrıca özüt içerisindeki E vitamini (274 mg/100 g yağ) ve doymamış yağ asidi miktarı artmıştır.

Bu kısım kadar çeşitli doğal maddelerden süperkritik akışkan ile değerli kimyasalların deneysel olarak eldesinden bahsedilmiştir. Bundan sonra ise süperkritik akışkan özütlemesi çalışmalarının deneysel tasarım uygulamalarından bahsedilecektir.

Pratik olarak süperkritik akışkan özütlemesi çalışmalarında temel iki duruma göre uygulanacak deneysel tasarımın seçimine karar verilir. Birinci durum özütlemeyi kontrol eden ana faktörlerin belirlenmesi, ikinci durum ise baskın parametrelerin en uygun değerlerinin belirlenmesi şeklindedir. Şekil 4.1'de deneysel tasarımın seçimine yönelik bir algoritma mevcuttur. Amaç belirlendikten sonra ilgili faktörler ve deneysel tasarım yöntemi seçilir. Uygun tasarım programlarında belirlenen faktörler girilir. Programın sunduğu deneysel yol izi belirlenir. Belirtilen koşullardaki deneyler yapıldıktan sonra elde edilen veriler bu programa işlenir ve deneysel sonuçlar doğrultusunda "ANOVA" testine göre model fit edilir (Sharif, Rahman, Azmir, Mohamed, Jahurul, Sahena, Zaidul, 2014).



Şekil 4.1. Deneysel tasarım için uygulanacak akım şeması (Sharif ve diğerleri, 2014).

Yüzey Cevap Yöntemi ile basit empirik modeller kullanarak prosesler modellenebilmektedir. Sadece optimizasyon amaçlı değil, işletme parametrelerinin ayrı ayrı ve birbirleriyle etkileşimlerinin yanıt fonksiyonları üzerine etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Prosesin işletme parametrelerindeki değişime verdiği yanıt en az sayıda deneme yapılarak en iyi şekilde tanımlanabilmektedir. Çok farklı proseslerde başarıyla uygulanabilmesi ve çok fazla yanıt dikkate alınarak optimum noktanın belirlenmesine olanak sağlaması, Yüzey Cevap Yönteminin diğer optimizasyon yöntemleri arasından öne çıkmasının en önemli nedenleri arasındadır.

Çizelge 4.1’de çeşitli doğal maddelerin süperkritik akışkan özütlemesi için kullanılan full faktöriyel tasarım, faktöriyel faktöriyel tasarım, Taguchi tasarımı, merkezi kompozit tasarımı, Box–Behnken tasarımı deneysel tasarım uygulamalarına örnekler verilmiştir.

Çizelge 4.1. Süperkritik Akışkan Özütlemesi İçin Deneysel Tasarım Uygulamaları (T: Sıcaklık; P: Basınç, t: Özütleme Süresi, v/v: İkinci Çözücü hacim oranı)

Deneysel Tasarımın Adı	Özütlenen Materyal	Özütlenen Bileşikler	Parametre ve Faktör sayısı	Yayın
Full Faktöriyel Tasarım	Venezuela Biberiyesi yaprağı	Antioksidan bileşikler (Karnosol ve karnosik asit)	3 faktör (T, P, t)	Caldera ve ark. (2012)
Full Faktöriyel Tasarım	Hodan (Borago officinalis L.) çiçeği	Yağ Asitleri	4 faktör (T, P, v/v, t)	Ramandi ve ark. (2011)
Full Faktöriyel Tasarım	Ay çiçeği	Biyoaktif Bileşikler	4 faktör (materyale ön işlem, T, P, v/v)	Casas ve ark. (2007)
Full Faktöriyel Tasarım	Zeytin Yaprığı	Vaks, hidrokarbonlar, skualen, b-Karoten, trigliseridler, a-tokoferol, b-sitosterol, ve alkoller	3 faktör (T, P, v/v)	Tabera ve ark. (2004)
Full Faktöriyel Tasarım	Ökalyptüs Ağacı	Lipit	3 faktör (T, P, v/v)	González-Vila ve ark. (2000)
Faktöriyel Faktöriyel Tasarım	Kanola kabuğu	Yağ ve küçük lipitler	3 faktör (T, P, t)	Uquiche ve ark. (2012)
Faktöriyel Faktöriyel Tasarım	Diplotaenia cachrydifolia	Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, v/v, t)	Khajeh (2012)
Faktöriyel Faktöriyel Tasarım	Yabani kekik (Zater)	Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, v/v, t)	Khajeh (2011)
Taguchi Tasarımı	Karanfil (Eugenia caryophyllata Thunb.) Karanfil Tomurcuğu	Esansiyel Yağlar öjenol	3 faktör (P, T, partikül boyutu)	Guan ve ark. (2007)
Taguchi Tasarımı	Marchantia convoluta	Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, v/v, t)	Xiao ve ark. (2007)

Çizelge 4.1.(Devam) Süperkritik Akışkan Özütlemesi İçin Deneysel Tasarım Uygulamaları
(T: Sıcaklık; P: Basınç, t: Özütleme Süresi, v/v: İkinci Çözücü hacim oranı)

Deneysel Tasarımın Adı	Özütlenen Materyal	Özütlenen Bileşikler	Parametre ve Faktör sayısı	Yayın
Taguchi Tasarımı	Nar (<i>Punica granatum L.</i>) kabuğu	Toplam Fenolikler	4 faktör (P, T, v/v, t)	Yasoubi ve diğerleri (2007)
Taguchi Tasarımı	<i>Stellera chamaejasme L.</i>	Dafnoretin, 7-metoksy-dafnoretin 1,5-difenil-1-pentanon	4 faktör (P, T, v/v, partikül büyüklüğü)	Peng ve diğerleri (2006)
Taguchi Tasarımı	Kore göknarı	Esansiyel Yağlar	3 faktör (P, T, t)	Kim ve diğerleri (2006)
Taguchi Tasarımı	Çay Tohumu	Tohum Yağı	4 faktör (P, T, v/v, t)	Rajaei ve diğerleri (2005)
Taguchi Tasarımı	Şerbetçi Otu (<i>Humulus lupulus L.</i>)	Flavonoidler	4 faktör (P, T, etanol derişimi, materyal/çözücü oranı)	Guo-qing ve diğerleri (2005)
Taguchi Tasarımı	Yarpuz (<i>Mentha pulegium L.</i>)	Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, v/v, t)	Aghel ve diğerleri (2004)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Afrika Kedibalgı iç yağı (<i>Clarias gariepinus</i>)	Balık Yağı	4 faktör (P, T, Akış Hızı, t)	Sarker ve diğerleri (2012)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Keten Tohumu	Toplam yağ	3 faktör (v/v, P, t)	Ivanov ve diğerleri (2012)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Mersin ağacı (<i>Myrtus communis L.</i>) yaprağı	Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, v/v, t)	Ghasemi ve diğerleri (2011)
Merkezi Kompozit Tasarımı	<i>Cyperus rotundus Linn.</i>	Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, t, CO ₂ akış hızı)	Wang ve diğerleri (2012)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Pasiflora tohumu	Tohum yağı	3 faktör (P, T, t)	Zahedi ve Azarpour (2011)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Hodan Yaprığı (<i>Borago officinalisL.</i>)	Yağ asitleri ve Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, v/v, t)	Ramandi ve diğerleri (2011)

Çizelge 4.1.(Devam) Süperkritik Akışkan Özütlemesi İçin Deneysel Tasarım Uygulamaları
(T: Sıcaklık; P: Basınç, t: Özütleme Süresi, v/v: İkinci Çözücü hacim oranı)

Deneysel Tasarımın Adı	Özütlenen Materyal	Özütlenen Bileşikler	Parametre ve Faktör sayısı	Yayın
Merkezi Kompozit Tasarımı	Bamya çiçeği tohumu	Fitosterol	3 faktör (P, T, CO ₂ akış hızı)	Nyam ve diğerleri (2010)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Anastatica (Küçük gri renkli çöl bitkisi) (Anastatica hierochuntica)	Polar olmayan bileşikler	2 faktör (P, T)	Nik Norulaini ve diğerleri (2009a)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Buğday Tohumu	Antioksidanlar	3 faktör (P, T, t)	Gelmez ve diğerleri (2009)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Domates kabuğu	Likopen	3 faktör (P, T, v/v)	Kassama ve diğerleri (2008)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Domates salçası	Likopen	5 Faktör (Çözücü/etli kısım oranı, özütleme sayısı, T, t, tanecik büyüklüğü)	Kaur ve diğerleri (2008)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Kırmızı biber (Capsicum frutescens L.)	Oleoresinler	2 faktör (P, CO ₂ akış hızı)	Duarte ve diğerleri (2004)
Merkezi Kompozit Tasarımı	Buğday Tohumu	Doğal E vitamini	3 faktör (P, T, CO ₂ akış hızı)	Ge ve diğerleri (2002)
Box–Behnken Tasarımı	Mangosteen (Güney Asya kökenli ultra tropikal bir meyve) meyvesi kabuğu (Garcinia mangostana L)	Ksantonlar	3 faktör (P, T, t)	Zarena ve diğerleri (2012)
Box–Behnken Tasarımı	Kolza Tohumu	Yağ	3 faktör (P, T, t)	Cvjetko ve diğerleri (2012)
Box–Behnken Tasarımı	Diplotaenia cachrydifolia	Esansiyel Yağlar	4 faktör (P, T, v/v, t)	Khajeh (2012)
Box–Behnken Tasarımı	BiberiyeYaprağı	Antioksidan bileşikler	3 faktör (P, T, t)	Caldera ve diğerleri (2012)
Box–Behnken Tasarımı	Mısır Püskülü	Flavonoidler	3 faktör (P, T, kosolvent miktarı)	Liu ve diğerleri (2011)

Çizelge 4.1.(Devam) Süperkritik Akışkan Özütlemesi İçin Deneysel Tasarım Uygulamaları
(T: Sıcaklık; P: Basınç, t: Özütleme Süresi, v/v: İkinci Çözücü hacim oranı)

Deneysel Tasarımın Adı	Özütlenen Materyal	Özütlenen Bileşikler	Parametre ve Faktör sayısı	Yayın
Box–Behnken Tasarımı	Herba Moslae	Esansiyel Yağlar	3 faktör (P, T, t)	Nie ve diğerleri (2010)
Box–Behnken Tasarımı	Zingiber zerumbet (L)	Polar olmayan bileşikler	3 faktör (P, T, CO ₂ akış hızı)	Nik Norulaini ve diğerleri (2009b)
Box–Behnken Tasarımı	Domates Kabuğu	Likopen	3 faktör (P, T, t)	Yi ve diğerleri (2009)
Box–Behnken Tasarımı	Japon sarmaşığı	Flavonoidler	3 faktör (P, T, kosolvent miktarı)	Wang ve diğerleri (2008)
Box–Behnken Tasarımı	Üzüm (Citrus paradisi Macf.) çekirdeği	Limonoidler ve narinjin	3 faktör (P, T, t ya da % kosolvent)	Yu ve diğerleri (2007)
Box–Behnken Tasarımı	Spirulina platensis (Bir tür yosun)	Antioksidanlar	3 faktör (P, T, t)	Wang ve diğerleri (2007)
Box–Behnken Tasarımı	Hint yağı	Yağ asidi bileşikleri	4 faktör (P, T, metanol ve su derişimi)	Turner ve diğerleri (2004)
Box–Behnken Tasarımı	Zahter (Kekik çeşidi) Thymbra spicata	Aroma bileşikleri	3 faktör (P, T, t)	Sonsuzer ve diğerleri (2004)

Merkezi kompozit tasarımı Box ve Wilson tarafından geliştirilmiştir. Bu tasarım ile lineer ve kuadratik modeller oluşturulmaktadır. Merkezi kompozit tasarımı; $N=k^2+2k+cp$ göre deney sayısı belirlenir. Burada cp merkez noktasının tekrar sayısı ve k faktör sayısıdır. Merkezi kompozit tasarımı özütleme sürecinde deneysel parametrelerin koşullarının optimizasyonunu belirlemekte yaygın olarak uygulanmaktadır (Sharif ve diğerleri, 2014).

4.3. *Silybum marianum* Bitkisinin Yapısında Bulunan Kimyasalların Analizi

Silymarin bileşikleri trans diastreoizomerlerden oluşmaktadır. Bu diastreoizomerlerin gerek ¹H NMR gerekse ¹³C NMR spektrumları benzerdir ve bunların ayrı ayrı belirlenmesinde karakteristik bir sinyal vermezler. Bu bileşiklerin genel iskeleti C₂₅H₂₂O₁₀ ve molekül ağırlığı 482 g/mol'dür (AbouZid, 2012). *Silybum marianum* bitkisinin

yapısında bulunan flavolignanlar klasik olarak ince tabaka kromatografisi ve spektrometrik cihazlar yardımıyla yapılmaktadır. Ayırma ve flavolignanların her birinin ayrı ayrı analizi ise yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ile sağlanmaktadır. Taşıyıcı faz olarak genellikle asetronitril, metanol, asetik asit veya fosforik asit ile tamponlanmış su kullanılmaktadır. Diğer yöntemler HPLC-UV, sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi veya negatif elektrosprey kütle spektroskopisi olarak sıralanabilir. Silymarin içeren flavolignan bileşiklerinin kantitatif analizi için önerilen yöntemlerin avantajları ve dezavantajları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

4.3.1. İnce tabaka kromatografi analizi

Flavonolignanların kantitatif olarak İnce Tabaka Kromatografi ile analizi Wagner ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Çözücü sistem olarak kloroform-aseton-formik asit (75:16,5:8,5) kullanılmıştır. Silymarin UV-365 nm dalga boyunda 2 floresan bölgede analiz edilmiştir. Yeşil-mavi bölgede silibin/izosilibin ($R_f=0,6$), silikristin ($R_f=0,35$) ve turuncu bölgede taksifolin ($R_f=0,4$) olarak bulunmuştur (AbouZid, 2012).

4.3.2. UV-Vis spektrometri analizi

Abouzid (2012) yaptığı çalışmada flavolignanların kantitatif analizinin yapılması için UV-Vis Spektrometri cihazını önermiştir. Ancak bu yöntem tekrarlanabilirlik problemi göstermektedir ve tek tek bileşiklerin miktarı yerine toplam flavonolignan miktarını ölçmektedir. Bu yöntem, pH 7’de potasyum permanganat ile oksidasyonuna dayanmaktadır. Bu reaksiyonun 530 nm’de azalan absorbans değerlerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle toplam flavonolignan miktarı bulunmaktadır (AbouZid, 2012).

Stoiljkovic, Petrovic, Ilic, (2007) yaptığı çalışmada ise silymarin bileşiklerinin UV-Vis Spektrometre cihazı ile analizlemişlerdir. Özüt içerisindeki Silymarin bileşiklerinin miktarını % silibin cinsinden bulmuşlardır. Yöntemde silymarin bileşikleri 2,4 DNP ile türevlendirme yapılmıştır. Çözeltinin 490 nm’de absorpsiyonları UV-Vis spektrometresi (Analyticjena Specort 200 Spectroformeter) ile ölçülmüştür.

4.3.3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi analizi

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) silymarinin analizinde yöntem olarak önerilmiştir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi analizinde kolonlarda ayrılma gerçekleştirildiğinden, kolonun boyu, çapı vb. gibi özellikleri büyük önem taşımaktadır. Analizlenecek silymarın bileşiklerinin tanımlanabilmeleri için kullanılan dedektörler de oldukça önem teşkil etmektedir.

Silibinin analitik olarak belirlenmesinde ve özütleme sonrası çalışmalarda, özütün HPLC analizi ile ilgili çalışma koşulları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. HPLC analizinin çoğunlukla benzer koşullarda (C18 kolon ile ve UV-VIS veya Fotodiyot array dedektör) yapıldığı görülmektedir. Çizelge 4.2’de verilen literatürlerden bazılarına ait HPLC kromatogramları ise EK-2’de verilmiştir. Bu çalışmaların haricinde literatürde bulunan silibin analizine yönelik diğer çalışmalarda aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.2. HPLC analizi ile ilgili çalışma koşulları

Yazar ve Yılı	Kolon Tipi	Kolon Boyutu	Taşıyıcı Faz	Dedektör ve Dalga Boyu
Kvasnicka, F., ve diğerleri (2003) Lee ve diğerleri(2006)	Purospher RP18	150x 4 mm, 5 µm	Fosforik asit-metanol-su:0,5:46:64 izokratik Akış hızı: 1 ml / min	UV-VIS 288 nm
Sigma-aldrich	Ascentis Express C18	100 mm x 3.0 mm, 2,7 µm	Açözücüsü: % 0.1 Formik asitli su (hacimce) B:metanol Gradient akış. 3 min 35% B 35- 45% B 'e 10 min, 2 min 45% B ; Akış hızı: 0.6 mL/min Basınç: 283 bar Kolon Sıcaklığı: 35 °C: injection: 20 µL	UV-VIS 254 nm
Radjabian ve diğerleri (2008), Liu ve diğerleri (2012)	Nucleosil C18	150 × 4,6 mm, 5 µm	Methanol-su:50:50 (v/v). izokratik akış hızı: 1 mL/min	288 nm
Ding ve diğerleri (2001)	Shim pack VP-ODS	150 × 4.6 mm, 5 µm ve Ön kolon 100 × 4.6 mm, 5 µm	A çözücüsü: Metanol B çözücüsü:%10 dioksan+su Gradient akış Akış hızı.1,5 ml/min Kolon T:40 °C	UV dedektör 288 nm

Lee ve arkadaşları silibin A, silibin B, izosilibin A ve izosilibin B'nin moleküler yapısını ve streokimyasını incelemişlerdir. İki çift diastereizomerik flavolignan olan silibin A ve silibin B, izosilibin A ve izosilibin B' yi ardışık silika jel kromatografi ters faz HPLC ve elektroferez yöntemiyle *Silybum marianum* bitkisinden ayırmışlardır.

Bir başka çalışmada ters faz sıvı kromatografi ve sıvı faz kütle spektrometresiyle silymarın bileşikleri olan silibin ve izosilibin 2 ayrı diastereomer şeklinde ayırmayı başarmışlardır. Bu çalışmada taşıyıcı faz ve çözücü karışımı (su:dioksan=9.1) gradient olarak akış hızı:1,5 ml/min kolon sıcaklığı 40 °C dedektör dalga boyu 288 nm 'de silikristin için %99,66; silidianin için %99,48; silibin için %100 izosilibin için % 98,72 olarak bulmuşlardır.

Quaglia M., ve diğeri, yaptığı çalışmada *Silybum marianum* meyvesinden Silibin, izosilibin, silikristin, silidianin, taksifolin bileşiklerinin analiz için Purospher C18 (250*4mm ID 5 mikron) ve Lichrosphere C8 (250 mm* 4mm I.D. 5 mikron) olmak üzere iki adet kolon kullanılmıştır. Çözücü olarak su: asetonitril: metanol kullanılmıştır. Taşıyıcı fazın akış hızı 1ml/min ve kullanılan fotodiyot dedektörün dalga boyu 289 nm'dir.

Subramaniam ve arkadaşları *Silybum marianum* bitkisinden Silibin A, silibin B, izosilibin A, izosilibin B, silikristin, silydianin, taksifolin gibi flavolignanları özütlemişlerdir. Elde edilen numune Symmetry (Waters, Milford, MA, USA) C18 ön kolon ve C18 (150*4,6mm; 5 µm) kolon kullanılarak 40 °C'de HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Dedektör olarak fotodiyot dedektör kullanılmış olup 290 nm dalga boyunda analiz gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı faz olarak Su/metanol gradient sistemi (akış hızı:0,75 mL/min) kullanılmıştır.

4.3.4. Kapiler elektroforez analizi

Kapiler elektroforez; silymarin bileşenlerinin tayini için bir yöntem olarak ileri sürülmüştür (Kvasnička ve diğeri, 2003). Bu yöntem HPLC yöntemi ile karşılaştırılmış ve sonuçların benzer olduğu ifade edilmiştir. Örnek bileşenlerinden silidianin ve silikristinin daha iyi çözünürlüğü sağlanmıştır. Yüksek Performans Kapiler Elektroforez (HPCE) pH 9'da borat tamponu çözeltisi kullanılarak *Silybum marianum* özütünde silymarin belirlenmesi için kullanılmıştır.

4.3.5. Ultra performanslı sıvı kromatografi analizi

Ultra Basınçlı Sıvı Kromatografi (UPLC) silymarin bileşenleri gibi çok bileşenli analitlerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Analiz süresi kısa, maddelerin ayırım çözünürlüğü ve hassasiyeti yüksektir. Ancak pahalı bir yöntem olup, ayrıca saflaştırma basamaklarına ihtiyaç vardır.

Çizelge 4.3. Silymarin içeren flavolignan bileşiklerinin kantitatif analizi için önerilen yöntemlerin avantajları ve dezavantajları

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Spektrometrik	Hızlı, basit ve duyarlı	Tek tek flavolignanları miktarı belirlenmemektedir.
HPLC	Kesin Tek tek flavolignanları miktarı belirlenmektedir. Pikler belirlenebilmektedir. Saflık kontrolü yapılabilir	Analizi yapılacak numunenin standartlarına ihtiyaç vardır. Zaman almaktadır.
HPCE	Analiz süresi kısa Çözücü tüketimi az	Saflaştırma basamakları gerekmektedir.
UPLC	Kısa analiz süresi Yüksek çözünürlük	Pahalıdır Saflaştırma basamakları gerekmektedir. Kalibrasyon eğrisine ihtiyaç vardır.

Çizelge 4.3’de silibin analizlerine yönelik yapılan çalışmalar kıyaslanmıştır. Doktora tezi kapsamında spektrometrik ve HPLC analiz yöntemi yapılmıştır.

5. MATERİYAL VE METOT

Bu bölümde deneysel ve teorik olmak üzere gerçekleştirilen çalışma beş temel aşamadan oluşmaktadır. Bu amaçla izlenen yol (Şekil 5.1) ve gerçekleştirilen çalışmaların detayları aşağıda sunulmaktadır.

5.1. Materyal

Süperkritik CO₂ ile deve dikenini tohumundan silibin A ve silibin B bileşiklerinin özütlemesi çalışmasında kullanılan CO₂ analitik saflıkta olup Oksan firmasından temin edildi.

Analizlerde kullanılan 2,4 Dinitrofenilhidrazin (2,4 DNPH), %98'lik Sülfürik asit, % 99 metanol, potasyum hidroksit, benzen, heksan analitik saflıktadır ve Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) sağlandı.

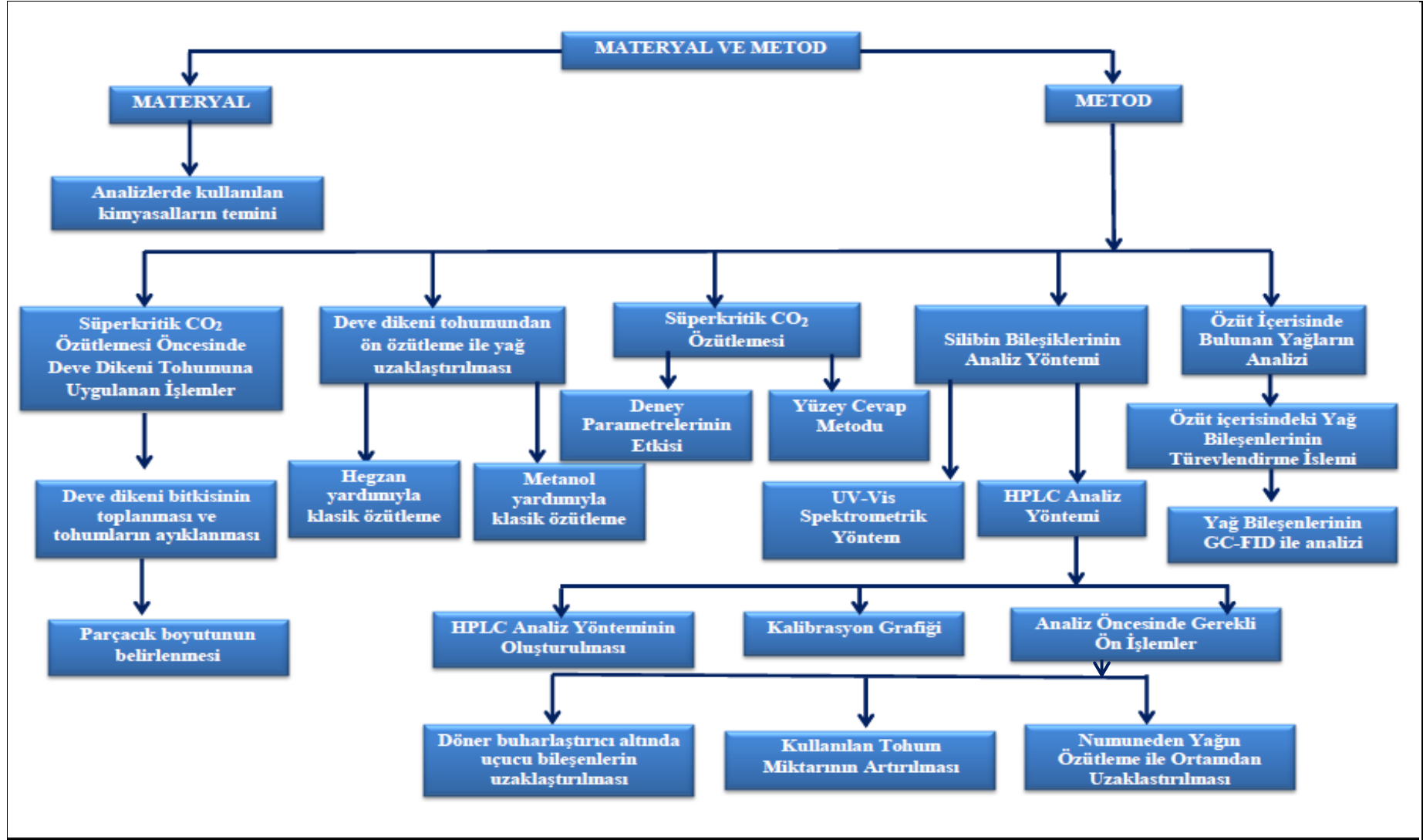
Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için gerekli olan HPLC saflığındaki Silibin A ve Silibin B standardı Sigma-Aldrich firmasından satın alındı.

5.2. Süperkritik CO₂ Özütlemesi Öncesinde Deve Dikeni Tohumuna Uygulanan İşlemler

Bu bölümde süperkritik CO₂ özütlemesi öncesinde deve dikenini tohumuna uygulanan işlemlerden bahsedilmiştir.

5.2.1. Deve dikenini bitkisinin toplanması

Deve dikenini bitkisi Ağustos ayının sonunda toplandı. Bitkinin kafa tarafında bulunan meyve adı verilen kısmı gövdeden ayrıldı. Meyve içerisinde bulunan tohumlara ulaşabilmek için öncelikle kenarında bulunan dikenler uzaklaştırıldı. Meyvenin orta bölümde bulunan kahverengi tüycükler ayıklandığında doğal ve saf olan tohum ortaya çıkmaktadır (Resim 5.1). Tohumlar bu tüycüklerden uzaklaştırmak amacıyla elendi. Mevcut tohumlar yaklaşık olarak 5-7 mm aralığındadır. Elde edilen tohumlar bir gece oda koşullarında kurutuldu.



Şekil 5.1. Çalışma için izlenen yol



Resim 5.1. Deve dikenini tohumu ve çiçeği

5.2.2. Parçacık boyutunun belirlenmesi

Parçacık boyutunun özütlemeye verimine etkisinin belirlenmesi için; toplanan ve kurutulan tohumlar deneyden önce öğütüldü. Öğütme işleminin en az kayıpla gerçekleştirebilmesi en iyi hızla çalışan ve kısa sürede ortam sıcaklığını artırmadan öğütmeyi sağlayan BOSCH MKM6000 Marka mutfak tipi kahve değirmeni kullanıldı.

Literatürde çeşitli doğal kaynaklardan süperkritik akışkan özütlemeye işlemleri gerçekleştirildiğinde, tanecik büyüklüğünün minimum 0,25-2 mm aralığında olması gerektiği belirtilmiştir. Daha küçük parçacık büyüklüğünde çalışıldığında çözücünün bir kısmı özütlemeye haznesi içindeki kanallarda ilerlerken özütleneyecek materyal ile temas etmediği, prosesin veriminin kaybına neden olduğu ve özütlemeye yatağı içindeki kanallarda bazı tıkanmalara sebep olduğu görülmüştür (Herrero ve diğerleri 2006, Reverchon ve diğerleri 2006). Bu çalışmaların bulguları dikkate alınarak, öğütülen tohumlar standartlarına uygun eleklerden elendi. 0,3025;0,925 ve 1,2 mm tanecek büyüklüğünde tohumlar elde edildi.

5.2.3. Deve dikenini tohumundan ön özütlemeye ile yağ uzaklaştırılması

Deve dikenini tohumunun %20-30'luk kısmını uçucu yağlar oluşturmaktadır (Corchete 2008). Deve dikeninde bulunan silibinin özütlemeye veriminin artırılması amacıyla tohum

içerisinde bulunan yağın ön işlem ile tohumdan uzaklaştırılması hedeflendi. Yağların deve dikenini tohumunun yapısından polar ve apolar olmak üzere iki farklı çözücü ile klasik özütlemesi gerçekleştirildi. Ardından özütleme öncesi ve sonrasında gözenek yapısındaki değişim araştırıldı.

Hegzan yardımıyla klasik özütleme

Bu aşamada tohum içinde bulunan apolar yapıdaki uçucu yağlar yine apolar özellikteki bir çözücü olan hegzan ile özütlemesi gerçekleştirildi. Ön işlemde geçirilmiş 0,925 mm boyutlarındaki 3,5 g tohum 80 mL hegzan içerisinde ~40 °C 'de özütlendi. 1 saatin sonunda elde edilen çözeltinin rengi sarıya döndü.

Metanol yardımıyla klasik özütleme

Bu aşamada tohum içinde bulunan apolar yapıdaki uçucu yağların polar özellikteki bir çözücü olan metanol ile özütlemesi gerçekleştirildi. Hegzan özütlemesi ile aynı koşullarda gerçekleştirilen bu özütlemenin sonunda elde edilen çözeltinin renginde herhangi bir değişiklik görülmedi.

Deve Dikeni Tohumunun Gözenek Yapısının Belirlenmesi

Tohumların yapısındaki esansiyel yağların özütleme işlemi sonrasında çözelti ortamına geçmesiyle tohumun gözenek yapısında değişikliklerin olabileceği düşünüldü. Bu amaçla işlem görmemiş tohumun, hegzan ile özütlemeye sonrası tohumun ve süperkirtik CO₂ ile özütleme sonrası tohumun ayrı ayrı gözenek yapısı incelendi.

Özütleme sonucunda çözeltilere uçucu yağların geçip gözenek yapısında bir değişikliğe sebebiyet verebileceği nedeniyle; özütleme yapılmadığı durumda tohumların gözenek yapısı ile hegzanla özütleme sonucundaki ve sadece süperkirtik CO₂ özütlemesi sonrasında geriye kalan tohumların gözenek yapısı incelendi. "Quantachrome, Autosorb 1 Marka Fizisorpsiyon Cihazı" yardımıyla tohumlar analizlendi. Analiz adsorpsiyon ve desorpsiyon süresi 3'er saat olmak üzere toplamda 6 saat boyunca gerçekleştirildi. Fizisorpsiyon öncesinde numuneye 2 saat boyunca gazların uzaklaştırılması işlemi uygulandı.

5.3. Süperkritik CO₂ Özütlemesi

Süperkritik CO₂ Özütlemesi deneylerinin gerçekleştirildiği sistem ve deney yöntemi aşağıda verilmiştir.

5.3.1. Deney sistemi

Süperkritik özütlemesinin gerçekleşeceği deney sistemi; süperkritik akışkan özütleme ünitesi, kompresör, sifonlu CO₂ tüpü, modifiye pompa ve soğutma banyosundan oluşmaktadır (Resim 5.2). Süperkritik özütleme cihazı “Applied Separations’ Spe-ed SFE” fırın modelidir. Cihaz pompa, fırın içerisinde özütleme ünitesi, toplama ve kontrol üniteleri olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır.



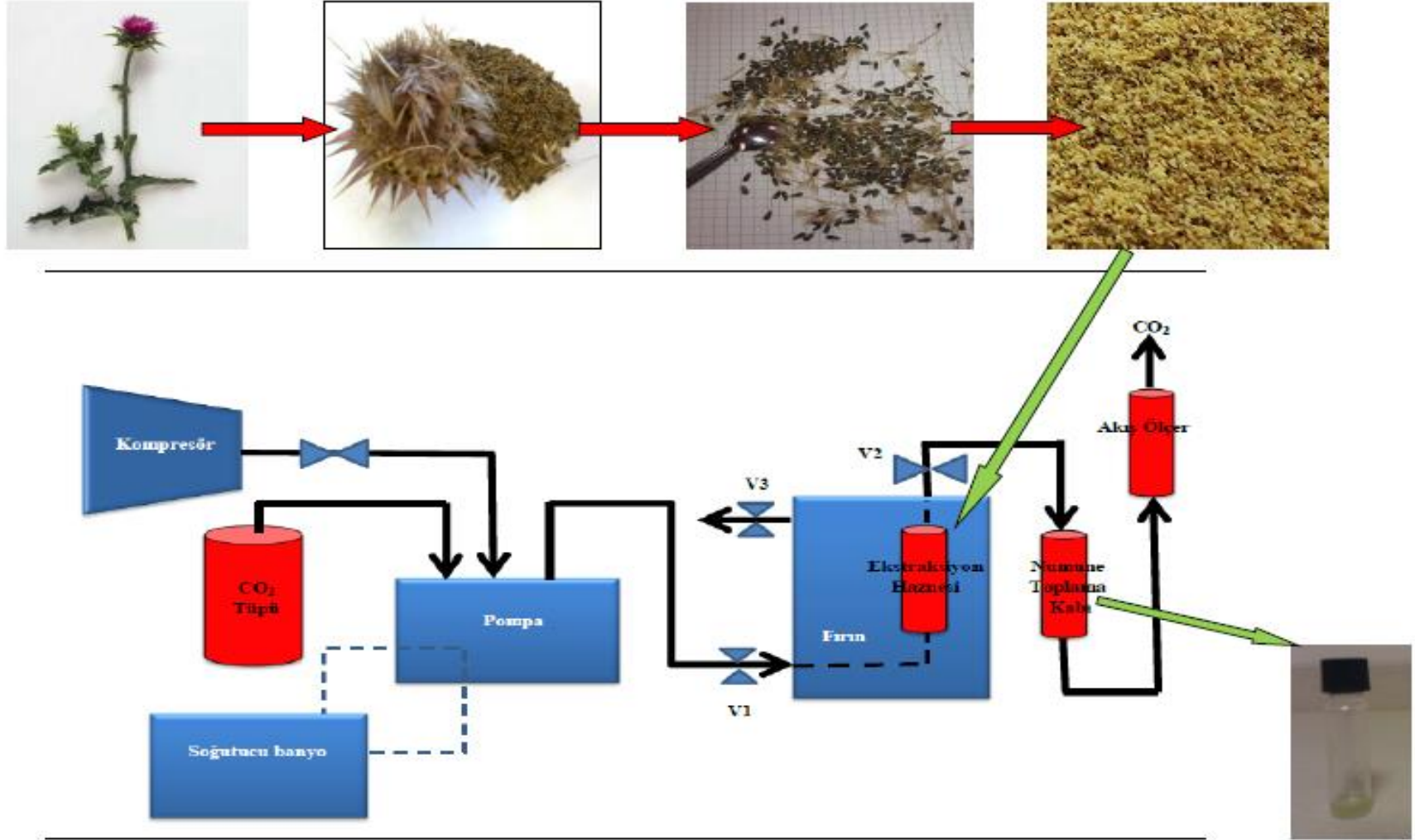
Resim 5.2. Süperkritik özütleme ünitesi

Özütleme haznesi 24 mL hacimli paslanmaz çelik silindirik tüpten oluşmaktadır. Haznedeki oluşabilecek kaçaqları engellemek için haznenin bağlantıları arasında 4 adet sıcaklık ve basınca dayanıklı özel contalar yer almaktadır. Bu hazne fırın içerisinde yer alan bölüme fırın içerisinde dikey olarak yerleştirilmiştir. Fırın üzerinde V₁ (giriş vanası), V₂ (çıkış vanası) ve V₃ (sistemdeki çözücüyü boşaltma vanası) olmak üzere 3 adet vana yer almaktadır. V₂ çıkış vanasından çıkan akışkanın hızını ölçmek amacıyla tasarlanmış bir

akış ölçer bulunmaktadır. Elde edilen ürünün toplanması için fırın çıkışında bir numune toplama kabı mevcuttur.

5.3.2. Deney yöntemi

Deve diken tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme prosesine ait akım şeması Şekil 5.2'de verildi. Fırının sıcaklığı ayarlanarak özütleme haznesinin çalışılmak istenen sıcaklığa ulaşması sağlandı. Pompa yardımıyla da CO₂ istenilen basınca kadar sıkıştırılır, sonra V₁ ve V₂ vanası açılarak özütleme işlemine başlandı. CO₂'in katı faza geçerek sistemi tıkamasını önlemek amacıyla çıkış vanasının sıcaklığı 90 °C'ye ayarlandı. Sistem kesikli olarak çalıştırılmaktadır. İşlem boyunca gelen özüt 30 dakikalık sürelerde numune toplama kabında toplandı. Özütleme işlemi bittikten sonra V₂ ve V₁ vanaları kapatılıp V₃ vanası açılarak sistem içinde biriken CO₂ uzaklaştırıldı ve işlem sonlandırıldı.



Şekil 5.2. Süperkritik CO₂ özütlemesi akım şeması

5.4. Silibin Bileşiklerinin Analiz Yöntemi

Süperkritik CO₂ özütlemesi ile deve dikeni tohumundan özütlenen silibin bileşiklerinin analizinde kullanılan yöntemler aşağıda verilmektedir.

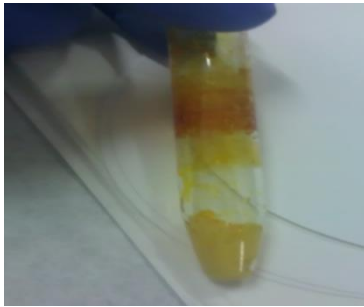
5.4.1. UV-Vis spektrofotometrik yöntem

Stoiljkovic ve diğerleri (2007) yaptığı çalışmada silymarin bileşiklerini UV-Vis Spektrofotometre cihazı ile analizlemişlerdir. Bu yöntem kapsamında; özüt içerisindeki silymarin bileşiklerinin 2,4-Dinitrofenil hidrazin (2,4-DNPH) ile türevlendirme işlemi gerçekleştirildi ve özütlenen numune içerisindeki silymarin bileşiklerinin miktarı % silibin cinsinden bulundu. Deneylerde izlenen yöntem aşağıda verilmektedir.

250-255 mg 2,4 DNPH oda koşullarında vakum altında 7 saat kurutuldu ve 25 mL 'lik balon jøjeye alındı. 0,5 mL derişik H₂SO₄ eklenmiş ve çözünene kadar ısıtıldı. 15 mL metanol eklendi, soğutuldu ve 25 mL'ye metanol ile tamamlandı.

1 mL (0,8 g) özüt ile 2 mL 2,4 DNPH çözeltisi 10 mL'lik balon jøjeye alındı, 50 dakika boyunca 50-55 °C sıcaklıkta sabit tutuldu ve soğutuldu. Bu çözelti %10'luk (m/v) metanolde hazırlanmış KOH çözeltisi ile tamamlandı.

Bu çözeltiden 1 mL alındı ve üzerine 20 mL metanol eklendi. Oluşan fazlar ayrıldı, tekrar 20 mL çözelti eklendi ve tekrar ayrıldı. İşlem bitince 2 çözelti birleştirildi. Elde edilen çözelti Resim 5.3'de görülmektedir. Referans çözelti olarak 1 mL metanol kullanıldı ve işlemler tekrarlandı.



Resim 5.3. UV-Vis Spektrofotometresi için hazırlanan çözelti

Her iki çözeltinin 490 nm’de absorpsiyonları UV-Vis spektrofotometresi (Analyticjena Specort 200 Spectrofotometer) ile ölçüldü.

5.4.2. HPLC yöntemi

Silibin A ve silibin B bileşiklerinin HPLC ile kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması hedeflendi. Bu bileşiklerin laboratuvarında hali hazırda bulunan kolon (150*4,6 mm*3µ) ile analiz koşullarının belirlenmesi üzerinde çalışmalar gerçekleştirildi. Standart silibin A ve silibin B bileşiğinden faydalanarak analiz yöntemi ve kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Ancak süperkritik CO₂ ile elde edilen numune içerisinde birçok bileşiğin bulunması analizi zorlaştırdı. Bu sebeple numuneye analiz öncesinde ön işlemler yapıldı. Gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda sunuldu.

HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

Silibin bileşiklerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile kalitatif ve kantitatif analizi yapıldı. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Cihazı Dionex P680 HPLC Pompa ve UVD 170U dedektör, Chromelon softwaresinin kullanılacağı Packett Bell bilgisayardan oluşmaktadır. Çalışmalar 4,6 x 150 mm boyutlarında Acclaim 120 C18, 3 µm kolonda gerçekleştirildi. Mevcut kolonun özelliklerine en yakın özellik gösteren kolon ve literatürde belirtilen silibin analiz yöntemleri üzerinden yeni bir analiz yöntemi oluşturulmaya çalışıldı (EK-2). Literatürdeki bu yöntemler (Radjabian ve diğerleri, 2008; Shimadzu, 2012, Dionex, 2012 vb.) denendiğinde silibin bileşiklerinin tamamıyla ayrılması sağlanamamaktadır. Bu sebeple akış hızı, numunenin seyreltme etkisi, taşıyıcı faz türünün ve yüzde bileşiminin etkisi gibi analizi etkileyen başlıca parametreler araştırıldı ve çalışmanın detayları EK-3’de verildi.

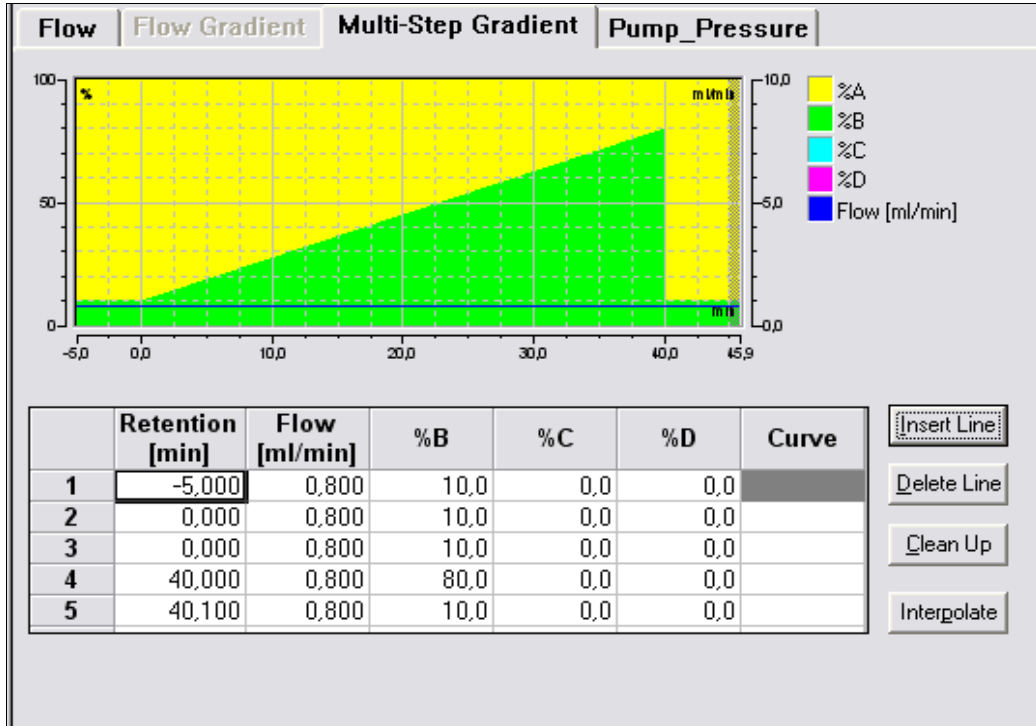


Resim 5.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı

Yukarıda ki çalışmalar sonucunda; silibin A ve silibin B standardının da temin edilmesiyle analiz yönteminin geliştirilmesi standart üzerinden devam edildi. Bu çalışmaların ışında oluşturulan analiz koşulları ve programı Çizelge 5.1 ve Şekil 5.3 verildi.

Çizelge 5.1. HPLC programı

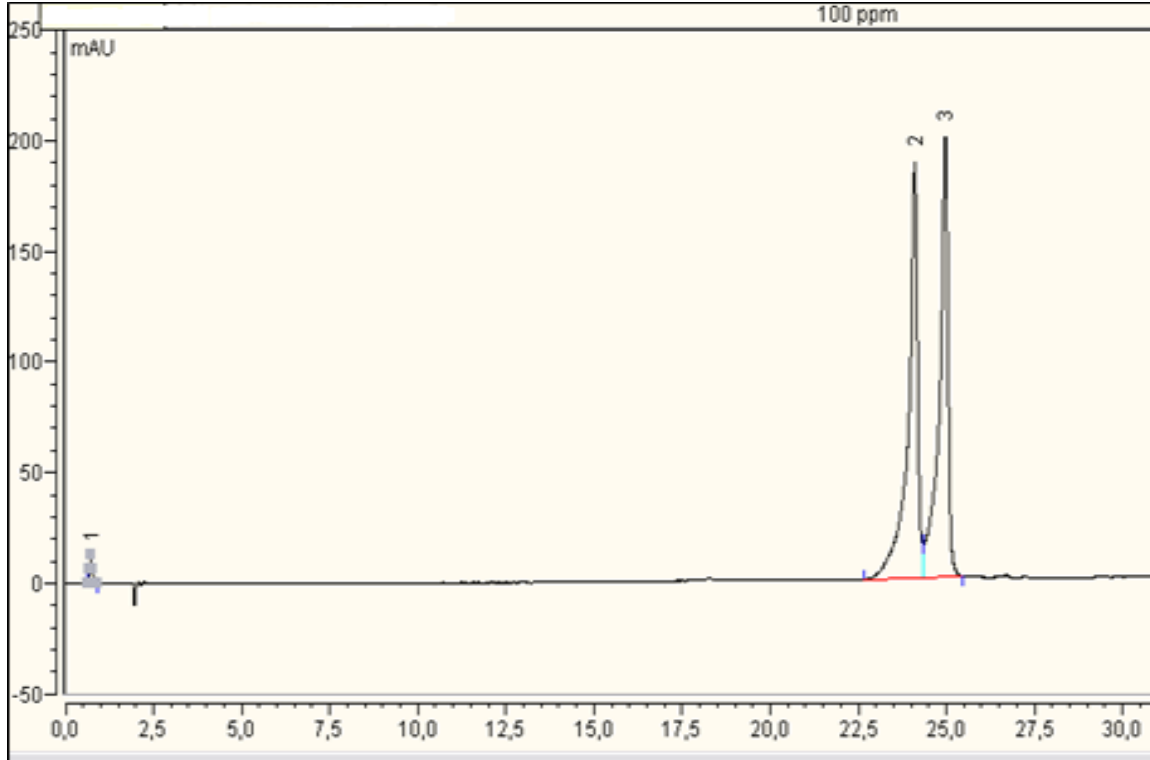
<u>Çalışma koşulları</u>	
A çözücüsü	%20 metanol
B çözücüsü	%100 metanol
Akış Hızı	0,8 mL/min
Gradient	5 min %10 B 40 min %80 B 40,1 min %10 B
Dalga Boyu	288 nm ve 254 nm
Kolon	4,6 x 150 mm boyutlarında Acclaim 120 C18, 3 µm kolon



Şekil 5.3. HPLC programı software görüntüsü

Kalibrasyon Grafiği

HPLC saflığındaki metanolde hazırlanmış 100'lik ppm Silibin A ve silibin B standart maddesi Çizelge 5.1'de HPLC koşullarında analizlendi ve elde edilen kromotogram Şekil 5.4'de verilmektedir.

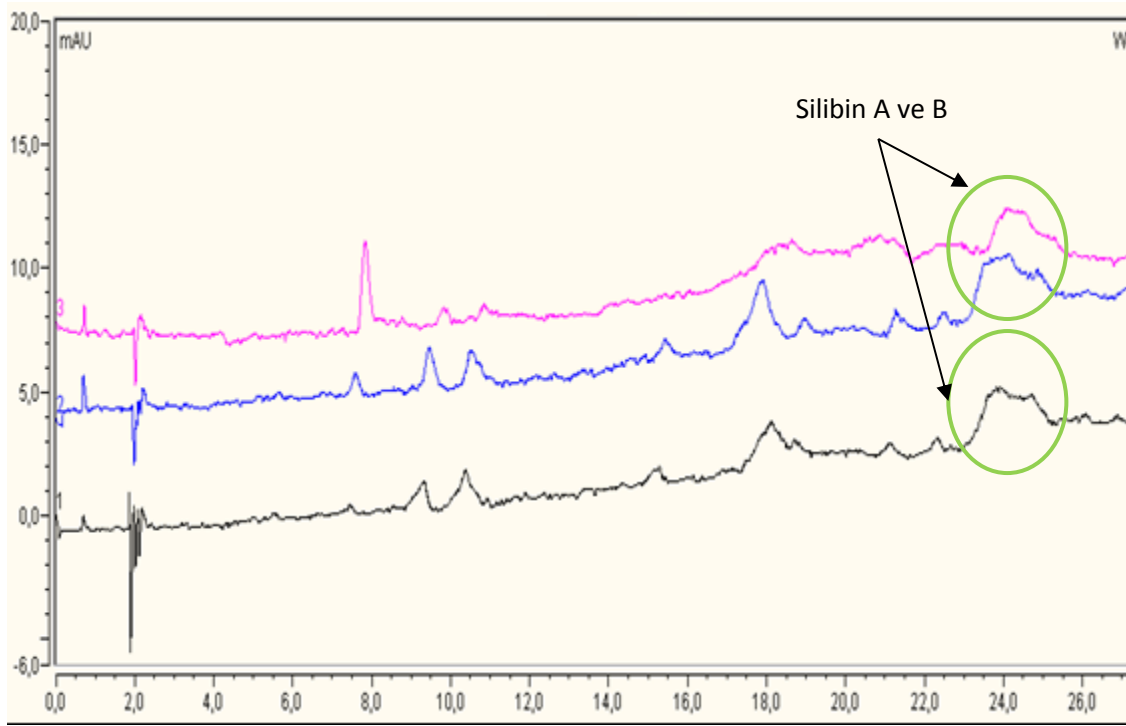


Şekil 5.4. 100 ppm standart maddeye ait kromatogram

Yukarıdaki kromatogram dikkate alındığında 100 ppm'lik silibin A ve B standardının anlamlı olarak ayrıldığı görüldü. Bu noktadan sonra 5-25 ppm aralığında kalibrasyon grafiği oluşturuldu. 5, 10, 15, 20 ve 25 ppm'lik standartların hazırlanmasına ait hesaplamalar, elde edilen kromatogramlar ve kalibrasyon grafikleri EK-4 ve EK-5'de verilmektedir.

Analiz Öncesinde Gerekli Ön İşlemler

Deve diken tohumunun süperkritik CO₂ özütlemesi ile elde edilen numune Çizelge 5.1'de yer alan HPLC analiz koşullarında analizlendi. Bu numuneye ait kromatogram aşağıda yer almaktadır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. 40°C’ sıcaklıkta 30, 60, 90 dakikalarda elde edilen numunelere ait kromatogramlar a) Pembe:30 min, b) Mavi:60 min c) Siyah: 90 min

Şekil 5.5’den görüldüğü üzere gerçek numunede ön işlem uygulanmadığı takdirde silibin bileşiklerine ait pikler iç içe geçmiş ve kuyruklanmış olarak geldiği ön denemelerde görüldü. Silibin A ve B’nin numunedeki miktarının az olması ve numune içinde yer alan diğer yağ bileşiklerine ait piklerin perdeleme etkisi göstermesi analizi zorlaştıran basamaktır. Bu sorunun aşılabilmesi için zenginleştirme işlemi uygulandı, numune içerisindeki ürün derişimin artırılması yönündeki çalışmalar gerçekleştirildi ve matriks etkisinin azaltılması hedeflendi. Zenginleştirme kapsamında numunelerin döner buharlaştırıcı altında kurutulması, kullanılan tohum miktarının artırılması, perdeleme etkisi yaratan yağın diğer özütleme ile ortamdan uzaklaştırılması gibi parametrelerin etkisi araştırıldı.

Döner buharlaştırıcı altında uçucu bileşenlerin uzaklaştırılması

Süperkritik CO₂ özütlemesi sonucunda elde edilen numuneler içerisinde yer alan uçucu bileşenlerin uzaklaştırılması için 25 °C, 40 °C ve 60 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta döner buharlaştırıcı kullanıldı. Ancak ön işlem sonrasında gerçekleştirilen analizde anlamlı bir kromatogram elde edilememektedir.

Kullanılan Tohum Miktarının Artırılması

Silibin A ve silibin B miktarının artırılması amacıyla özütlenecek tohum miktarı artırıldı. Tanecik boyutu küçültülmüş 6 g tohum, özütleme haznesi içine deney yapılmak üzere yerleştirildi. Ancak bu miktardaki tohum sistem içerisindeki tıkanmalara sebebiyet vererek elde edilen özütün geri tepmesine neden olmaktadır. Bu sebeple numune miktarı 5 g'a düşürüldü. Ancak bu aşamada da benzer durumla karşılaşıldı ve numune miktarı önceki çalışmalarda olduğu gibi 4 g olarak devam edildi.

Numuneden Yağın Özütleme ile Ortamdan Uzaklaştırılması

Deve diken tohumunun süperkritik CO₂ özütlemesi ile elde edilen numuneler ön bir özütleme işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla mevcut numune üzerine etkin bir ayırma sağlayacak şekilde numune miktarı da göz önünde bulundurularak özütlenen numune üzerine 1:3 (v/v) oranında metanol (%99,9) ilave edildi. Karışım içerisinde iki faz elde edildi ve alt faz ortamdan uzaklaştırıldı. Elde edilen numune HPLC ile belirtilen çalışma koşullarında (Şekil 5.2 ve Çizelge 5.1) analizlendi ve piklerde anlamlı bir ayrılma gözlemlendi.

Bu noktadan sonra süperkritik CO₂ özütlemesi sonrasında elde edilen numuneler yukarıda belirtilen işlemlerden geçirildikten sonra HPLC cihazıyla analizlendi.

5.5. Özüt İçerisinde Bulunan Yağların Bileşenlerinin ve Miktarlarının Belirlenmesi

Bu bölümde Süperkritik CO₂ özütlemesi ile deve diken tohumundan elde edilen özüt içindeki yağın, bileşenlerini ve miktarlarını belirlemek için türevlendirme işlemi yapılmış ve GC-FID cihazı ile analiz edilmiştir. Bu analizin yapılabilmesi için gereken ilgili kolonun laboratuvarımızda bulunmaması sebebiyle "Düzen Norwest Çevre, Gıda ve Veteriner Sağlık Hizmetleri Eğitim Danışmanlık Ticaret A.Ş" Laboratuvarına bu analiz yaptırılmıştır. Çalışmanın detayları aşağıda belirtilmektedir.

5.5.1. Özüt içerisindeki yağ bileşenlerinin türevlendirme işlemi

Bu yöntem kapsamında özüt içerisinde yer alan yağ asitleri türevlendirme işlemi yapılarak yağ asidi metil esteri haline getirildi. Türevlendirme işlemi aşağıda belirtildi.

- 1) 0,1 g yağ örneği tartıldı.
- 2) 2 mL hegzan eklendi
- 3) 11,2 g KOH 100 mL metanolde çözülerek 2N'lik Potasyum hidroksit metanolik çözeltisi hazırlandı.
- 4) 0,2 mL 2N metanolik KOH çözeltisi eklendi, ağzı sıkıca kapatılıp karıştırıldı.
- 5) Yağ asidi metil esterlerini içeren üst kısmı ayrıldı (EEC 1991; CONSLEG 1991).

5.5.2. Yağ bileşenlerinin gaz kromatografisi ile aydınlatılması

Deve diken tohumunun Süperkritik CO₂ ile özütlemesi sonucunda elde edilen özütün içerisinde yer alan yağ bileşikleri türevlendirme ön işlemi ile yağ asidi metil esteri haline getirilmiştir. GC-FID cihazı ile analizi yapılmıştır.

Analizde 100 m uzunlukta, 0,25 mm iç çaplı, film kalınlığı 0,2 µm olan HP-88 kolon ve FID dedektör kullanılmıştır. Yağ analizinde kullanılan GC-FID analizinin gerçekleştirildiği sıcaklık programı Çizelge 5.2' de verilmiştir.

Çizelge 5.2. GC-FID analizinin gerçekleştirildiği sıcaklık programı

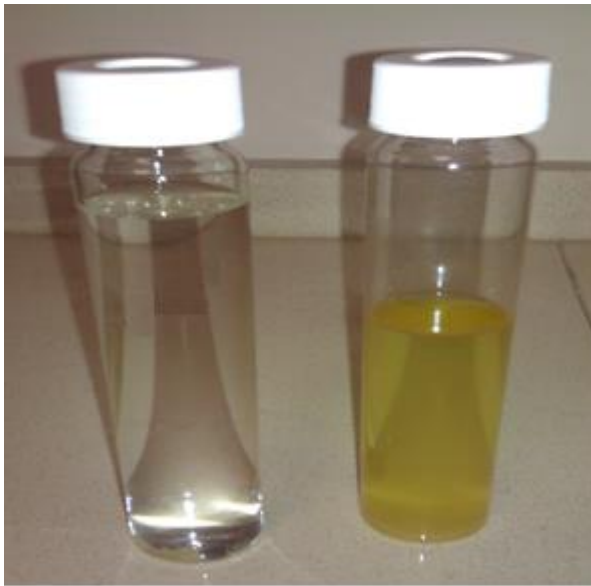
GC Fırın programı:	
Hız	: 10°C/min
Bitiş Sıcaklığı	: 190 °C
Toplam analiz süresi	: 42,5 dakika
Temizleme Sıcaklığı	: 200 °C
Temizleme Süresi	: 5 dakika
Enjekte edilen numune miktarı:	2 µl
Enjektör sıcaklığı	: 250 °C
Split ratio	: 1/50
Split Flow	: 49,8 mL/min
Total Flow	: 57,6 mL/min
Dedektör sıcaklığı	: 270°C
Hidrojen Akışı	: 30 mL/min
Hava akışı	: 350 mL/min
Taşıyıcı gaz	: Hidrojen
Yardımcı gaz	: Kuru Hava

Gaz Kromatografi için Çizelge 5.2’de verilen çalışma şartları sağlandı. Kolon, enjektör ve dedektör sıcaklıkları ayarlandı. Hazırlanan metil ester çözeltisinden 2 µl şırınga ile kolona gönderildi. Alıkonma sürelerinden GC software programı kullanılarak pik alanları belirlendi.

6. DEVE DİKENİ TOHUMUNDAN ÖN EKSTRAKSİYON İLE YAĞ UZAKLAŞTIRILMASI VE SONUÇLARIN SÜPERKRİTİK CO₂ ÖZÜTLEMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Parçacık boyutu belirlenen tohumlar içerisinde silymarın bileşikleri haricinde uçucu yağlar, apijenin, musilaj, kuersetin, acı maddeler vb. gibi pek çok bileşik yer almaktadır. Bunların %20-30'lık kısmını uçucu yağlar oluşturmaktadır. Deve dikeninden silibin özütlemesi üzerine yapılan literatür çalışmaları tohum içerisinde bulunan yağın ön bir işlem ile tohumdan uzaklaştırılmasının silibin verimi üzerine olumlu etki yaratacağı yönündedir (Wallace ve diğerleri, 2003).

Bu bölümde tohum içerisinde yeralan yağın uzaklaştırılması hedeflenmiş olup, yağın silibin verimi üzerine etkisi incelendi. Deve dikenini tohumunda bulunan yağların polar (metanol) ve apolar (hegzan) olmak üzere iki farklı çözücü ile klasik özütlemesi yapıldı. Hegzan ile elde edilen özütün renginin sarı rengine döndüğü, ancak metanol içeren özütün renginde bir değişim olmadığı görüldü (Resim 6.1.). Yağ bileşiklerinin hegzan çözeltisine geçtiği düşünüldüğünden tohumların özütleme öncesi ve sonrasında gözenek yapısındaki değişim araştırıldı ve sonuçlar aşağıda detaylı olarak sunuldu.



a)

b)

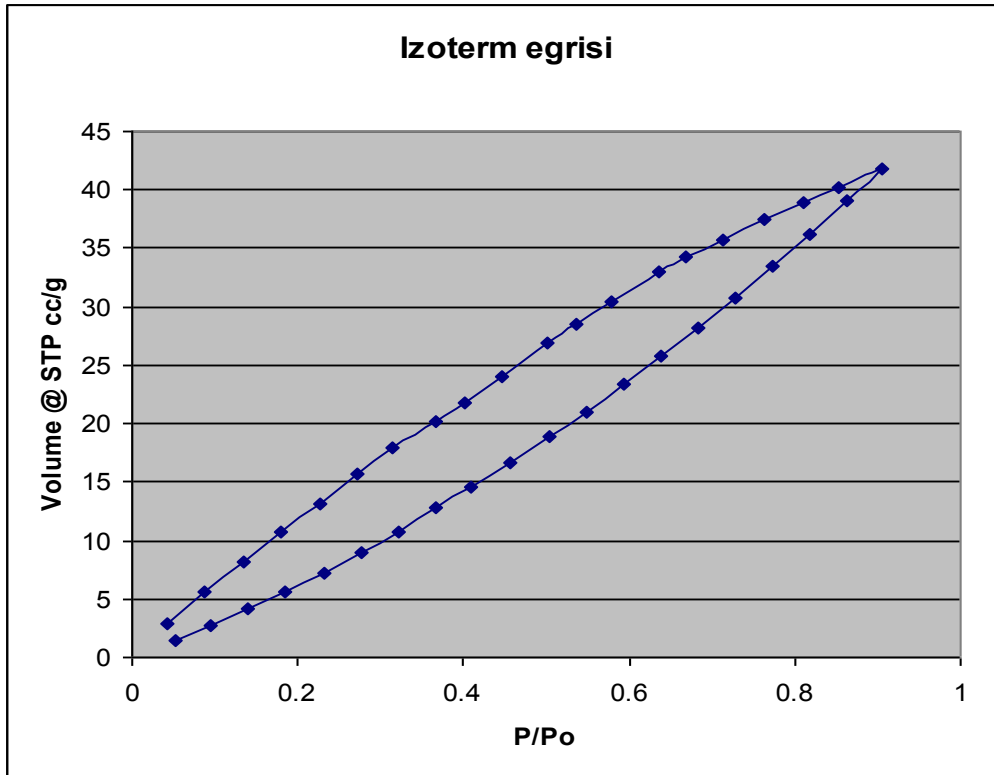
Resim 6.1. Ön özütleme sonunda elde edilen çözeltinin sonuçları
a) metanol ile özütleme b) hegzan ile özütleme

6.1. Hegzan ile Özütlemenin Deve Dikeni Tohumunun Gözenek Yapısı Üzerine Etkisi

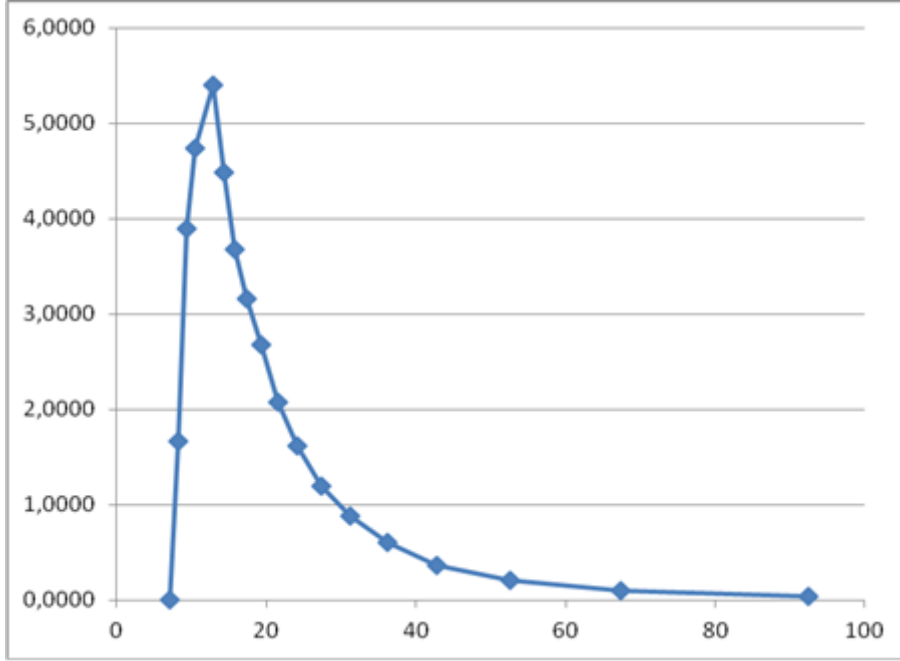
Hegzan ile yapılan özütleme sonucunda çözeltiye uçucu yağların geçip gözenek yapısında bir değişikliğe sebebiyet verebileceği nedeniyle özütleme sonucunda geriye kalan tohumların gözenek yapısı ile özütleme öncesinde gözenek yapısındaki değişim, “Quantachrome, Autosorb 1 Marka Fizisorpsiyon Cihazı” yardımıyla analizlendi. Elde edilen veriler Bölüm 6.1. kapsamında sunulmaktadır. Analiz süresi adsorpsiyon ve desorpsiyon için 3'er saat olmak üzere toplamda 6 saat sürdü. Fizisorpsiyon öncesinde numuneye 2 saat boyunca gaz uzaklaştırma işlemi uygulandı.

6.1.1. Klasik özütleme öncesi tohumlar

Klasik özütleme işlemi öncesi deve dikeni tohumlarına ait izoterm eğrisi ve ortalama gözenek boyut dağılımı Şekil 6.1'de ve Şekil 6.2'de verildi.



Şekil 6.1. Klasik özütleme öncesi BET çoklu verilerine göre oluşturulmuş izoterm eğrisi

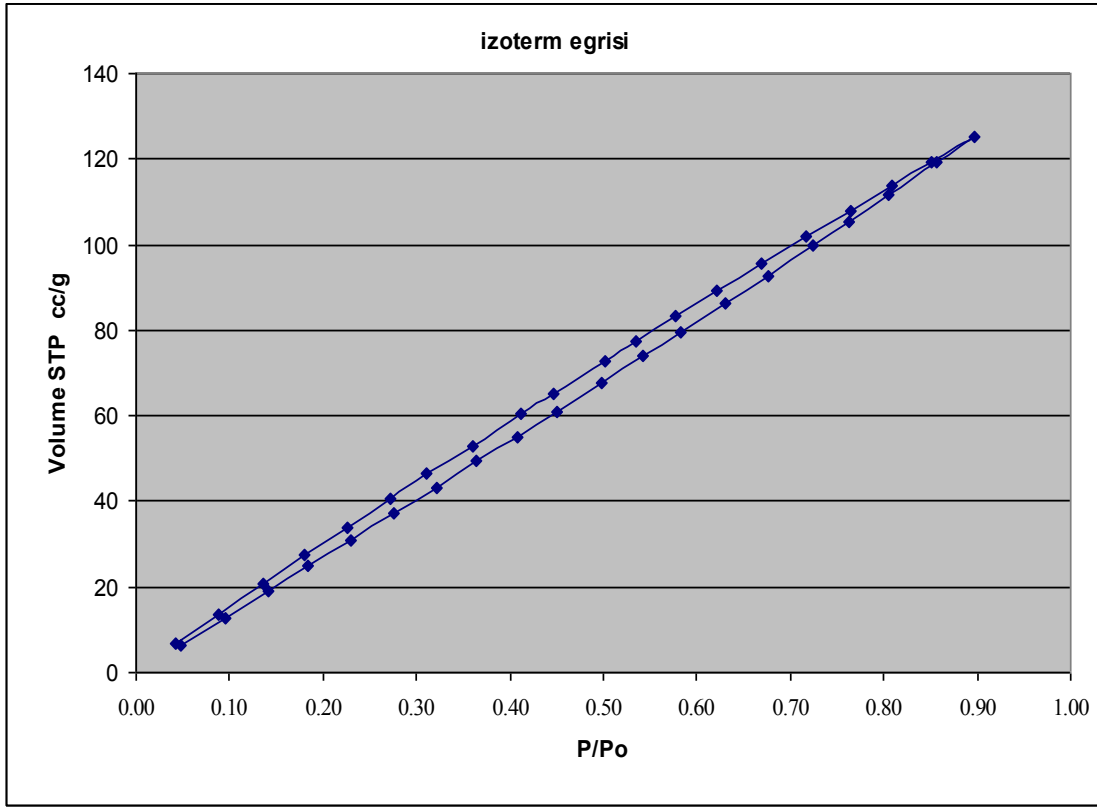


Şekil 6.2. Klasik özütleme öncesi BJH desorpsiyon verilerine göre oluşturulmuş gözenek boyut dağılımı eğrisi

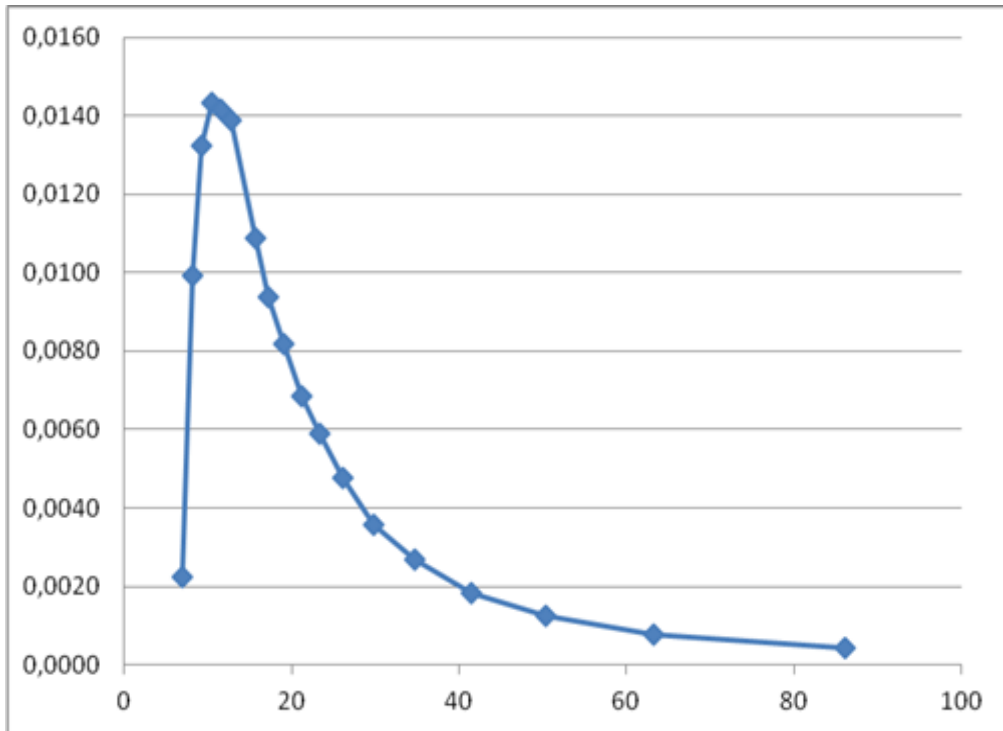
Şekil 6.2 incelendiğinde ortalama gözenek çapı 11,564 Å olarak bulundu.

6.1.2. Klasik özütleme sonrası tohumlar

Hegzan ile İşlem görmüş tohumların izoterm eğrisi ve ortalama gözenek boyut dağılımı Şekil 6.3'de ve Şekil 6.4 'de verildi.



Şekil 6.3. Klasik özütleme sonrası numunenin BET çoklu verilerine göre oluşturulmuş izoterm eğrisi



Şekil 6.4. Klasik özütleme sonrası numunenin BJH desorpsiyon verilerine göre oluşturulmuş gözenek boyut dağılımı eğrisi

Şekil 6.4 incelendiğinde ortalama gözenek çapı 10,383 Å olarak bulundu.

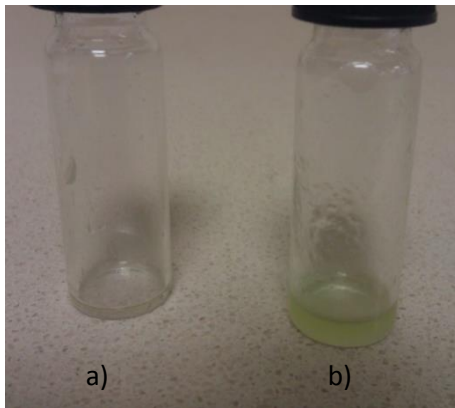
Çizelge 6.1. Klasik özütleme öncesi ve sonrasında deve diken tohumuna ait yüzey alanı ve gözenek çap verileri.

Tohum	Yüzey Alanı (BET)	Gözenek Çapı (BJH)
Klasik özütleme sonrası	121,82 m ² /g	10,383 Å
Klasik özütleme öncesi	30,05 m ² /g	11,564 Å

Çizelge 6.1 incelendiğinde gözenek çapının hata payı çerçevesinde aynı kaldığı görüldü. Hegzan ile özütlenmiş deve diken tohumu yüzey alanının işlem görmemiş tohuma göre 4 kat arttığı bulundu. Hegzanın tohum içerisinde yeralan bileşiklerin bazılarını özütlediği bu nedenle yüzey alanının arttığı tahmin edilmektedir.

6.2. Ön İşlem Sonrasında Tohumların Süperkritik CO₂ Özütlemesi

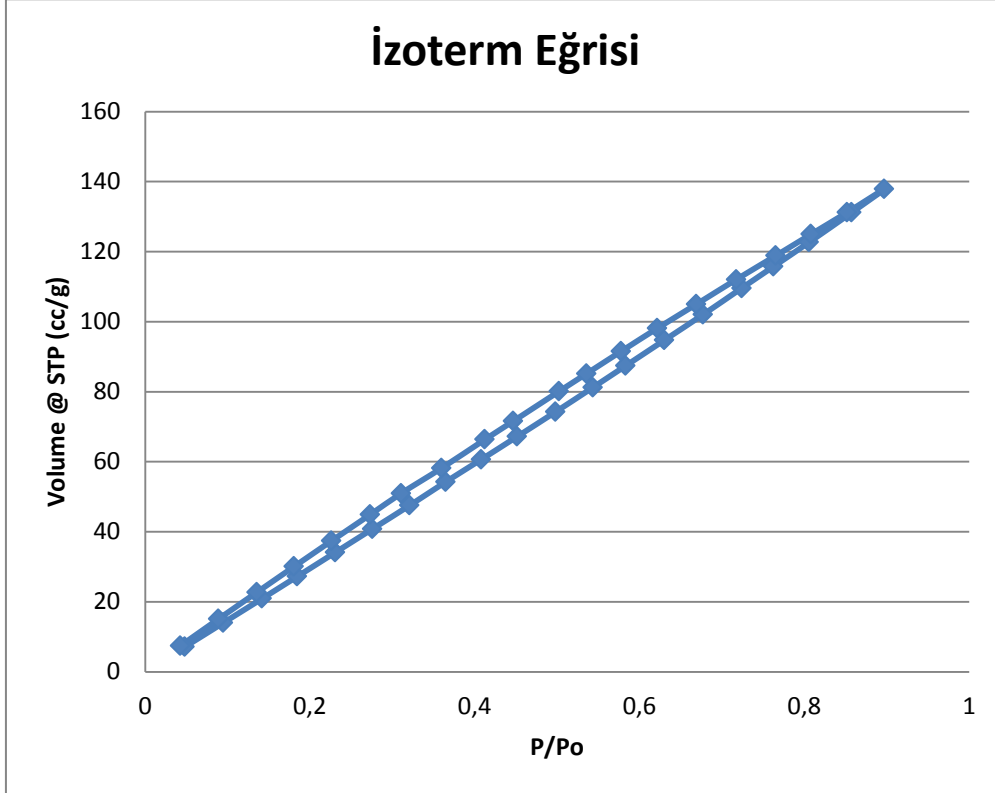
Hegzan ile özütleme yapılan tohumlar ile ön işlem uygulanmayan tohumlar 40 °C sıcaklıkta, 200 bar basınçta, 4 mL/min akış hızında 3,5 g tohumun süperkritik CO₂ ile özütlemesi yapıldı. Yapılan deney sonucunda hegzan ile özütlenen edilen tohumların süperkritik CO₂ özütlemesinde 0,008 g numune elde edilirken ön işlem yapılmadan süperkritik CO₂ ile özütleme gerçekleştirilen tohumlarda 0,348 g numune elde edildi (Resim 6.2). Hegzan ile özütleme sonucu çok az numune elde edilmesi nedeniyle tohumlara ön işlem uygulamadan süperkritik CO₂ özütleme deneylerine devam edildi.



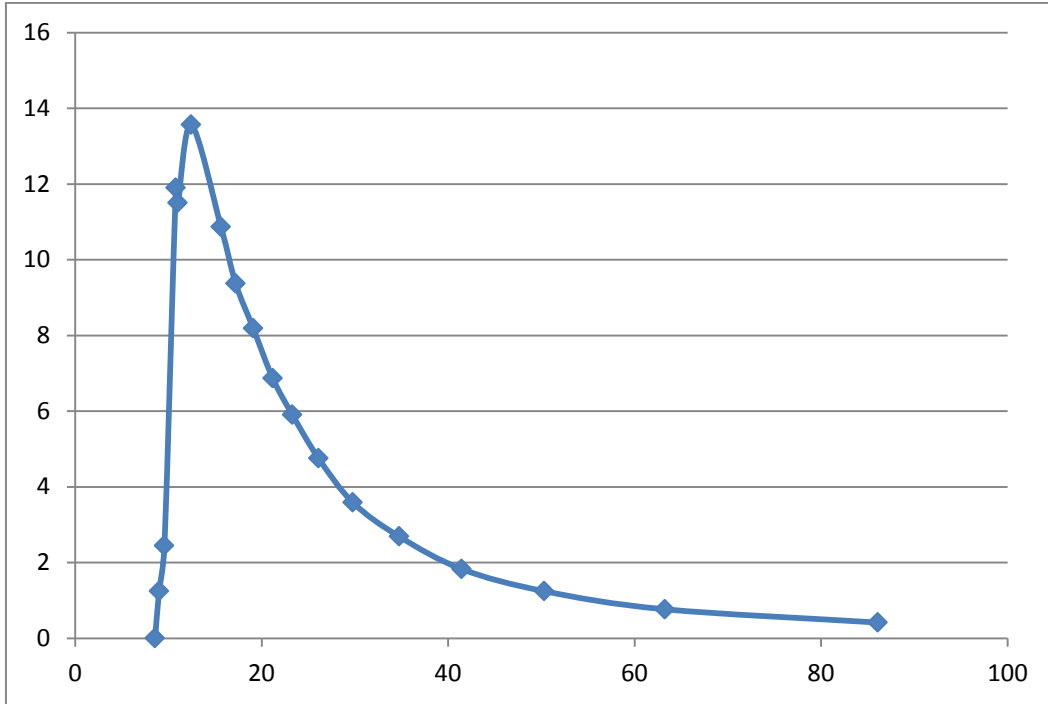
Resim 6.2. Süperkritik CO₂ özütleme sonuçları a) Hegzan ile ön özütleme b) Ön işlem yok

6.3.Süperkritik Özütleme Sonrası Tohumların Gözenek Yapısı

Süperkritik özütleme sonrası tohumların gözenek yapısındaki değişim araştırıldı. Tohumların ait izoterm eğrisi ve ortalama gözenek boyut dağılımı Şekil 6.5 'de ve Şekil 6.6 'de verildi.



Şekil 6.5. Süperkritik CO₂ özütlemesi sonrasında numunenin BET çoklu verilerine göre oluşturulmuş izoterm eğrisi



Sekil 6.6. Süperkritik CO₂ özütlemesi sonrasında numunenin BJH desorpsiyon verilerine göre oluşturulmuş gözenek boyut dağılımı eğrisi

Şekil 6.6 incelendiğinde ortalama gözenek çapı 12,455 Å olarak bulundu.

Çizelge 6.2. Süperkritik özütleme öncesi ve sonrasında deve diken tohumuna ait yüzey alanı ve gözenek çap verileri.

Tohum	Yüzey Alanı (BET)	Gözenek Çapı (BJH)
Süperkritik Özütleme Öncesi	30,05 m ² /g	11,564 Å
Süperkritik Özütleme Sonrası	127,98 m ² /g	12,455 Å

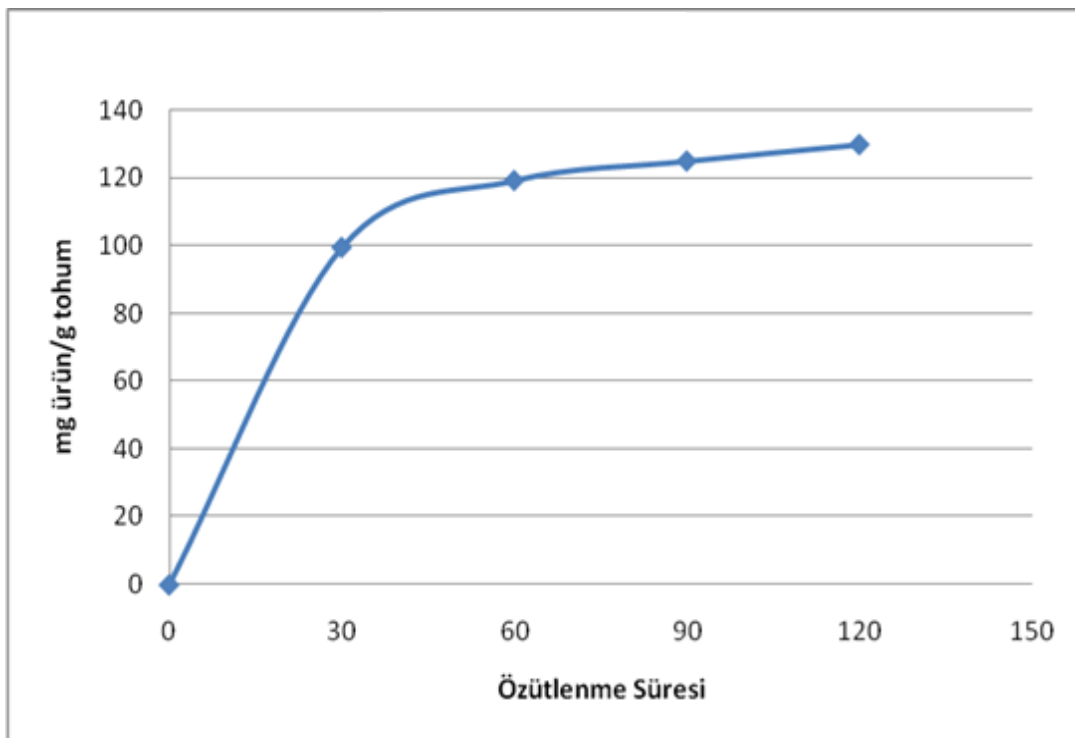
Çizelge 6.2 incelendiğinde gözenek çapının hata payı çerçevesinde aynı kaldığı görüldü. Süperkritik özütleme sonrasında deve diken tohumunun yüzey alanının özütleme öncesine göre 4,26 kat arttığı bulundu. Süperkritik CO₂ özütlemesi ile deve diken tohumu içerisinde yer alan bileşikleri özütlediği için yüzey alanı arttığı görüldü.

7. SÜPERKRİTİK CO₂ ÖZÜTLEME İLE DEVE DİKENİNİN ÖZÜTLEMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMA PARAMETRELERİN ETKİSİ

Süperkritik CO₂ ile deve dikeninin özütlemesi üzerine; özütleme süresi, sıcaklık, basınç, CO₂ akış hızı ve tanecik büyüklüğünün etkisi incelenerek elde edilen deneysel sonuçlar detaylı olarak aşağıda sunulmaktadır.

7.1. Sürenin Özütleme Verimine Etkisi

İlk olarak özüt verimi üzerine sürenin etkisi araştırıldı. Bu sette tohum miktarı, sıcaklık, basınç, tanecik büyüklüğü ve karbon dioksit akış hızı sabit tutulurken, zamanla elde edilen özüt miktarı incelendi. Tohum miktarı 3,5 g, sıcaklık 40 °C, basınç 200 bar, tanecik büyüklüğü 0,925 mm, karbon dioksit akış hızı 4 mL/min olarak sabit tutuldu.

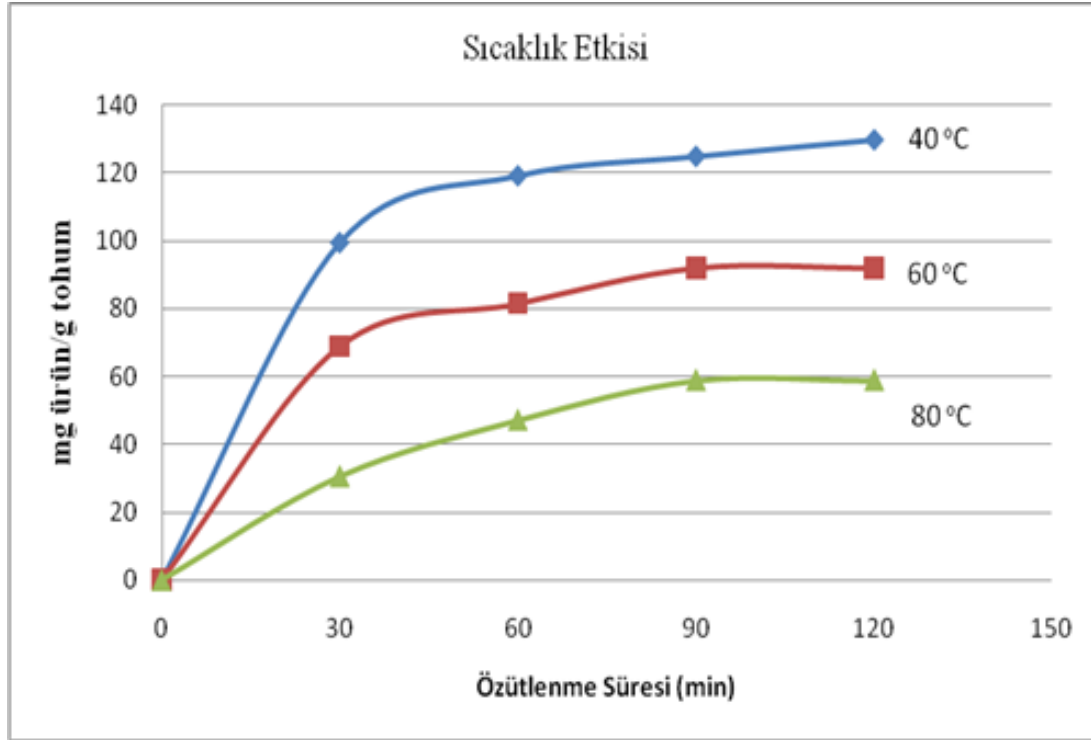


Şekil 7.1. Süperkritik CO₂ özütleme sürecine özütleme süresinin etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 200 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, karbon dioksit akış hızı 4mL/min)

Şekil 7.1. incelendiğinde özütleme süresi arttıkça mg ürün/g tohum artmaktadır. 120 dakika sonunda ise sistemden hiç ürün gelmediği için özütleme süresi 120 dakika olarak daha sonraki deneysel parametre setlerinde sabit tutuldu.

7.2. Sıcaklığın Özütleme Verimine Etkisi

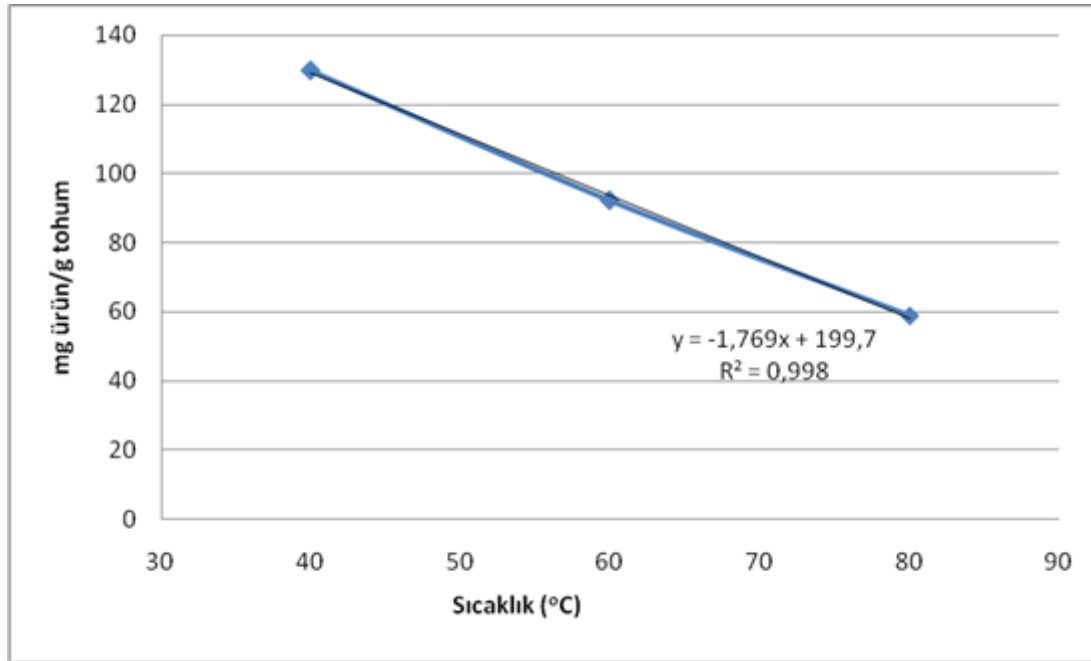
Bu aşamada basınç, tanecik büyüklüğü, karbon dioksit akış hızı ve özütleme süresi sabit tutulurken sıcaklık parametresi değiştirildi. Deneysel 40, 60, 80 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta gerçekleştirildi(Şekil 7.2).



Şekil 7.2 Süperkritik CO₂ özütleme sürecine sıcaklığın etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

Şekil 7.2 incelendiğinde, sıcaklığın artması ile özütleme veriminin ve özütleme hızının azaldığı görülmektedir. Sıcaklık parametresi özütleme verimini iki şekilde etkiler. Sıcaklığın artması ile çözünenin buhar basıncı artmaktadır. Bu durumun sonucunda çözünürlük yani çözücüye geçen ürün miktarı artmaktadır. Ancak sıcaklıktaki artış karbon dioksitin yoğunluğunu düşürmekte ve karbon dioksit gaz gibi davranmaktadır.

Sonuç olarak sıcaklığın verime etkisi baskın olan etkiye göre değişmektedir. 200 bar basınçta Peng-Robinson eşitliğine göre 40, 60, 80 °C sıcaklıkları için yoğunluklar sırasıyla 839,9; 723,8; 594,1 kg/m³ şeklindedir (Critical processes, 2013). Sıcaklık 80 °C 'den 40 °C 'ye düştüğünde karbon dioksitin yoğunluğu %29 azalmıştır. Düşük yoğunluğa sahip süperkritik akışkan sıvı özelliğinden uzaklaşmakta, böylece ürünün akışkan içindeki çözünürlüğü azalmaktadır. Bu durumun sonucu olarak CO₂'in yoğunluk etkisi baskın gelmekte, sıcaklık parametresi özütleme verimini olumsuz yönde etkilemektedir.



Şekil 7.3. 40, 60, 80 °C sıcaklıklardaki 120 dakika sonunda elde edilen mg ürün/ g tohum miktarı (basınç 200 bar, karbon dioksit akış hızı:4 mL/min, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm)

Sıcaklık deneylerinde 120 dakikanın sonunda elde edilen ürün miktarları dikkate alındığında 40 °C'de en fazla ürün elde edildiği görülmektedir. Sıcaklık 2 kat azaldığında yaklaşık olarak özüt verimi 2,2 kat arttırmaktadır.

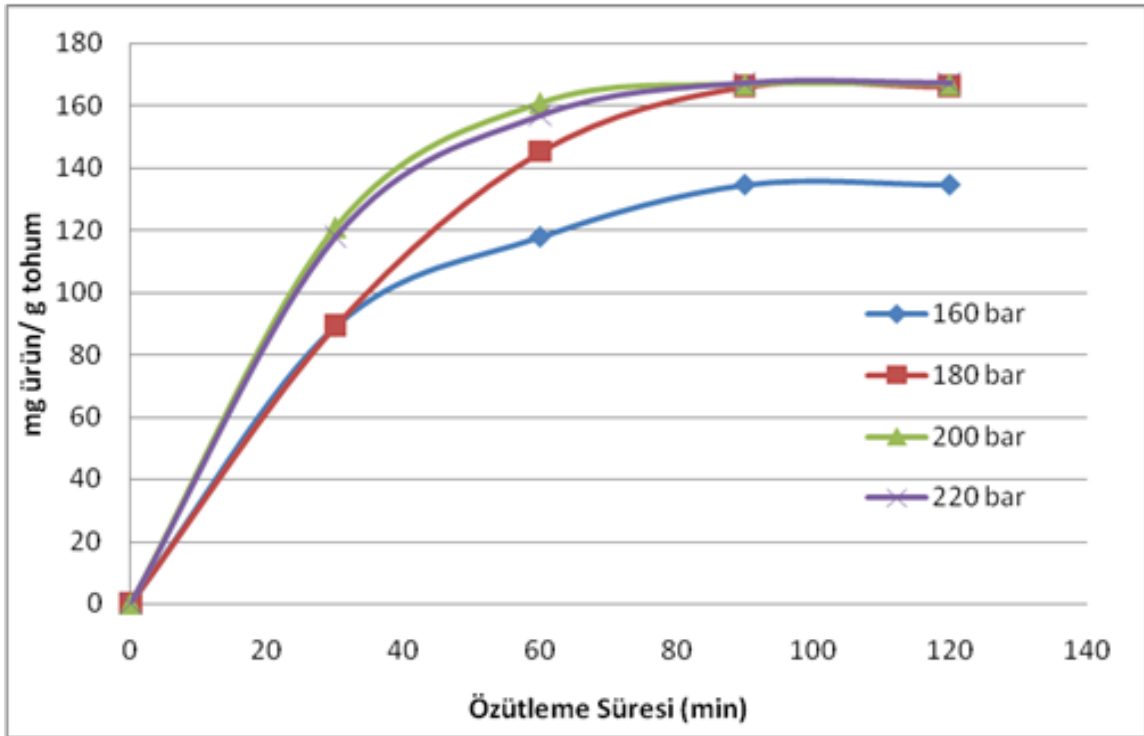
Literatür araştırıldığında, Hindistan cevizi yağının süperkritik CO₂ ile özütlemesi çalışması incelenmiş ve sıcaklığın artması ile verimin azaldığı sonucuna varılmıştır (Machmudah ve diğerleri 2006). Başka bir çalışmada jojoba tohumu yağının süperkritik CO₂ özütlemesi çalışmasında sıcaklığın artması ile özütleme veriminin azaldığı gözlenmiştir (Salgın, 2007). Susam yağının süperkritik CO₂ özütlemesi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda sabit basınçta özütleme sıcaklığı artarken özütleme veriminin azaldığı görülmüştür (Doker ve diğerleri 2010). Ayçiçeği yağının süperkritik CO₂ ile özütlemesi

üzerine yapılan çalışmada sıcaklık etkisi düşük basınçlarda CO₂'in yoğunluğundaki değişimin yarattığı etkiyi baskın kılmıştır. Yüksek basınçlarda ise ürünün buhar basıncındaki artışın daha baskın olduğu sonucuna varılmıştır (Kriamiti ve diğerleri 2002).

Literatür ile elde edilen bulgular karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu olduğu görüldü.

7.3. Basıncın Özütleme Verimine Etkisi

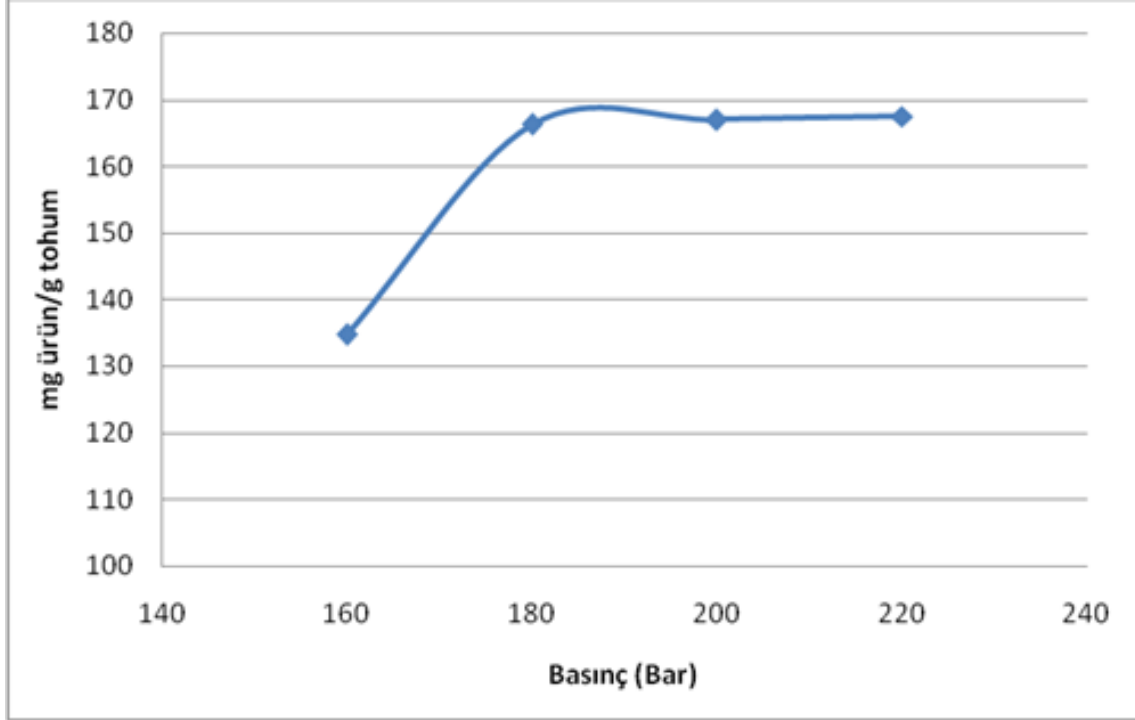
Deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ özütlemesi çalışmasında basıncın etkisi 160, 180, 200 ve 220 bar değerleri için incelendi. Bu aşamada numune miktarı 4 g, karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40°C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika olarak sabit tutuldu, basınç parametresi değiştirildi. Değişen basınç değerlerine göre elde edilen bulgular Şekil 7.4'de verildi.



Şekil 7.4. Süperkritik CO₂ özütleme sürecine basıncın etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

Şekil 7.4'de elde edilen bulgular doğrultusunda ilk 60 dakika incelendiğinde basıncın 160 bardan 200 bara çıkması durumunda özütleme veriminde ve özütleme hızında belirgin bir şekilde artış gözlenmektedir. Özütleme hızındaki artış özütleme süresinin kısaltmasına

neden olduğu ve 90-120 dakika zaman aralığında verimde belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu durumun CO₂'in yoğunluğunun artarak sıvı özeliğine yaklaşmakta ve deve diken tohumu özütünün çözünürlüğünü arttırmaktadır Bu sebepten dolayı verimin arttığı düşünülmektedir.



Şekil 7.5. 120 dakikanın sonunda Süperkritik CO₂ özütlemeye verimine basıncın etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütlemeye süresi 120 dakika)

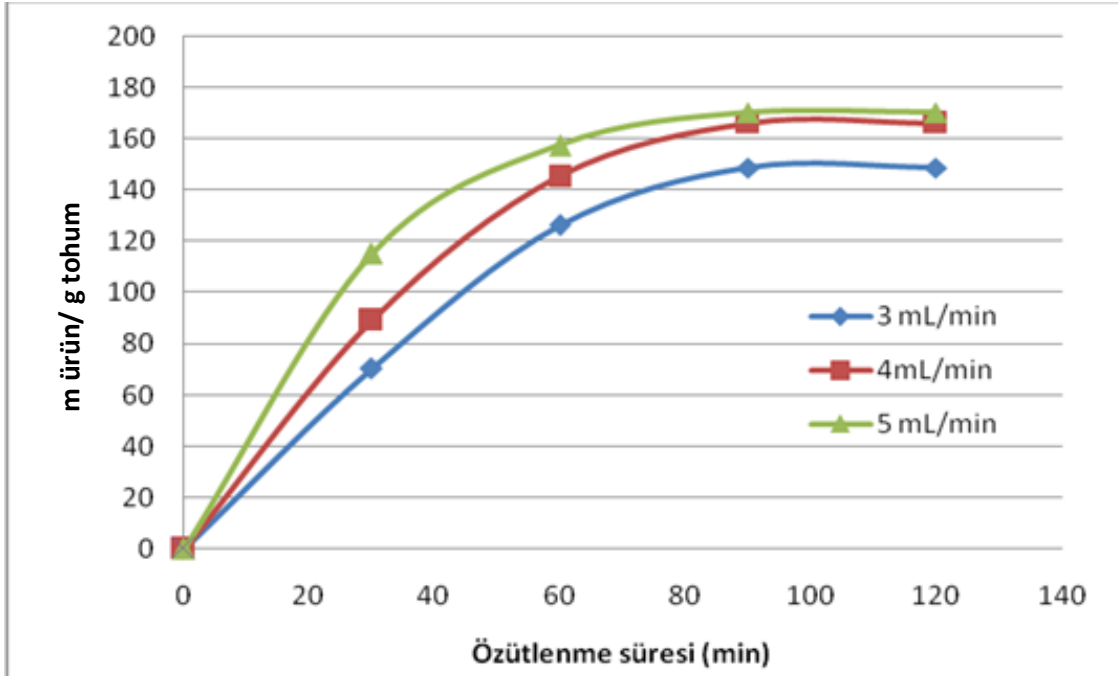
Şekil 7.5 incelendiğinde özütlemeye süresi olan 120 dakika sonunda ise 180, 200 ve 220 bar değerlerinde elde edilen özütlemeye verimi değerlerinde belirgin bir değişim olmadığı görüldü. Bu nedenle bundan sonraki deneylerde basınç 180 bar olarak sabit tutuldu.

Elde edilen bulgular literatür ile karşılaştırıldı. Süperkritik CO₂ özütlemeye ile Hint fıstığı yağının eldesi üzerine yapılan çalışmada basıncın artması ile özütlemeye süresinin kısaldığı ve özütlemeye veriminin arttığı bulunmuştur (Min ve diğerleri 2010). Bu konu ile yapılan bir diğer çalışmada ise ayçiçeği yağının süperkritik CO₂ özütlemeye verimine basıncın etkisi araştırılmıştır. Basıncın artması ile özütlemeye veriminin arttığı sonucuna varılmıştır (Salgın ve diğerleri 2006). Bir başka çalışmada chia (Bir tür Meksika bitkisi) tohumundan süperkritik CO₂ ile yağ eldesi araştırılmıştır. Çalışmada sunulan bulgulara göre basıncın artması ile özütlemeye veriminin arttığı görülmüştür (Uribe ve diğerleri 2011). Süperkritik

CO₂ ile mısır filizi yağının özütlemesinde de benzer sonuçlarla karşılaşmıştır (Rebolleda ve diğerleri 2012). Basıncın verime etkisi konusundaki bulguların, literatürdeki benzer sonuçlarla desteklendiği görülmektedir.

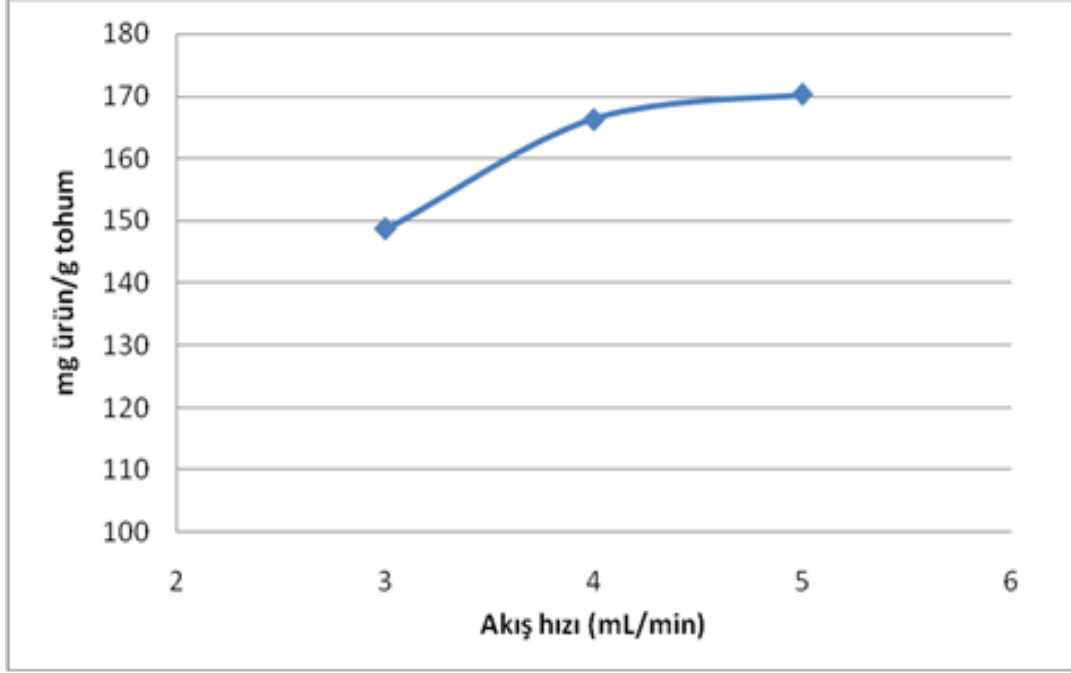
7.4. Akış Hızının Özütleme Verimine Etkisi

Deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ özütlemesi sürecine akış hızının etkisi 3, 4 ve 5 mL/min değerleri için incelendi. Değişen akış hızı değerlerine göre elde edilen bulgular Şekil 7.6 'da verildi.



Şekil 7.6. Süperkritik CO₂ özütleme sürecine Karbon dioksit akış hızının etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

Şekil 7.6 incelendiğinde karbon dioksit akış hızının artmasının özütleme süresine önemli bir etkide bulunmadığı görüldü. Ancak ilk 30 dakika için başlangıç hızı incelendiğinde akış hızı 3mL/min'den 4mL/min ve 4mL/min'den 5mL/min akış hızına çıktığında başlangıç hızında 2,8'er katlık bir artış olduğu belirlendi. Bu durumda tohum ile temas eden CO₂ miktarı artmasıyla başlangıç özütleme verimi arttığı görüldü.



Şekil 7.7.120 dakikanın sonunda Süperkritik CO₂ özütleme verimine karbon dioksit akış hızının etkisi (sıcaklık 40 °C, Basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

Şekil 7.7 incelendiğinde 3 mL/min CO₂ akış hızında 148 mg ürün/g tohum elde edilirken 4 ve 5 mL/min akış hızında bu değerler 166 ve 170 mg ürün/g tohum değerlerine çıkmaktadır. CO₂ akış hızının artırılması ile 120 dakika sonunda verimde çok az bir artış olduğu ve bu artışın giderek azaldığı görülmektedir.

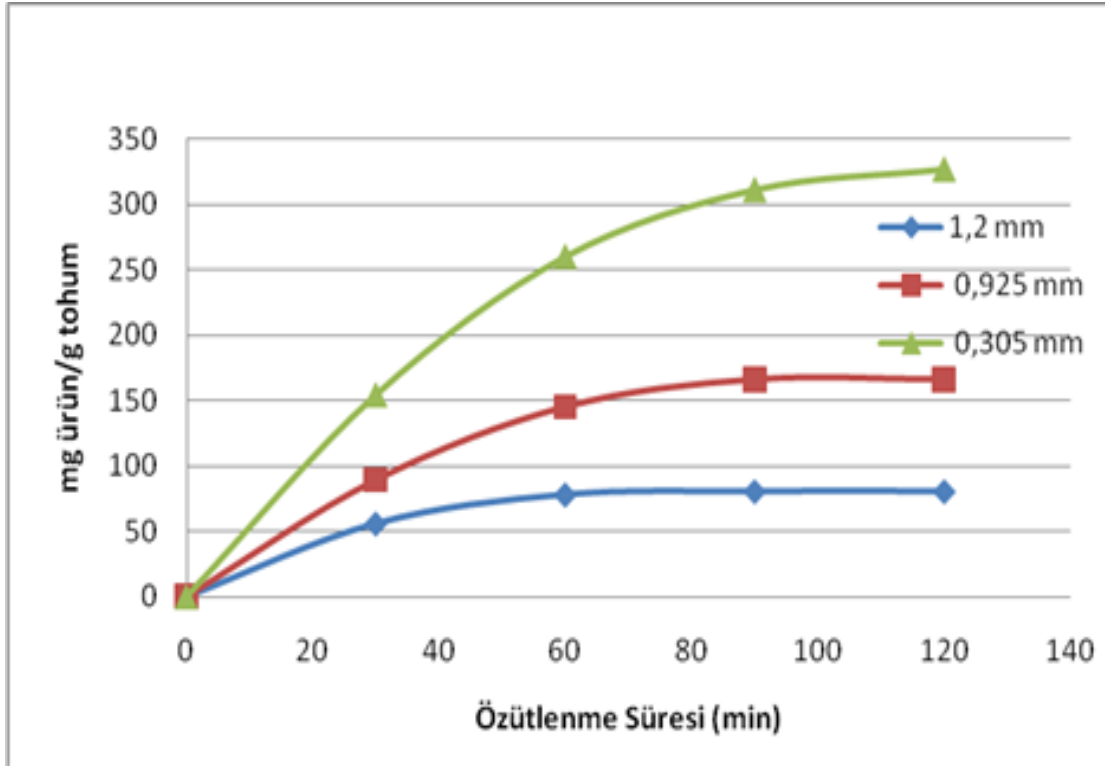
Akış hızı etkisi süreci iki şekilde etkilemektedir. CO₂ akış hızının artması özütleme haznesi içindeki girdapların artmasına, katı ile akışkan arasında film kalınlığının azaltmasına neden olmaktadır. Bu durumun sonucunda verim artmaktadır. Akış hızı arttıkça aynı etki katı ve akışkan arasında etkileşim süresini kısaltmakta ve verimi azaltmaktadır. Çözücü akış hızının sürece etkisi katı madde yapısı ile yakından ilgilidir. Bu iki etki incelendiğinde akış hızının 4 mL/min'e kadar çıkartıldığında verim artmaktadır. Yani dış film transfer katsayısı azalmaktadır. CO₂ akış hızı arttıkça özütleme haznesi içinde birim hacme düşen CO₂ moleküllerinin sayısı artmakta silibin bileşikleriyle CO₂ molekülleri daha fazla temas ederek çözünürlük artmaktadır. CO₂ akış hızı arttıkça tanecik içi difüzyon direnci baskın gelmektedir. 4 mL/min'den 5 mL/min çıktığında ise dış film transfer katsayısı azalırken, deve diken tohumu ve CO₂ akış hızı arasında etkileşim süresi kısalmaktadır. Bu durumun sonucunda verim fazla etkilenmemektedir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; Reverchon ve arkadaşları Süperkritik karbon dioksit ile kuşburnu tohumu yağının özütlenmesini araştırmış ve çalışmalarda çözücü akış hızının artması ile özütleme hızının değiştiğini belirtmiştir (Reverchon, Kaziunas, Marrone 2000). Süperkritik karbon dioksit ile Hindistan cevizi yağının özütlenmesi üzerine gerçekleştirilen çalışmada CO₂ akış hızının artırılması ile verimde az bir artış söz konusu olduğunu vurgulamışlardır. Bu koşullarda CO₂ akış hızı arttıkça kütle transferi etkilenmekte ve tanecik içi difüzyon direnci baskın gelmektedir (Macmudah ve diğerleri 2006). Jojoba tohumu yağının süperkritik karbon dioksit özütlenmesi çalışmasında CO₂ akış hızının artması ile başlangıç özütleme hızının arttığı ve ancak özütleme veriminde kaydadeğer bir değişimin olmadığı belirtilmiştir (Salgın 2007). Akış hızının verime etkisi konusundaki bulguların, literatürdeki benzer sonuçlarla desteklendiği görülmektedir.

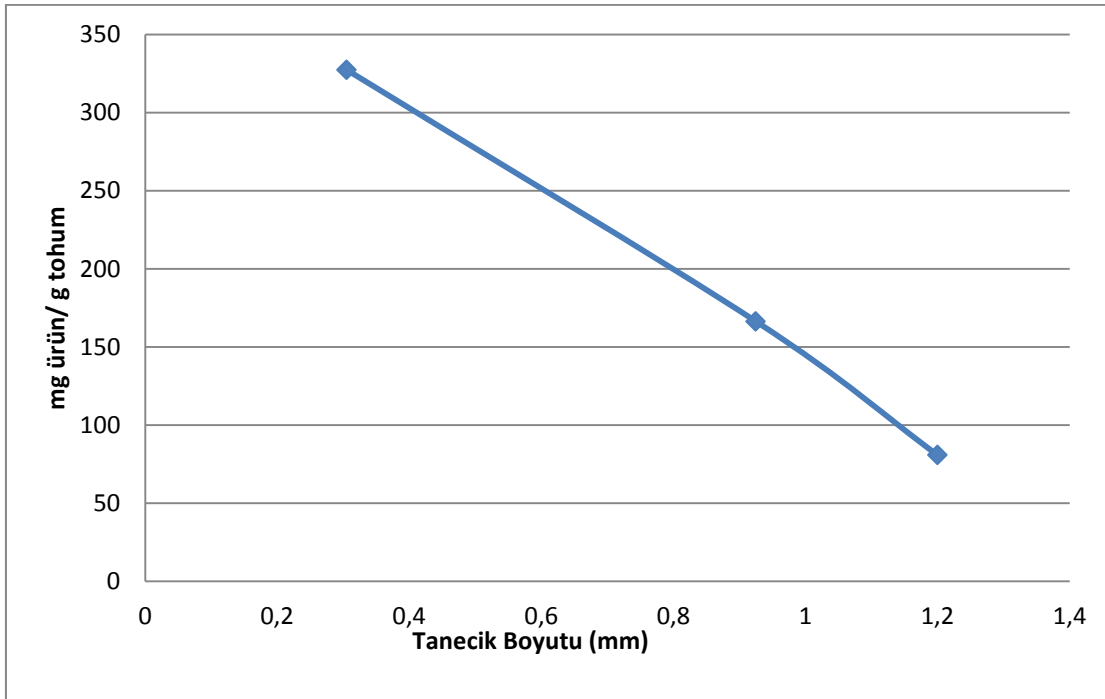
Karbon dioksitin akış hızı arttıkça; 120 dakika sonunda özütleme veriminde belirgin bir artış gözlenmedi. Deneysel sonuçlar CO₂ akışının daha fazla artırılmasının özütleme verimine önemli bir katkı sağlamadığını göstermektedir. Bundan sonraki deneylerde akış hızı 4 mL/min olarak sabit tutuldu.

7.5. Tanecik Büyüklüğünün Özütleme Verimine Etkisi

Tanecik büyüklüğünün özütleme sürecine etkisinin incelendiği çalışmada, 0,3025; 0,925 ve 1,2 mm olmak üzere üç farklı tanecik büyüklüğünde çalışıldı. Elde edilen deneysel bulgular ise Şekil 7.8 ve Şekil 7.9'da verilmektedir.



Şekil 7.8. Süperkritik CO₂ özütleme sürecine Karbon dioksit akış hızının etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)



Şekil 7.9. Tanecik boyutunun ürün verimine etkisi

Şekil 7.9'dan da görüldüğü gibi tanecik büyüklüğünün küçülmesi ile özütleme verimi ve özütleme hızı artmaktadır. 120 dakikanın sonundaki değerler dikkate alındığı 1,2 mm tanecik boyutu için 80,71 mg ürün/g tohum olup; bu değer 0,3025 mm tanecik boyutu için 327,31 mg ürün/g tohum'dur (Şekil 7.9). Tanecik boyutu azaldığında özütleme verimi %75 oranında artmaktadır.

Tanecik büyüklüğünün küçülmesi ile aktarım yüzey alanının arttığı, kütle aktarım dirençlerinin azaldığı ve küçültme esnasında yapıdaki hücrelerin bir kısmının bozulması sonucunda ürünün serbest kaldığı düşünülmektedir. Tanecik boyutunun küçültülmesi özütleme verimini önemli derecede etkilemektedir. Bu durum tanecik içi difüzyonun prosesi kontrol eden basamak olduğunu göstermektedir. Çok küçük tanecik boyutlarında özütleme haznesi ve sistem boru hattında tıkanmalara sebebiyet vererek bu koşullarda yapılan deneylerin sağlıklı gerçekleştirilememesi nedeniyle tanecik boyutu alt limiti 0,3025 mm ile sınırlandırılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Tanecik büyüklüğünün özütleme sürecine etkisinin incelendiği süreli yayınlarda verilen sonuçlar incelendi. Machmudah ve arkadaşları yaptığı çalışmada tanecik boyutu küçüldükçe yüzey alanının arttığını, esansiyel yağların çözücüye daha fazla geçtiğini ve kütle transfer dirençlerinin azaldığını, böylece özütleme veriminin arttığı kaydedilmiştir (Machmudah ve diğerleri 2006). Reverchon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yerfıstığının süperkritik CO₂ ile yağ eldesi konulu çalışmasında tanecik boyutunun küçüldükçe yüzey alanının ve dolayısıyla özütleme veriminin arttığını bulmuşlardır (Revechon ve Marrone, 2001). Tanecik büyüklüğünün verime etkisi konusundaki bulguların, literatürdeki benzer sonuçlarla desteklendiği görülmektedir.

8. MATEMATİKSEL MODELLEME

Tez konusu kapsamında incelenen parametreler ve elde edilen verim değerleri ile sürecin Yüzey Cevap Yöntemine göre optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon için Design Expert 6.08 Trial programı kullanıldı. Elde edilen model ve sonuçları aşağıda ayrıntılı olarak verilmektedir.

8.1.Yüzey Cevap Yöntemi

Yüzey Cevap Yöntemi, süreçlere kolaylıkla uygulanabilen istatistiksel ve matematiksel bir optimizasyon yöntemidir. Özütleme sürecine etki eden parametrelerin etkisi araştırılmış, yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen çıktılara göre özütleme sürecinin optimizasyonu yapıldı. Çalışmada, sıcaklık, basınç ve karbon dioksit akış hızı özütleme sistemine en fazla etki eden parametreler olarak belirlendi (Çizelge 8.1). Bu amaçla Yüzey Cevap Yönteminde bu parametreler bağımsız değişkenler olarak seçildi. Yanıt fonksiyonu olan bağımlı değişkende özütleme sürecinin verimi olarak belirlendi.

Çizelge 8.1. Yüzey Cevap Yöntemi için seçilen parametreler

Bağımsız değişken	Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Akış Hızı (mL/min)
Tasarım Değişkeni	A	B	C

Yüzey Cevap Yöntemi kapsamında sıcaklık, basınç ve akış hızı bağımsız değişkenleri (k=3) için 2k “Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design)” uygulandı. Tasarım için yapılan çalışmada deney tasarımı; merkezde 6 nokta, merkez dışında 14 nokta olmak üzere toplamda 20 noktadan oluşmaktadır.

Bağımsız değişkenlerin maksimum ve minimum değerlerini gösteren alfa 1,68 olarak programdan elde edildi ve sıcaklık, basınç ve akış hızı olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı Çizelge 8.2’de verildi.

Çizelge 8.2. Sıcaklık, basınç ve akış hızı olarak seçilen tasarım değişkenlerinin aralığı

Bağımsız değişken	Tasarım Değişkeni	Tasarım değişkenlerinin aralığı				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Sıcaklık (°C)	A	26,36	40	60	80	93,64
Basınç (bar)	B	146,36	160	180	200	213,64
Akış Hızı (mL/min)	C	2,32	3	4	5	5,68

Yukarıdaki veriler ışığında oluşturulan programın önerdiği deneysel algoritma ve özütleme çıktıları aşağıda sunuldu.

Çizelge 8.3. Deneysel algoritma ve özütleme çıktıları

Deney No	A	B	C	Sıcaklık (°C)	Basınç (Bar)	Akış Hızı (mL/min)	% verim (g ürün /g tohum)
1	-1	-1	-1	40	160	3	8,26
2	1	-1	-1	80	160	3	3,8
3	-1	1	-1	40	200	3	30,22
4	1	1	-1	80	200	3	6,78
5	-1	-1	1	40	160	5	24,08
6	1	-1	1	80	160	5	7,47
7	-1	1	1	40	200	5	30,89
8	1	1	1	80	200	5	10,44
9	-1,68	0	0	26,36	180	4	32,07
10	1,68	0	0	93,64	180	4	2,6
11	0	-1,68	0	60	146,36	4	4,45
12	0	1,68	0	60	213,64	4	21,25
13	0	0	-1,68	60	180	2,32	7,42
14	0	0	1,68	60	180	5,68	14,49
15	0	0	0	60	180	4	12,02
16	0	0	0	60	180	4	12,18
17	0	0	0	60	180	4	13,33
18	0	0	0	60	180	4	8,9
19	0	0	0	60	180	4	7,56
20	0	0	0	60	180	4	10,81

Program yardımıyla tanımlanan parametrelerin gerçek ve kodlanmış değerlerinin 2.dereceden modele (Eş.8.1) göre optimizasyonu yapılmış, yanıt olarak seçilen % verim değerleri için elde edilen modellerin varyans analizi (ANOVA testi) sonuçları Çizelge 8.4’de verildi.

$$\% \text{ verim} = x_0 + x_1 * A + x_2 * B + x_3 * C + x_4 * A^2 + x_5 * B^2 + x_6 * C^2 + x_7 * A * B + x_8 * A * C + x_9 * B * C \quad (8.1)$$

Çizelge 8.4. Deve dikenini tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlemesi deneyleri için kullanılan modelin ANOVA testi verileri

	F değeri	Prob>F
Model	27,09	< 0,0001
A	150,71	< 0,0001
B	45,57	< 0,0001
C	14,65	0,0033
A²	15,24	0,0029
B²	2,31	0,1597
C²	0,26	0,6200
AB	10,22	0,0096
AC	1,65	0,2284
BC	4,51	0,0597
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	1,67	0,2945 (önemsiz=(not significant))
	Değer	
Standart sapma	2,52	
C.V(Varyasyon Katsayısı)	18,77	
R²	0,9606	
Adj R²	0,9252	

ANOVA (varyans) analizinde modelin geçerli olduğunu gösteren F-testi değeri 27,09 olarak bulundu. Prob>F değeri ise modeldeki terimlerin anlamlı olup olmadığını gösterir. 0,05'den büyük değerlere sahip terimler ihmal edilebilir. Yukarıdaki çizelgeye bakıldığında süperkritik CO₂ ile deve dikenini tohumunun özütlemesine etki eden en önemli parametrenin en düşük Prob>F değerine sahip olan sıcaklık (A) ve basınç (B) terimlerinin olduğu görüldü. Akış Hızı (C), Sıcaklığın karesi (A²) ve sıcaklık-basınç ikili etkileşim (AB) terimleri de bu model için önemli terimler arasındadır.

Modelin standart sapması 2,52'dir. Bağımlı değişken (Verim) ile bağımsız değişkenler (Sıcaklık, Basınç ve Akış hızı) arasındaki ilişkinin modeldeki uyumunu gösteren başka bir

ölçüt ise regresyon katsayısıdır. Regresyon katsayısının (R^2) değeri 0,9606 olarak hesaplandı ve bu değer 1'e yakındır. Uyum eksikliği (Lack of fit) değeri ise modelin polinom derecesinin uygunluğu hakkında fikir vermektedir. Uyum eksikliği değeri bu model için 0,2945 (önemsiz (not significant)) olarak hesaplandı ve polinom derecesinin uygun olduğu görüldü. (Önemli (Significant) olarak çıkması durumunda ise polinom derecesinin artırılması gerekmektedir (Montgomery, 2001). Modelde "Adeq Precision (doğru kesinlik)" ifadesi elde edilen sinyalin gürültü oranıdır. Yani yanıtın hataya oranını ölçmektedir. Bu oranın 4'den büyük olması istenir. Bu değer bu model için 17,493 olarak bulundu.

Bağımlı değişken (Verim) ile bağımsız değişkenler (Sıcaklık, Basınç ve Akış Hızı) arasındaki ilişkiyi gösteren modele ait elde edilen katsayılar, F testi ve standart sapma için sonuçlar Çizelge 8.5'de verildi.

Çizelge 8.5. Modele ait katsayılar, F testi ve standart sapma değerleri

Model Parametresi	Hesaplanan Katsayı	Standart Sapma	F değeri
Kayma	10,76	1,03	
A	-8,39	0,68	< 0,0001
B	4,61	0,68	< 0,0001
C	2,61	0,68	0,0033
A ²	2,60	0,66	0,0029
B ²	1,01	0,66	0,1597
C ²	0,34	0,66	0,6200
AB	-2,85	0,89	0,0096
AC	-1,15	0,89	0,2284
BC	-1,90	0,89	0,0597

Deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlemesi süreci üzerine Design Expert 6.08 programı ile elde edilen modelin kodlanmış değişkenler cinsinden eşitliği Eş.8.2'de verildi.

$$\% \text{ verim} = +10,76 - 8,39 * A + 4,61 * B + 2,61 * C + 2,60 * A^2 + 1,01 * B^2 + 0,34 * C^2 - 2,85 * A * B - 1,15 * A * C - 1,90 * B * C \quad (8.2)$$

Bu eşitliğe göre araştırılan parametrelerin sürece etkisi aşağıda irdelendi.

8.2. Parametrelerin Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO₂ ile Özütleme Sürecine Etkisi

Bu bölümde deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme sürecine ikili parametrelerin etkisi incelendi.

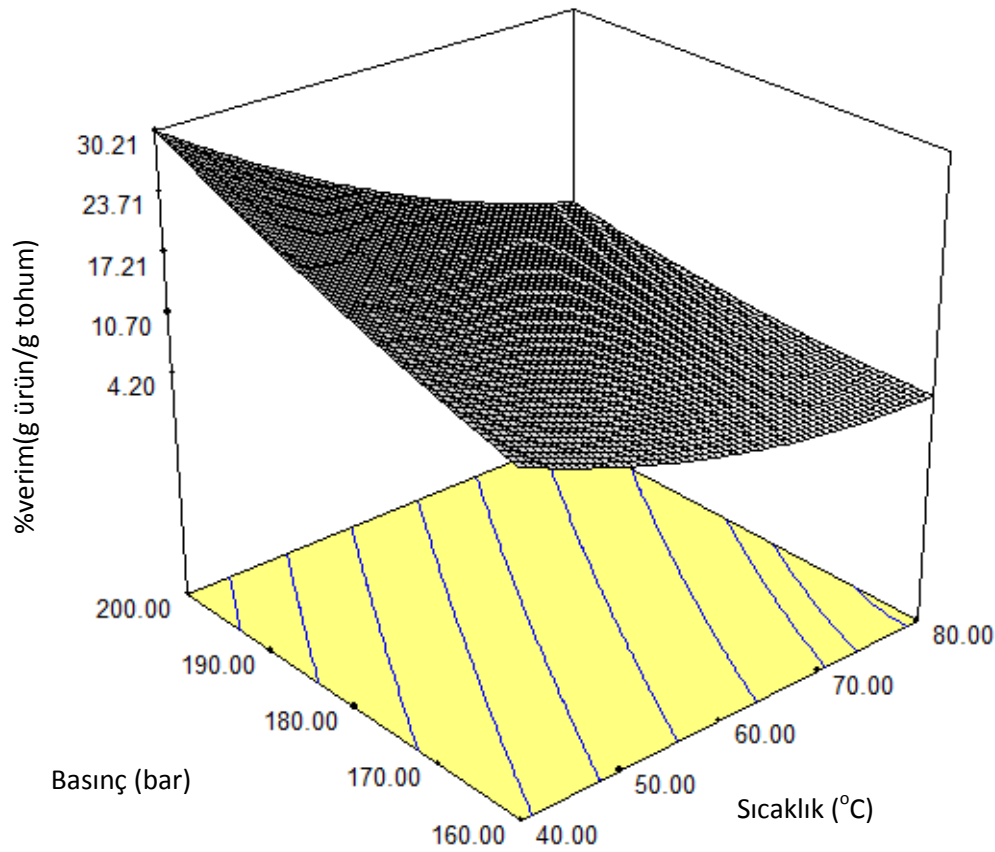
8.2.1. Özütleme sürecine sıcaklık-basınç parametresinin etkisi

Deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme sürecine sıcaklık-basınç etkisini gözlemlemek amacıyla akış hızı parametresi C=0 olarak kabul edildi. Süreci tanımlayan modele ait denklem yeniden düzenlenerek aşağıda verildi.

$$\% \text{ verim} = x_0 + x_1 * A + x_2 * B + x_3 * C + x_4 * A^2 + x_5 * B^2 + x_6 * C^2 + x_7 * A * B + x_8 * A * C + x_9 * B * C \quad (8.1)$$

$$\% \text{ verim} = +10,76 - 8,39 * A + 4,61 * B + 2,60 * A^2 + 1,01 * B^2 - 2,85 * A * B \quad (8.3)$$

Eş 8.3'e bakıldığında tek başına sıcaklık (A) parametresinin önünde bulunan katsayı $x_1 = -8,39 < 0$ olması ve sıcaklık parametresinin minimum (-1,68) ve maksimum (1,68) değerleri için $|x_1| > |x_2|$ olması nedeniyle sıcaklık parametresinin artması deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme verimini olumsuz etkilemektedir. Bu durum basınç (B) parametresi için tam tersi özellik göstermekte x_2 ve $x_5 > 0$ olması nedeniyle basınç değerinin artması deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme verimini artırmaktadır. Sıcaklık – basınç ikili etkileşiminin etkisine bakıldığında her iki parametrenin pozitif ya da negatif kodlanmış değerlerinde özütleme verimi azalmaktadır ($x_7 = -2,85 < 0$). Akış hızının minimum değerinde sıcaklık – basınç ikili etkileşiminin verim değerine etkisi Şekil 8.1'de yer almaktadır.



Şekil 8.1. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO₂ ile Özütleme Sürecine Sıcaklık-Basıncın Etkisi (Akış Hızı:4 mL/min)

Şekil 8.1. incelendiğinde deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlemesi sürecinde basıncın düşük değerinde (160 bar); sıcaklık 40°C'dan 80°C'a doğru arttıkça özütleme verimi 15,3'den 4,22'e azaldığı görüldü. Yüksek basınç değerlerinde (200 bar) ise sıcaklık 40°C'dan 80°C'a doğru arttıkça özütleme verimi 30,22'den 7,74'e azaldığı kaydedildi.

Sonuç olarak sabit basınç altında sıcaklığın artmasıyla CO₂'in yoğunluğu azalmaktadır. Bu durum çözünürlüğün azalmasına, dolayısıyla verimin azalmasına sebep olmaktadır.

8.2.2.Özütleme sürecine sıcaklık-akış hızı parametresinin etkisi

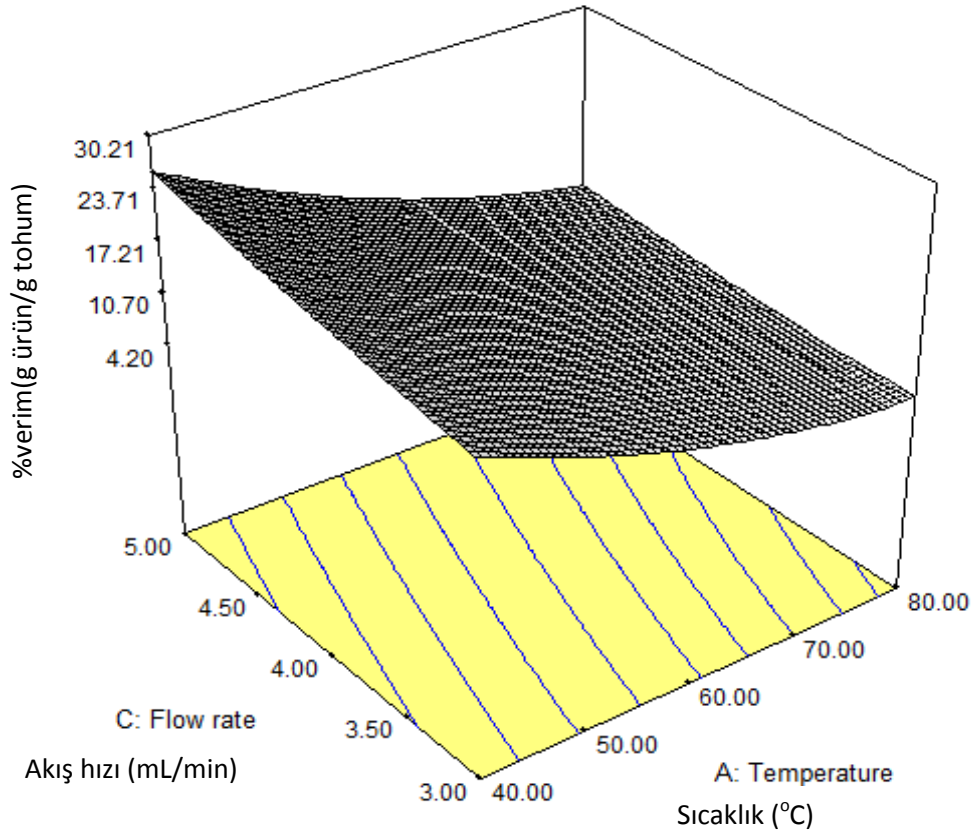
Deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme sürecine sıcaklık-akış hızı etkisini gözlemlemek amacıyla basınç parametresi B=0 olarak kabul edildi. Süreci tanımlayan modele ait denklem yeniden düzenlenerek verim eşitliği aşağıda verildi.

$$\% \text{ verim} = x_1 * A + x_2 * B + x_3 * C + x_4 * A^2 + x_5 * B^2 + x_6 * C^2 + x_7 * A * B + x_8 * A * C + x_9 * B * C \quad (8.1)$$

$$\% \text{verim} = +10,76 - 8,39 * A + 2,61 * C + 2,60 * A^2 + 0,34 * C^2 - 1,15 * A * C \quad (8.4)$$

Eş 8.4 incelendiğinde tek başına sıcaklık parametresi(A) ($x_1 = -8,39 < 0$) ve sıcaklık parametresinin minimum (-1,68) ve maksimum (1,68) değerleri için $|x_1| > |x_2|$ olması deve dikenli tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme verimini olumsuz etkilediği görülmektedir. Akış hızı (C) parametresi ise $x_3 > 0$ ve $x_6 > 0$ olması nedeniyle tam tersi özellik göstermektedir. Bu durumun sonucu olarak akış hızı değerinin artması, deve dikenli tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme verimini artırmaktadır.

Sıcaklık–akış hızı ikili etkileşiminin etkisine bakıldığında her iki parametrenin pozitif ya da negatif kodlanmış değerlerinde (sıcaklık–akış hızı ikili etkileşimini temsil eden katsayı $x_8 = -1,15 < 0$ olması nedeniyle) özütleme verimi azalmaktadır. Sıcaklık – akış hızı ikili etkileşiminin verim değerine etkisi Şekil 8.2’de yer almaktadır.



Şekil 8.2. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO₂ ile Özütleme Sürecine Sıcaklık-Akış hızı etkisi (Basınç 180 bar)

Çalışılan aralıkta basıncın minimum değeri için akış hızının düşük (3 ml/min) ve yüksek (5 ml/min) değerlerinde sıcaklığın 40 °C'den 80 °C'ye artırılmasıyla sırasıyla verim 16,65'den 2,17'e ve 25,85'den 6,77'e azalmaktadır (Şekil 8.2.).

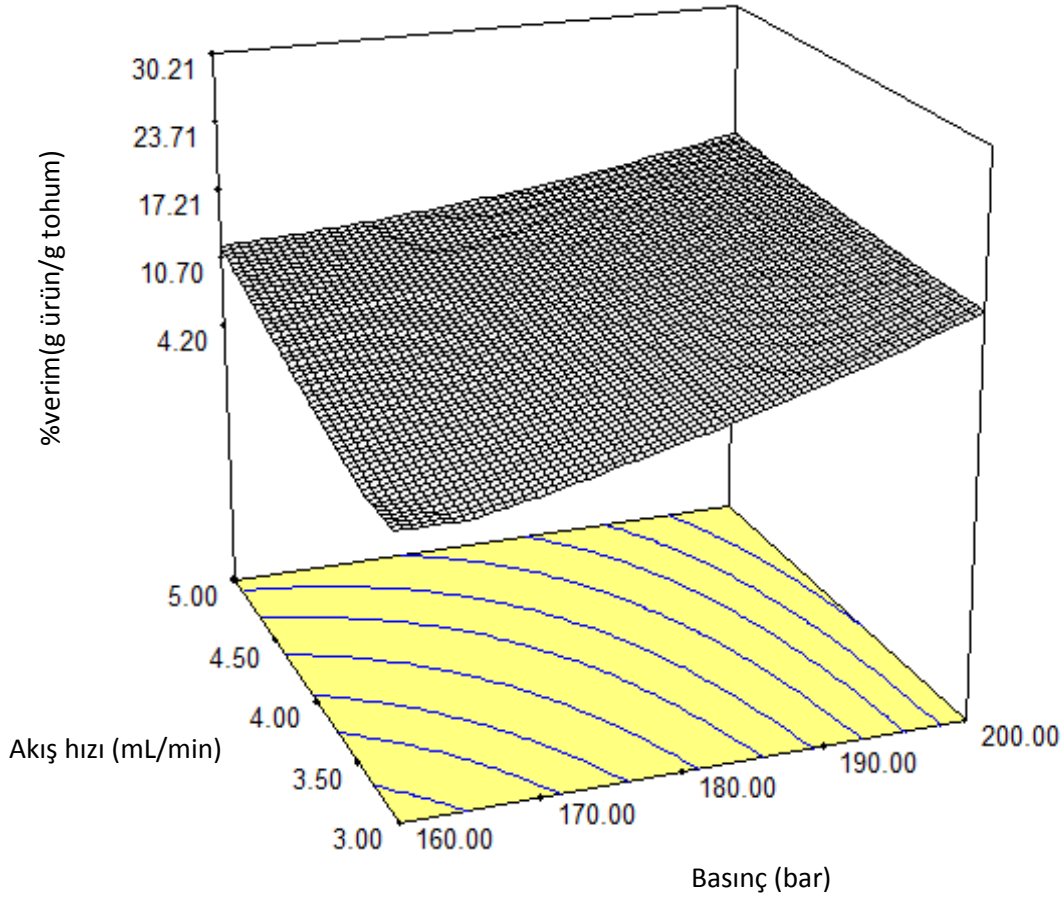
8.2.3. Özütleme sürecine basınç-akış hızı parametresinin etkisi

Deve dikenli tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme sürecine basınç-akış hızı etkisini gözlemlemek amacıyla akış hızı parametresi A=0 olarak kabul edildi. Süreci tanımlayan model'e ait denklem yeniden düzenlenerek eşitlik aşağıda verilmektedir.

$$\% \text{verim} = x_1 * A + x_2 * B + x_3 * C + x_4 * A^2 + x_5 * B^2 + x_6 * C^2 + x_7 * A * B + x_8 * A * C + x_9 * B * C \quad (8.1)$$

$$\% \text{verim} = +10,71 + 3,73 * B + 2,91 * C + 1,33 * B^2 + 0,66 * C^2 - 2,39 * B * C \quad (8.5)$$

Eş 8.5'e bakıldığında tek başına basınç (B) parametresinin önünde bulunan katsayı $x_2 > 0$ ve $x_5 > 0$ olması nedeniyle basınç parametresinin artması deve dikenli tohumunun süperkritik CO₂ ile özütleme verimini artırmaktadır. Bu durum akış hızı (C) parametresi ile benzer özellik göstermekte x_3 ve $x_6 > 0$ olması nedeniyle basınç değerinin artması özütleme verimini artırmaktadır. Basınç-akış hızı ikili etkileşiminin etkisine bakıldığında her iki parametrenin pozitif ya da negatif kodlanmış değerlerinde özütleme verimi azalmaktadır ($x_9 = -2,39 < 0$). Akış hızının minimum değerinde sıcaklık – basınç ikili etkileşiminin verim değerine etkisi Şekil 8.3'de yer almaktadır.

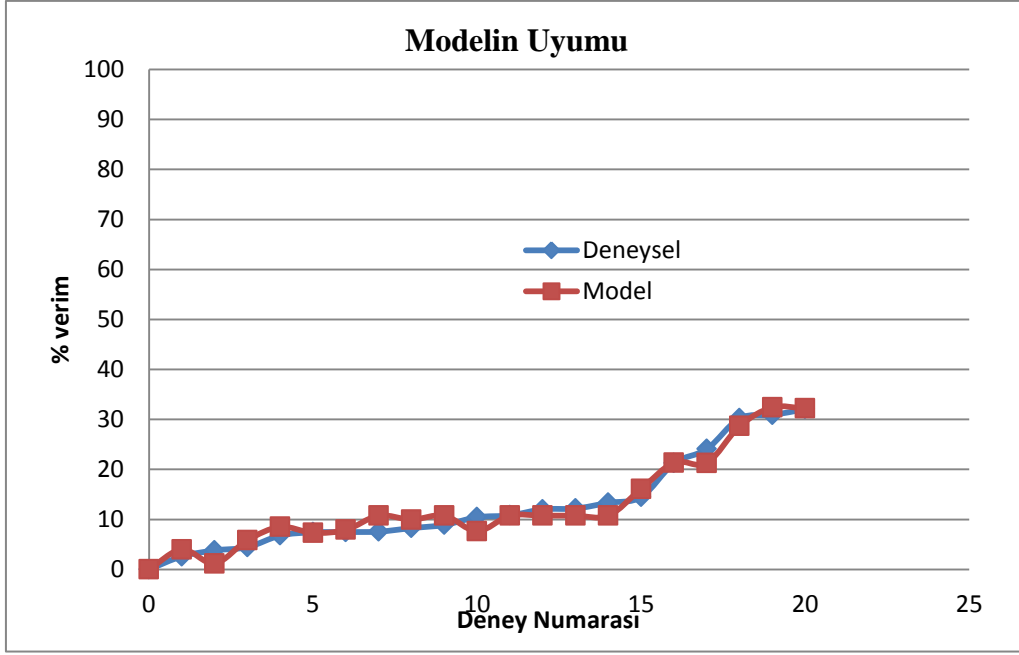


Şekil 8.3. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO₂ ile Özütleme Sürecine Basınç-Akış hızı etkisi (Sıcaklık:40 °C)

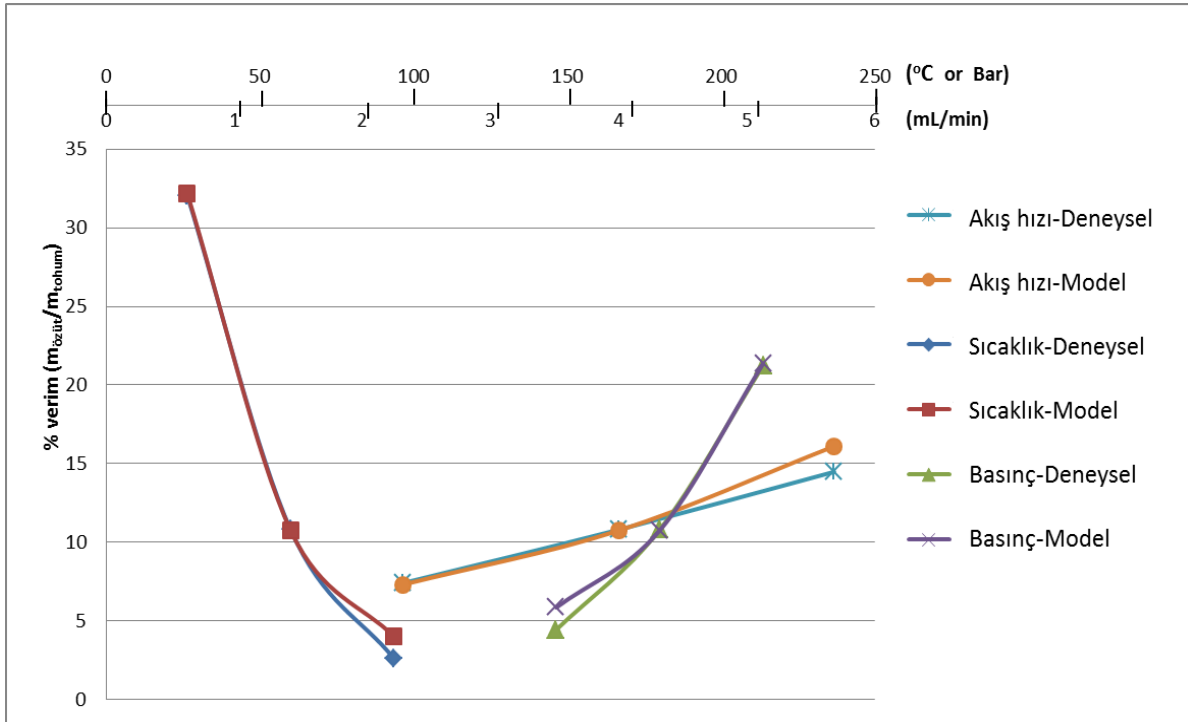
Şekil 8.3 incelendiğinde deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlemesi sürecinde düşük basınç değerlerinde (160 bar) ve yüksek basınç değerlerinde (200 bar) akış hızı 3mL/min'den 5mL/min'e doğru arttıkça özütleme verimide sırasıyla 3,67'den 14,27'ye ve 15,91'den 16,95'e artmaktadır. Yüksek basınç değerlerinde akış hızının özütleme verimi üzerine etkisi düşük basınç değerine göre daha azdır.

8.3. Deve Dikeni Tohumunun Süperkritik CO₂ ile Özütleme Sürecinde Yüzey Cevap Analizi Optimizasyon Sonuçları

Modelin önerdiği algoritma doğrultusunda yapılan 20 adet deneyin sonucunda elde edilen veriler ile oluşturulan modelin aynı koşullarda elde ettiği değerler Şekil 8.4a'da verilmektedir.



(a)



(b)

Şekil.8.4. Yüzey Cevap Yöntemi sonuçları ile deneysel verilerin uyumu ve parametrelerin etkisi

Şekil 8.4.a'dan görüleceği üzere model ile deneysel verilerin sonuçları paralellik göstermektedir. Şekil 8.4.b ise model ve deneysel verilerden faydalanarak sıcaklık, basınç ve CO₂ akış hızı parametrelerinin özütleme verimine etkisi incelendi. Yüksek sıcaklık,

düşük basınç ve yüksek akış hızı değerlerinde önemsiz sapmalar gözlemlendi. Bununla birlikte optimum koşullar düşük sıcaklık, yüksek basınç ve yüksek akış hızı olarak belirlendiğinden bu bölgede model ile deneysel verilerin uyumunun oldukça iyi olduğu görüldü.

Süperkritik CO₂ ile özütleme sürecinde en uygun deney koşullarının belirlenmesine yönelik yapılan Yüzey Cevap Analizi optimizasyon sonuçları Çizelge 8.6'da verilmektedir.

Çizelge 8.6. Optimum deney koşulları

Deney No	Sıcaklık	Basınç	Akış Hızı	% verim (g ürün/ g tohum)
1	40,13	199,83	4,98	32,1864
2	40,06	199,65	4,95	32,1022
3	40,00	200,00	4,81	31,9422
4	40,00	198,60	5,00	31,8898
5	40,86	200,00	5,00	31,6676
6	40,00	200,00	4,60	31,4598
7	40,00	200,00	3,35	29,1365
8	40,05	200,00	3,04	28,6971
9	40,00	199,96	3,00	28,6638
10	40,00	162,50	5,00	21,7391

Çizelge 8.6 incelendiğinde optimum koşullar 40,13 °C sıcaklık, 199,83 bar basınç ve 4,98 mL/min CO₂ akış hızı olarak bulundu. Bu koşullardaki özütleme verimi % 32,19 olarak hesaplandı. Aynı koşullarda yapılan deneyde ise özütleme verimi %30,82'dir. Optimum koşullarda modelin ve deneysel verilerin sonuçlarının uyumlu olduğu görülmektedir.

9. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE SİLYMARİN BİLEŞİKLERİNİN TAYİNİ

Süperkritik CO₂ ile deve dikenî tohumunun özütlenmesi sonucunda elde edilen özüte Bölüm 5.4.1’de belirtilen yöntem uygulandı. Referans çözelti ve elde edilen çözeltinin 490 nm’de absorpsiyonları UV-Vis spektrofotometresi (Analyticjena Specort 200 Spektrofotometer) ile ölçülmüştür. 490 nm’de absorbans değeri 0,395 olarak bulundu. Analizde 1x1cm’lik kuvars küvetler kullanıldı. Bu bölümde Stoiljkovic ve diğerleri (2007) yaptığı çalışma temel alınmıştır. Lambert-Beer yasasından faydalanarak özüt içerisindeki silymarin bileşiklerinin miktarı % silibin olarak hesaplandı.

Beer-Lambert yasası ya da Beer yasası absorplanan türün derişimi ile absorbansı arasındaki lineer ilişkiyi verir. Beer-Lambert yasası aşağıdaki gibi verilebilir.

$$A = \epsilon * b * c$$

Burada A ölçülen absorbans, ϵ ise Molar soğuruculuk (molar ekstinksiyon katsayısı), b ışığın aldığı yol, c ise çözeltinin molar derişimidir. ϵ , belli bir bileşik için belli bir dalga boyunda sabittir ve bir soğurma bandında soğurma en yüksek değeri λ_{max} ‘a (dalga boyu) karşılık ϵ_{max} olarak verilir. ϵ , birim derişimde ($c=1 \text{ mol dm}^{-3}$) çözeltinin birim uzunlukta ($b=1 \text{ cm}$) hücrede olduğu zamanki soğurganlığıdır. Soğurucunun mol kütlesi, M, bilinmiyorsa ve dolayısıyla c Molar derşimi hesaplanamıyorsa ϵ hesaplanamayacaktır. Bu durumda bilinmeyen bir örneğin mor ötesi bir analizi yapılıyorsa %1’lik çözeltinin soğurganlığı $E_{1cm}^{1\%}$ ölçülür ve spesifik soğuruculuk olarak adlandırılır. Spesifik soğuruculuk katsayısı cinsinden eşitlik aşağıdaki gibidir.

$$A = E^{1\%} * b * c$$

Burada c gram cinsinden 100 mL çözeltinin derişimidir.

Lambert Beer eşitliği aşağıdaki gibi yeniden düzenlenirse,

$$c = A / E^{1\%} * b \text{ halini alır.}$$

Seyreltme katsayısı ve gram özüt başına yeniden düzenlenirse,

$$X=A*D/ (E^{1\%}*G*b)$$

Bu eşitlikten faydalanarak (Stoiljkovic ve diğerleri, 2007) özüt içerisindeki silymarin bileşiklerinin miktarı % silibin olarak hesaplandı

$$X=A*D/ (E^{1\%}*G*d)$$

$$X=0,395*25000 / (585*0,8*1)$$

$$X=21,1$$

Bu eşitlikte,

X=% silibin içeriği

d= Küvetin kalınlığı, cm

A= 490 nm'deki ölçülen absorbans

E^{1%}= spesifik absorbans katsayısı=585

D= Seyreltme katsayısı=25000

G= Örneğin kütlesi (g)'dir.

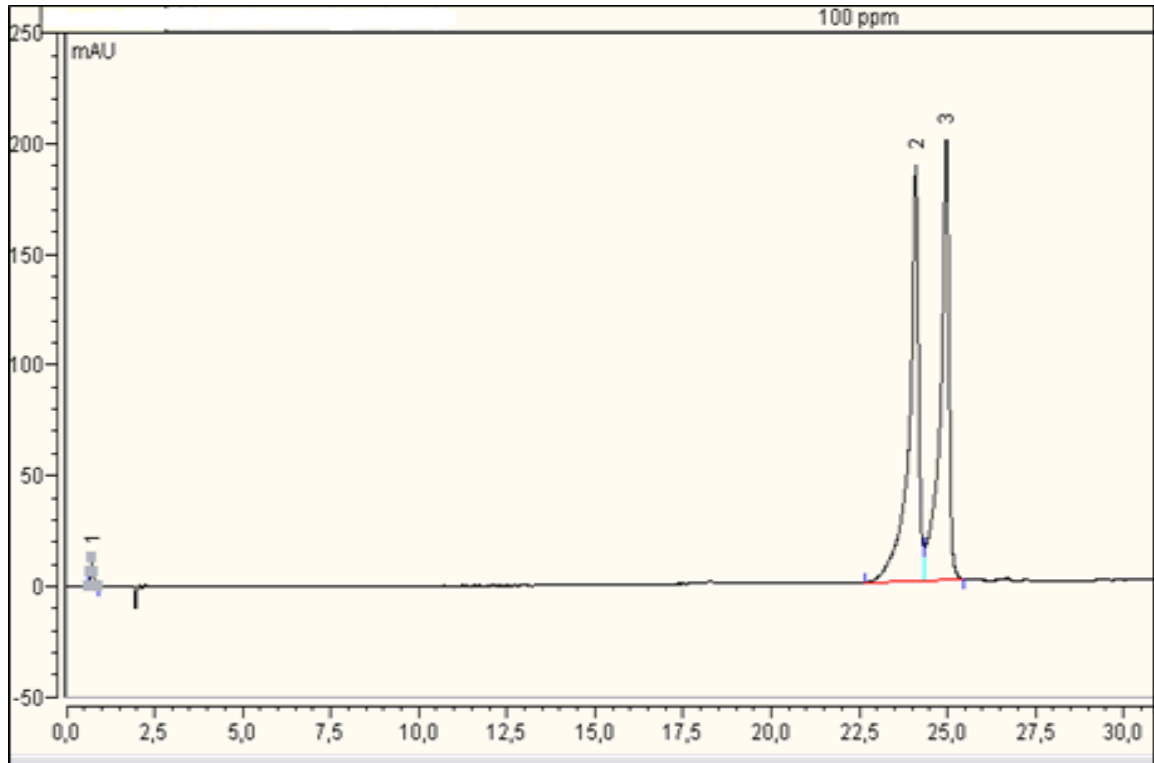
Yukarıda belirtilen eşitlikte 1 mL (0,8 g) kullanılan örnek içerisinde %21 oranında silymarin bileşiklerinin olduğu belirlendi. Silymarin bileşikleri 6 temel bileşikten oluşmaktadır. Bu bileşiklerin izomer ve diastereomerik yapılarıyla birlikte 16 adet bileşiğin olduğundan bahseden kaynaklar da mevcuttur (Corchete 2008).

10. SÜPERKRİTİK CO₂ İLE ÖZÜTLENEN NUMUNELERİN HPLC ANALİZ SONUÇLARI

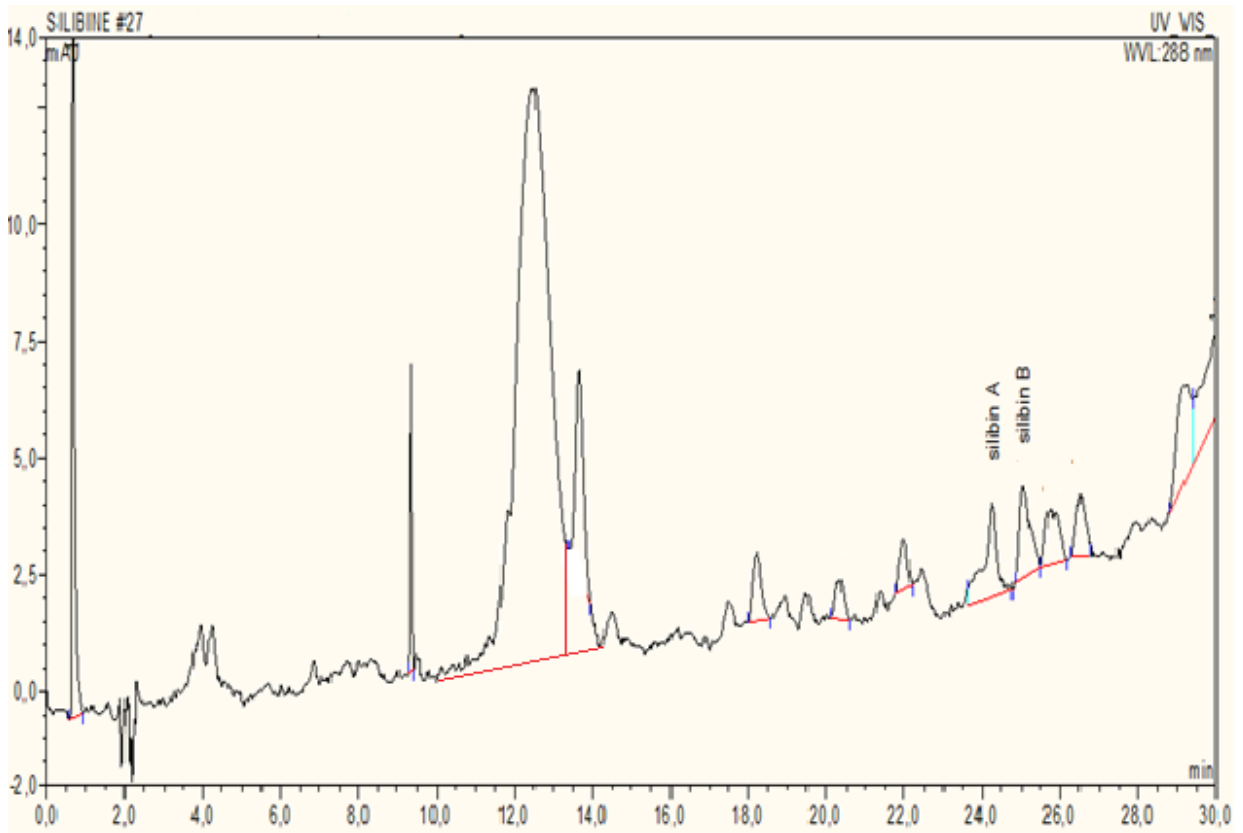
Deve dikeninden süperkritik CO₂ ile özütlenen numune içerisindeki silibin A ve silibin B bileşiklerinin analizinin yapılabilmesi için öncelikle analiz koşullarının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Taşıyıcı faz akış hızı, türü, yüzde bileşiminin etkisi ve numunenin seyreltme etkisi gibi analizi etkileyen başlıca parametreler araştırıldı. Analiz yöntemi silibin A ve silibin B bileşiği standardından faydalanarak oluşturuldu. HPLC saflığındaki metanolde hazırlanmış 100 ppm'lik Silibin A ve B standart maddesi 5.bölümde belirtilen koşullarda analizlendi. Silibin A ve silibin B bileşiklerine ait piklerin anlamlı olarak ayrıldığı görüldü. 5-25 ppm aralığında silibin A ve silibin B bileşiklerine ait kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Standartların hazırlanmasına ait hesaplamalar, elde edilen kromatogramlar ve kalibrasyon grafikleri EK-4 ve EK-5'de verilmektedir.

Ancak süperkritik CO₂ ile elde edilen numune içerisinde birçok bileşiğin bulunması analizi zorlaştırmaktadır. Bu sebeple numuneye analiz öncesinde ön işlemler yapıldı. HPLC ile belirtilen çalışma koşullarında analizlendi ve piklerde anlamlı bir ayrılma gözlemlendi. Elde edilen kromatogram Şekil 10.1'de verilmektedir.

Şekil 10.1 a ve b'de yer alan kromatogramlar incelendiğinde 23,8-25,9 min zaman aralığında silibin A ve silibin B piklerinin geldiği ve net bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Numune içerisinde yer alan yağimsı bileşiklerin ortamdan uzaklaşarak matriksden gelen olumsuzlukların ortadan kaldırıldığı görüldü.



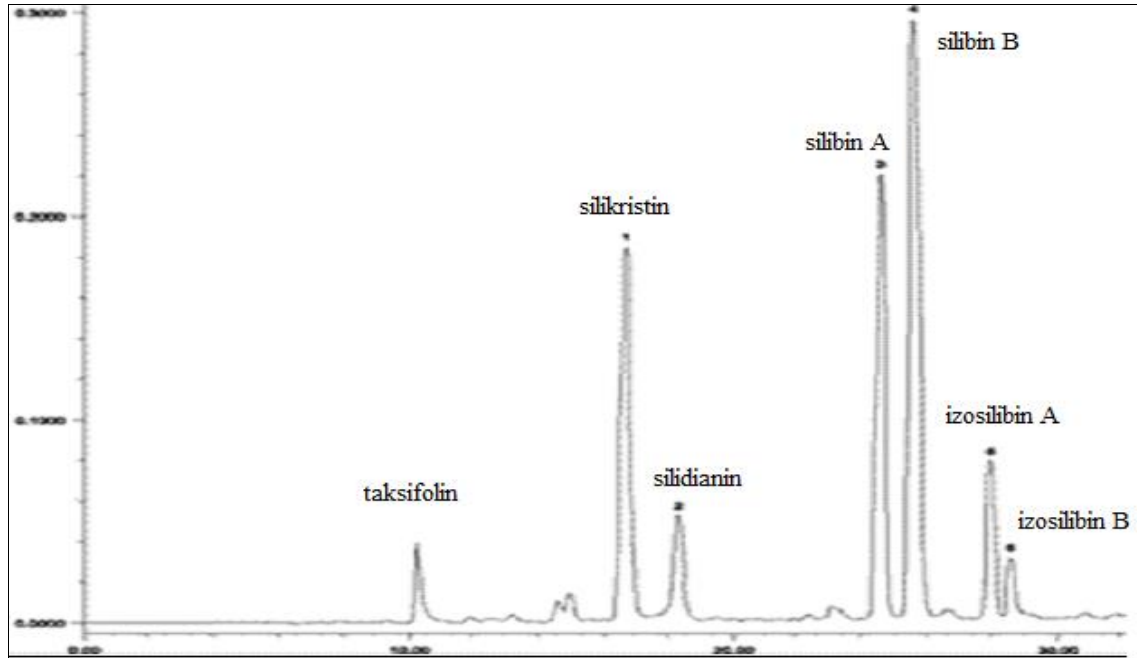
(a)



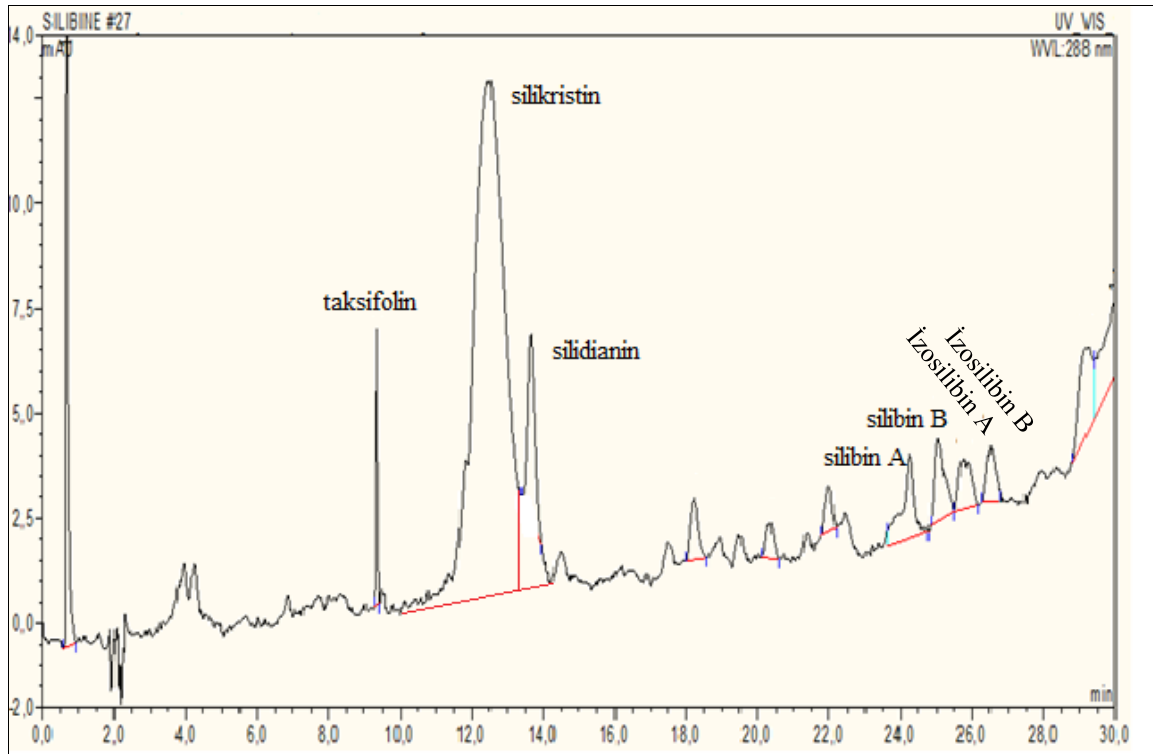
(b)

Şekil 10.1. Silibin A ve Silibin B bileşiği standardına (a) ve ön işlem uygulanmış numuneye (b) ait kromatogramlar

Literatürde başka bir kolon ile silymarin bileşiklerinin HPLC analizi gerçekleştirilmiş ve kromatogram sonucu Şekil 10.2’de verilmiştir (Phenomenex, 2012). Bu kromatogramdan faydalanarak elde ettiğimiz HPLC analiz sonuçları karşılaştırıldı.



Şekil 10.2. Phenomenex-C18 HPLC silymarin bileşikleri kromatogramı



Şekil 10.3. Ön işlem uygulanmış numuneye ait kromatogramın literatür verilerine göre adlandırılmış hali

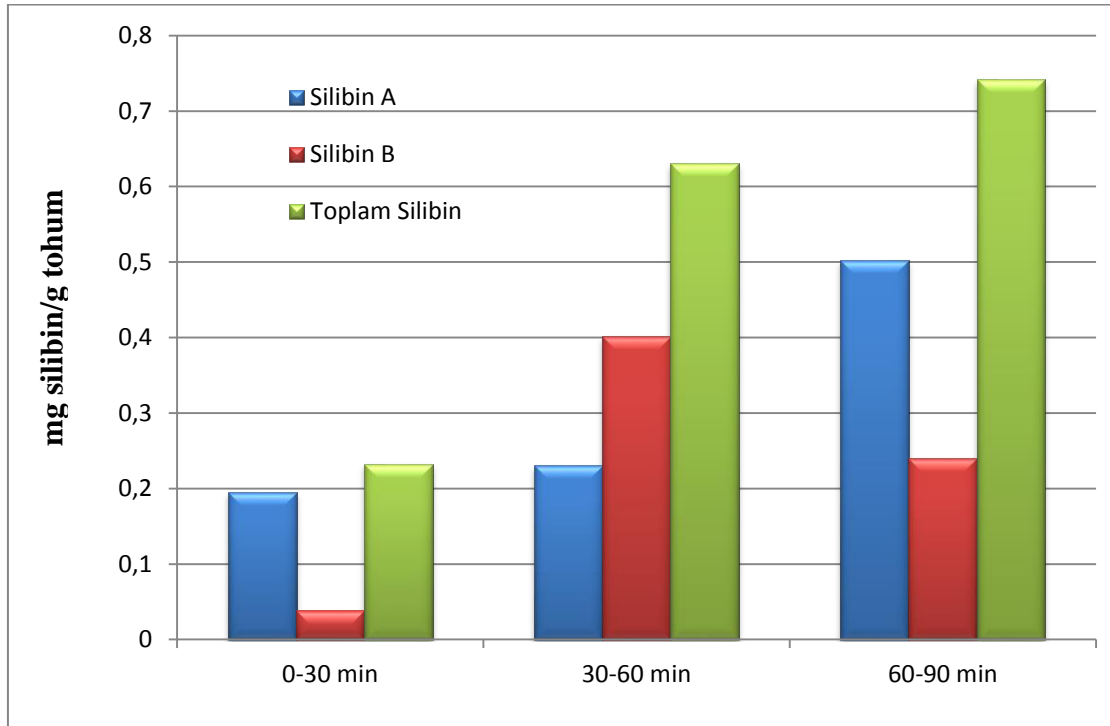
Şekil 10.2 'den de görüldüğü üzere silymarin bileşikleri taksifolin, silikristin, silidianin, silibin A, silibin B, izo silibin A, izosilibin B sırasıyla gelmektedir (Phenomenex, 2012). Benzer yaklaşım yapıldığında 9 min'de gelen pikin taksifolin, 11,5-13,5 min zaman aralığında görülen pikin silikristin, 13,5-14 min zaman aralığında gelen pikin ise silidianin olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 10.3). 25,9-26,9 min zaman aralığında ardarda gelen iki pikin ise; silibinlerin izomeri olan izosilibin A ve izosilibin B olduğu düşünülmektedir.

11. SÜPERKRİTİK CO₂ ÖZÜTLEMESİ İLE DEVE DİKENİNDEN SİLİBİN ELDE EDİLMESİNE ÇALIŞMA PARAMETRELERİNİN ETKİLERİ

Bu bölümde deve dikeninden özütlenen silibin A ve silibin B bileşiklerinin verimi üzerine özütleme süresi, sıcaklık, basınç, CO₂ akış hızı ve tanecik büyüklüğü parametrelerinin etkisi incelendi. Elde edilen bulgular aşağıda detaylı olarak sunulmaktadır.

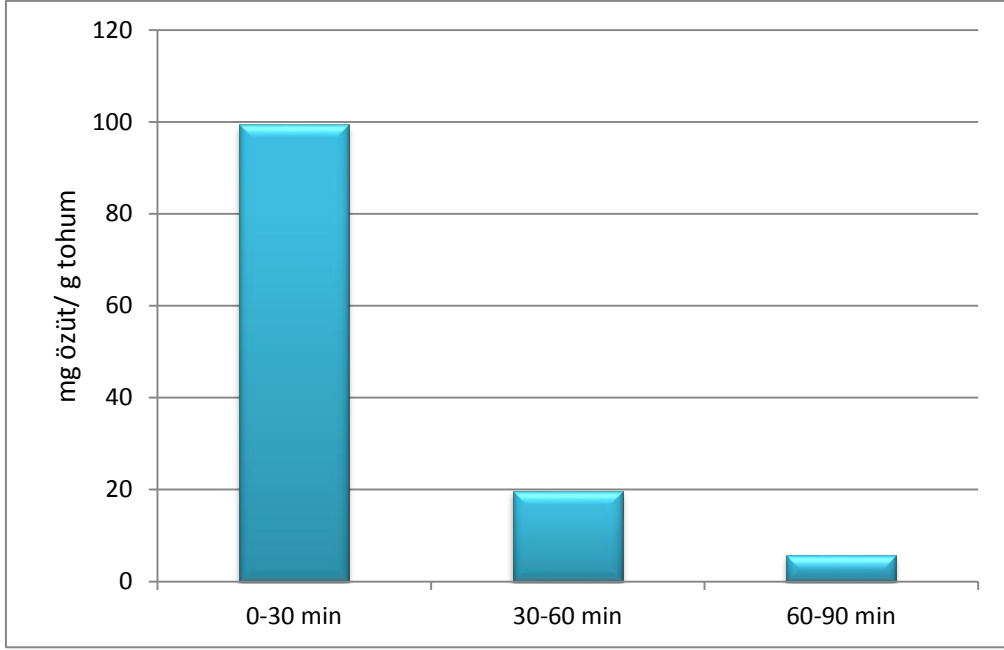
11.1. Özütleme Süresinin Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi

Sıcaklık 40 °C, basınç 200 bar, tanecik büyüklüğü 0,925 mm, karbon dioksit akış hızı 4 mL/min olarak sabit tutuldu. Özütleme süresinin verime etkisini belirlemek üzere 30 dakikalık aralıklar ile örnek alınmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 11.1).



(a)

Şekil 11.1. Özütleme süresinde elde edilen a) mg silibin/g tohum verileri b) mg özüt/g tohum verileri



(b)

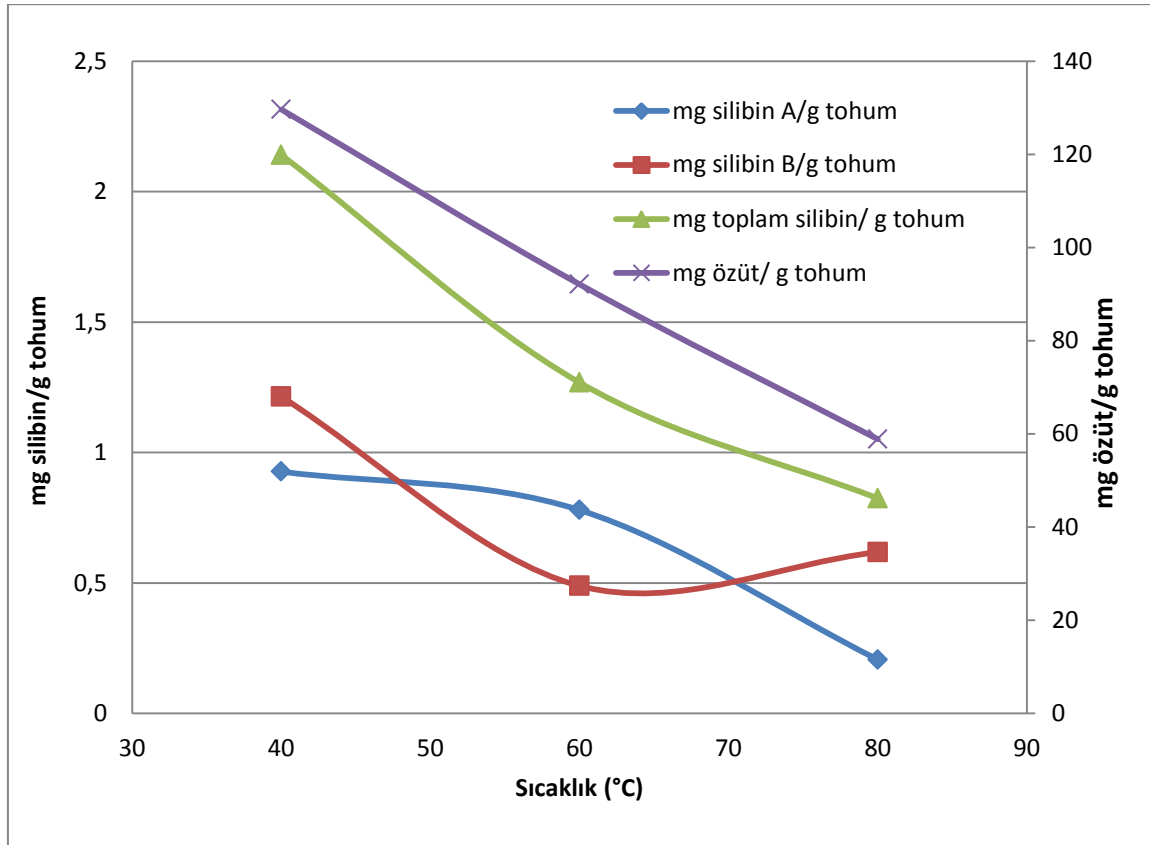
Şekil 11.1. (Devam) Özütleme süresinde elde edilen a) mg silibin/g tohum verileri b) mg özüt/g tohum verileri

Şekil 11.1.a'da yer alan çubuk grafiği incelendiğinde toplam silibin miktarında sürekli olarak bir artışın meydana geldiği görüldü. En fazla silibin ise 60-90 min aralığında geldiği belirlendi. Aynı durum silibin A bileşiği içinde geçerlidir. Silibin A bileşiğinin miktarında ilk 30 dakikalık periyottan üçüncü 30 dakikalık periyota çıktığında %62'lik bir artış gözlemlendi. Silibin B bileşiğinin miktarı ilk 30 dakikada oldukça düşük olmasına rağmen, ikinci 30 dakikalık periyotta %91'lik bir artış gözlemlendi. Üçüncü 30 dakikalık periyotta ise %40'luk bir azalma söz konusudur.

Şekil 11.1.b' de ise özütleme süresinde elde edilen mg özüt/g tohum verileri yer almaktadır. Zamanla alınan özüt miktarının özütleme sürecinin sonuna doğru azalmasına rağmen toplam silibin miktarının arttığı görüldü. Deve diken tohumları içerisinde silymarin bileşikleri haricinde uçucu yağlar, apijenin, musilaj, quercetin, acı maddeler vb. gibi pek çok bileşik yer almaktadır (Corchete 2008). Özütleme sürecinin başında özüt içerisinde yer alan silymarin haricindeki diğer bileşiklerin geldiği, sürecin ilerleyen aşamalarında ise silymarin bileşiklerinin baskın olarak geldiği ön görülmektedir.

11.2. Sıcaklığın Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi

Deneyleler 40, 60, 80 °C olmak üzere farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Basınç 200 bar, tanecik büyüklüğü 0,925 mm, karbon dioksit akış hızı 4 mL/min olarak sabit tutuldu (Şekil 11.2).



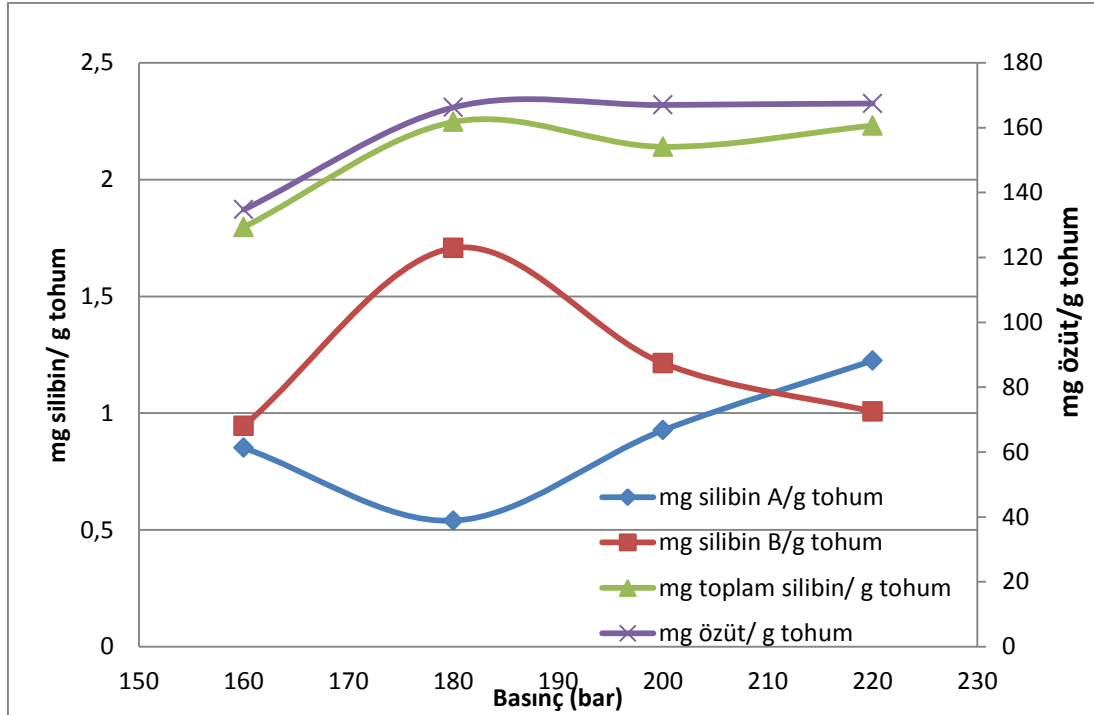
Şekil 11.2. Sıcaklığın silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, basınç:180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

120 dakikanın sonunda elde edilen ürün miktarları dikkate alındığında 40 °C’de silibin A, silibin B ve toplam silibin miktarının en fazla miktarda elde edildiği görülmektedir. Toplam silibin miktarı ile farklı sıcaklıklara karşı elde edilen özüt miktarları karşılaştırıldığında, hem özüt miktarının hem de toplam silibin miktarının sıcaklığın azalmasıyla artmaktadır (Şekil 11.2). Sıcaklık 80 °C ’den 40 °C ’ye düştüğünde karbon dioksitin yoğunluğu %29 artmıştır. CO₂’in yoğunluk etkisi baskın gelmekte, sıcaklık parametresi silibin bileşiklerinin verimini olumsuz yönde etkilemektedir.

Duan ve diğeri (2004) silymarin bileşiklerinin soksile yöntemiyle özütlemesine sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Özütleme işleminde suyu çözücü olarak kullanmışlardır. 100, 120 ve 140 °C sıcaklıklarda gerçekleştirdikleri deneylerde sıcaklık arttıkça silymarin bileşiklerinin bozunduğunu bulmuşlardır. Xin ve diğeri (2008) mikrodalga yöntemiyle silymarin bileşiklerinin üretimine flavonoid kararlılığı, mikrodalga gücü ve etanol miktarı gibi parametrelerin etkisini incelemişlerdir. Gerçekleştirdikleri deneysel verilerden sıcaklığın 130 °C'nin üzerine çıkmasıyla silymarin bileşiklerinin bozunduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla daha düşük sıcaklıklarda çalışmak verimi artırıcı etki göstermektedir. Deve dikenini tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlemesi, diğeri çalışmalar ile kıyaslandığında en düşük çalışma sıcaklığının bu yöntem ile elde edildiği belirlenmiştir. Süperkritik CO₂ ile özütlemeye silibin bileşiklerinin bozunması minimum seviyeye inmiştir. Bununla birlikte düşük sıcaklık enerjiden tasarruf sağlamak ve maliyeti azaltmaktadır.

11.3. Basıncın Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi

Süperkritik CO₂ özütlemesi ile deve dikenini tohumundan silibin elde edilmesi çalışmasında basıncın etkisi incelendi. 160, 180, 200 ve 220 bar basınç değerlerinde deneyler gerçekleştirildi. Bu aşamada karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40°C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika olarak sabit tutuldu. Elde edilen bulgular Şekil 11.3'de verilmektedir.



Şekil 11.3. Basıncın silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (Karbon dioksit akış hızı 4 mL/min, sıcaklık 40 °C, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

Şekil 11.3'de elde edilen bulgular incelendiğinde basıncın 160 bardan 180 bara çıkması durumunda toplam silibin veriminde artış gözlemlendi. 180 bar sonrasında ise toplam silibin miktarında önemli bir değişiklik söz konusu değildir. Toplam silibin miktarlarının eğrisi ile farklı basınçlara karşı elde edilen özüt miktarları eğrisi paralellik göstermektedir (Şekil 11.3). CO₂'in yoğunluğu artmasından dolayı verimin arttığı ve silibin bileşikler özütlenen maddeler ile birlikte geldiği belirlendi.

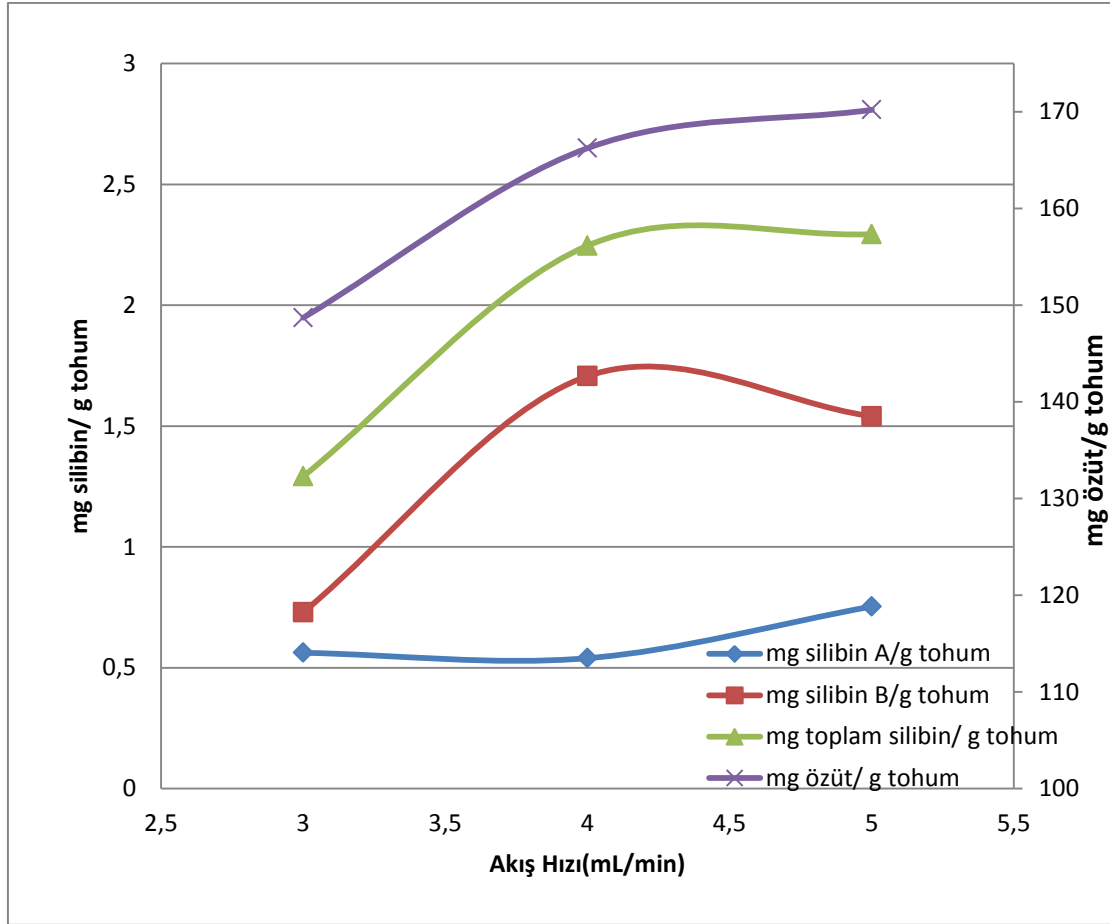
Silibin A ve silibin B eğrileri incelendiğinde ise, basınç 160 bardan 180 bara çıktığında silibin A azalırken, silibin B'nin arttığı, 180 bardan 220 bar çıktığında ise sürecin tam tersi yönde geliştiği görüldü. Silibin bileşiklerinden biri artarken diğerinin azaldığı görüldü. Silibin A ve silibin B bileşikler birbirlerinin diastereomeridir ve koniferil alkol ile taksifolinin reaksiyonundan sentezlendiği literatürden görülmüştür. Ortamın sıcaklık ve basınç etkisine göre silibin bileşiklerinden birinin diğerine göre baskın olarak oluşabileceği ya da birbirlerine dönüşebileceği düşünülmektedir. Wallace ve Carrier (2008) yaptığı çalışmada deve diken tohumundan silibin elde etme koşulları üzerinde değişiklik yapıldığında silibin oranı değişmektedir. Etanolde özütleme yapıldığında silibin A/silibin B oranı 0,6 olarak bulunurken, metanolde özütleme yapıldığında silibin A/silibin B oranı 1 olarak bağlı olarak bulunmuştur. Bu çalışmada da benzer durum basınç ve sıcaklık

parametresi için geçerli olup, sıcaklık parametresinin yaptığı etki basınç etkisi kadar belirgin değildir.

Literatürde süperkritik CO₂ ekstraksiyon yöntemiyle silibin eldesi çalışması rastlanılmamasından dolayı kullandığımız laboratuvar sisteminde gerçekleştirilen başka maddeler ile basınç etkisi karşılaştırılmıştır. İçen ve Gürü (2010) çay sapı ve lifi atıklarından süperkritik CO₂ özütlemesi ile kafein eldesine basınç parametresinin etkisini incelenmiştir. Basınç 250 bara kadar artırıldıkça kafein verimi artmış, bu değerler üzerindeki değerlerde ise verimde fazla bir değişikliğin olmadığını bulmuşlardır. Dolayısıyla basıncın belirli bir değere kadar artırılarak çalışılabilmesi verimin artmasına yol açmaktadır.

11.4. Akış Hızının Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi

Deve dikeni tohumunun süperkritik CO₂ özütlemesi sürecine akış hızının etkisi 3, 4 ve 5 mL/min değerleri için incelendi. Değişen akış hızı değerlerine göre elde edilen bulgular Şekil 11.4'de verilmektedir.



Şekil 11.4. Akış hızının silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

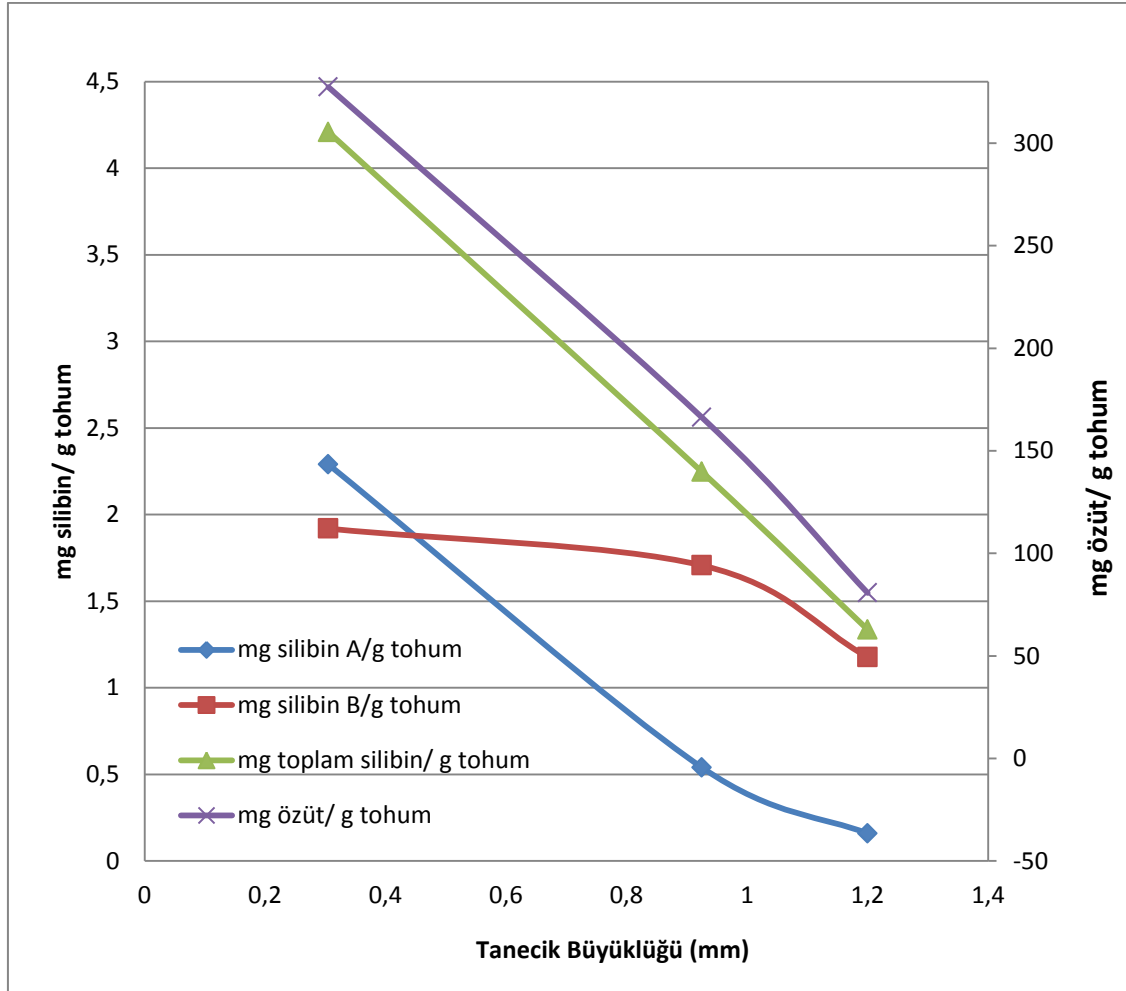
Şekil 11.4'den de görüldüğü gibi CO₂ akış hızı 3 mL/min'den 4 mL/min'e çıkarıldığında toplam silibin miktarında belirgin bir artış söz konusudur. Ancak akış hızı 4 mL/min'den 5 mL/min değerine çıktığında ise toplam silibin veriminde bir artış yoktur. Akış hızı etkisi süreci iki şekilde etkilemektedir. CO₂ akış hızının artması özütleme haznesi içindeki girdapların artmasına, katı ile akışkan arasında film kalınlığının azalmasına neden olmaktadır. Bu durumun sonucunda verim artmaktadır. Akış hızı artıkça aynı etki katı ve akışkan arasında etkileşim süresini kısaltmakta ve verimi azaltmaktadır. Çözücü akış hızının sürece etkisi katı madde yapısı ile yakından ilgilidir. Akış hızı 3 mL/min'den 4 mL/min'e kadar çıkartıldığında katı ile akışkan arasındaki film kalınlığı azaldığından dolayı toplam silibin verimi artmaktadır. Akış hızı 4 mL/min'den 5 mL/min çıktığında ise film kalınlığı azalırken, deve diken tohumu ve CO₂ arasında etkileşim süresi kısaltmakta, toplam silibin verimi fazla etkilenmemektedir.

Toplam silibin miktarlarının eğrisi ile farklı akış hızlarında elde edilen özüt miktarları eğrisi paralellik göstermektedir (Şekil 11.4). Silibin A ve silibin B eğrileri ayrı ayrı incelendiğinde ise akış hızı 3 mL/min'den 4 mL/min'e çıkarıldığında silibin B artarken, silibin A bileşiğinde herhangi bir değişiklik yoktur. Akış hızı 4 mL/min'den 5 mL/min çıktığında ise Silibin A bileşiği bir miktar arttığı ve silibin B bileşiği ise azalmaktadır. Silibin A bileşiği incelenecek olursa; akış hızı arttıkça dış kütle transfer direncinin Silibin A bileşiği için etkili olduğu ve verimin arttığı görüldü. Silibin B bileşiği incelendiğinde 3-4 mL/min akış hızı aralığında dış kütle transfer direnci etkili oluken, 4-5 mL/min aralığında CO₂'in silibin B bileşiği ile temas süresi azaldığından, bu etki diğer etkiye göre baskın gelmekte silibin B verimini olumsuz yönde etkilemektedir.

Literatürde süperkritik CO₂ ekstraksiyon yöntemiyle silibin eldesi çalışması rastlanılmamasından dolayı kullandığımız laboratuvar sisteminde gerçekleştirilen başka maddeler ile akış hızı etkisi karşılaştırılmıştır. İçen ve Gürü (2010) çay sapı ve lifi atıklarından süperkritik CO₂ özütlemesi ile kafein eldesine CO₂ akış hızı parametresinin etkisini incelenmiştir. Akış hızı 11 g/min'e kadar artırıldıkça kafein verimi artmış, bu değerler üzerindeki akış hızlarında ise verimde fazla bir değişikliğin olmadığını bulmuşlardır. Dolayısıyla akış hızının belirli bir değere kadar artırılarak çalışılabilmesi verimin artmasına yol açmaktadır.

11.5.Tanecik Büyüklüğünün Silibin Bileşiklerinin Verimine Etkisi

Tanecik büyüklüğünün özütleme sürecine etkisinin incelendiği çalışmada, 0,3025; 0,925 ve 1,2 mm olmak üzere üç farklı tanecik büyüklüğünde çalışıldı (Şekil 11.5).



Şekil 11.5. Tanecik büyüklüğünün silibin bileşiklerinin verimi üzerine etkisi (sıcaklık 40 °C, basınç 180 bar, ortalama tanecik büyüklüğü 0,925 mm, özütleme süresi 120 dakika)

Şekil 11.5 incelendiğinde tanecik büyüklüğünün küçülmesi ile toplam silibin veriminin arttığı belirlendi. 120 dakikanın sonundaki değerler dikkate alındığında tanecik boyutu 1,2 mm'den 0,3025 mm'ye azaltıldığında toplam silibin verimi %68 artmaktadır. Tanecik büyüklüğünün küçülmesi ile aktarım yüzey alanının arttığı, kütle aktarım dirençlerinin azaldığı ve küçültme esnasında yapıdaki hücrelerin bir kısmının bozulması sonucunda silibin bileşiklerinin serbest kaldığı sonucuna varıldı. Silibin A ve Silibin B bileşikleri ise incelendiğinde tanecik büyüklüğü 1,2 den 0,3025 azaltıldığında Silibin A ve Silibin B bileşiği miktarları sırasıyla 0,16 ve 1,18 mg/g tohumdan 2,29; 1,92 mg/g tohuma artmıştır. Burada silibin A'nın Silibin B ye göre daha fazla arttığı görülmektedir.

Literatürde süperkritik CO₂ özütleme yöntemiyle silibin eldesi çalışması rastlanılmamasından dolayı kullandığımız laboratuvar sisteminde gerçekleştirilen başka

maddeler ile tanecik boyutu etkisi karşılaştırılmıştır. Ekinci (2013) kavun ve şeftali çekirdeklerinin süperkritik CO₂ özütlemesini çalışmıştır ve verimine tanecik büyüklüğü parametresinin etkisini incelemiştir. Kavun çekirdeği tanecik büyüklüğü 1,7 mm'den 0,4 mm'ye küçültüldüğünde fitosterol verimi %109 artmıştır. Şeftali çekirdeğinde ise tanecik büyüklüğü 1,7 mm'den 0,3 mm'ye küçültüldüğünde β -sitosterol verimi %6 artmıştır.

Literatür ve yapılan deneysel çalışmaların sonucunda; küçük tanecik büyüklüğünde çalışılmasının verimi artmasına yol açmaktadır.

11.6. Genel Optimizasyon Sonuçları

Deve dikeni tohumu ile süperkritik CO₂ özütleme sürecine; sıcaklık, özütleme süresi basınç, CO₂ akış hızı ve tanecik büyüklüğü parametrelerinin özütleme verimi, silibin A, silibin B ve toplam silibin verimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Özüt içerisindeki silibin A ve silibin B bileşiklerinin miktarları HPLC ile analiz edildi. Zamanla alınan deve dikeni tohumu özütü verilerinden düşük sıcaklık ve tanecik boyutunda, yüksek basınç ve akış hızında özüt veriminin ve toplam silibin miktarının belirgin şekilde arttığı görülürken, silibin A ve silibin B bileşiklerinin düşük sıcaklık ve tanecik boyutu, yüksek akış hızı çalışma parametrelerinden olumlu olarak etkilendiği belirlendi.

Deve dikeni tohumundan elde edilen özüt ve silibin miktarları için uygun parametre değerleri ve bu değerlerdeki özüt ve silibin bileşiklerinin miktarları Çizelge 11.1'de verildi.

Çizelge 11.1. Deve dikenini tohumundan elde edilen özüt ve silibin miktarları için uygun parametre değerleri ve bu değerlerdeki özüt ve silibin bileşiklerinin miktarları

Çalışılan parametre aralıkları ve optimum değerler				Özütleme Sonuçları		
Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	CO ₂ Akış Hızı (mL/min)	Tanecik Büyüklüğü (mm)	Özüt miktarı (mg özüt/g tohum)	Silibin A miktarı (mg/g tohum)	Silibin B miktarı (mg/g tohum)
40 °C	180 bar	4 mL/min	0,3025 mm	327	2,29	1,92
40-80	160-220	3-5	0,3025-1,2			

Literatürde deve dikenini tohumu içerisinde %1,5-3 oranında flavolignan olduğu belirtilmiştir. Yine literatüre göre flavolignan bileşiklerinin çoğunu ise silymarin bileşiklerinden meydana gelmektedir ve silymarin bileşiklerinin %50'sini silibin, %20-30'unu ise silikristin ve silidianin bileşiklerinden oluşmaktadır (Corchete, 2008). Bu veriler dikkate alındığında flavolignan bileşiklerinin yarısının silymarin bileşiği olduğu kabul edilirse 1 g deve dikenini tohumunda 3,75-7,5 mg aralığında silibin olduğu tahmin edilmektedir. Silibin bileşiklerinin silibin ve izosilibin bileşiklerinden oluşmaktadır ve silibin/izosilibin oranı 1 olduğu kabulü yapılırsa silibin A ve silibin B bileşiklerinin toplam miktarı teorik olarak 1,875-3,75 mg aralığında olması beklenir. Bu değer bitkinin yetiştiği iklim koşullarına göre ve yukarıda yapılan kabullere göre değişiklik gösterebilir. Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen deneylerin sonuçlarından silibin A ve silibin B bileşiklerinin toplamı 4,21 mg/g tohum olarak bulunmuştur.

Silibin bileşiklerinin eldesi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar çoğunlukla soksile gibi klasik yöntemleri içermektedir. Mikrodalga ve ultrasound gibi soksile özütlemesi haricinde birkaç yöntemde mevcuttur. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde; özütleme süresi 4 ile 28 saat arasında değişmektedir. Bu çalışmada ise özütleme süresi 2 saat olarak

bulunmuştur. Özütleme süresi süperkritik CO₂ özütleme yöntemi ile 2-14 kat aralığında kısalmıştır.

Çalışmaların çoğunda silibin bileşikleri; silibin A ve silibin B olarak belirtilmemiş, silibin miktarı olarak verilmiştir. Literatürde 6 çeşit Silibin bileşiği (silibin A, silibin B, izosilibin A, izosilybin B, 2,3-cis-silybin A, 2,3-cis-silybin B) yer almaktadır (Yan-ze L., Yue-wie L., D., 2012). Yapılan klinik çalışma ve değerlendirmelerinde silibin A ve silibin B bileşiklerinin oldukça aktif özellik gösterdiği belirtilmektedir (Gazák, Walterová ve Kien, 2007, Agarwal 2006). Bu sebeple özütleme işleminin en önemli basamağı olarak elde edilen özüt içerisindeki silibin A ve silibin B bileşiklerinin toplamda değil ayrı ayrı miktarı bilinmelidir. Yapılan bu çalışmada silibin A ve silibin B miktarı sırasıyla 1,9 ve 2,2 mg/g tohum olarak bulunmuştur.

Literatürde soksile yöntemiyle silibin A ve silibin B bileşiklerinin eldesi çalışmalarının çoğunda; tohumdan yağ uzaklaştırılarak silibin verimi artırılmaya çalışılmıştır (Wallace ve Carrier, 2008). Yağın ve silymarin bileşiklerinin tohumdan uzaklaştırılması için iki ayrı çözücü kullanılmıştır. İlk özütleme ile yağ uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan tohum oda koşulları sıcak hava vb. yöntemlerle kurutulduktan sonra ikinci özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. İki çözücünün de elde edilen özütten uzaklaştırılması gerekmekte, ayrıca saflaştırma yöntemi gerekmektedir. Bütün bu işlemler ekstra maliyet getirmektedir. Deve diken tohumunun %20-30 yağlı bileşikler oluşturmaktadır. Literatürde yeralan bazı çalışmalarda silibin bileşiklerinin verimi yağı alınmış olan tohum üzerinden hesaplanılarak verilmektedir. Buna bağlı olarak, yağ miktarı tohumdan çıkartıldığı için silibin verimi yağlı tohum ile yapılan çalışmalara göre silibin miktarı aynı bile olsa daha yüksek çıkmaktadır. Genellikle soksile ile yapılan özütlemelerde kullanılan çözücü özütten tamamıyla uzaklaştırılmamaktadır. Özütleme için kullanılan çözücüler petrol eteri, etil asetat, metanol, etanol, aseton, NaOH, H₂SO₄ olarak sıralanabilir (Corchete, 2008; Subraman, am, Vaughn, Carrier ve Calausen 2008). İlaç etken maddesi olarak kullanılan ve karaciğeri zehirli maddelerden koruyan Silibin A ve Silibin B bileşiklerinin çevresel olarak zararlı olan özütleme çözücülerinden tamamıyla uzaklaştırılmalıdır. Deve diken tohumundan Süperkritik CO₂ ile silibin A ve silibin B bileşiklerinin eldesinde özütleme çözücüsü olarak kullanılan CO₂ özüt içerisinde kalıntı bırakmamakta, tamamıyla uzaklaştırılmaktadır. Mikrodalga ve ultrasound gibi yöntemler ile silibin bileşiklerinin eldesinde, mikrodalga ve ultrasound dalgaları yine çözücü içerisinde yeralan tohumlara gönderilmektedir (Xin,

2008, Çağdaş ve diğerleri 2011). Özütleme verimini kullanılan yöntemin etkilediği kadar çalışılan işletme koşulları da etkilemektedir. Özellikle işletme sıcaklığı ürün verimini oldukça etkilemektedir.

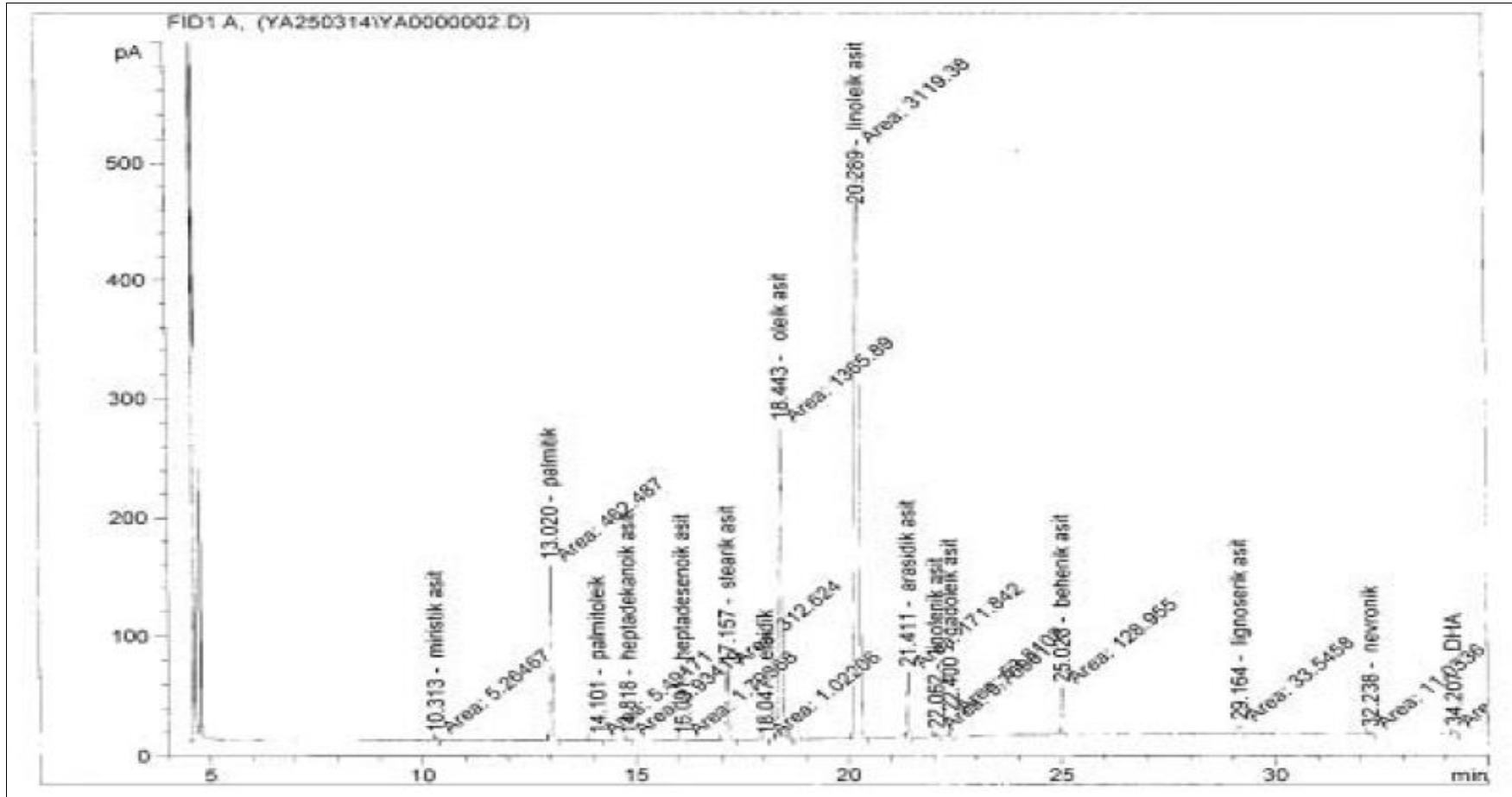
Soksile, mikrodalga gibi yöntemlerde kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığı ya da daha yüksek sıcaklıklar kullanılmaktadır. Literatürden sıcaklık artıkça silymarin bileşiklerinin bozunduğu bilinmektedir (Duan, 2004; Xin, 2008). Ayrıca yüksek sıcakta özütlemenin gerçekleştirilmesi maliyeti de artırmaktadır. Deve dikenini tohumundan Süperkritik CO₂ ile silibin A ve silibin B bileşiklerinin eldesinde ise 40°C 'de silibin bileşikleri elde edilmesi bu yöntemin avantajlarındanıdır.

Atmosferik koşullara göre yüksek basınç değerinde çalışılması CO₂ yoğunluğunu değiştirdiğinden özütleme işlemi için önemli bir basamak olan çözme gücünde değişmektedir. Bu durumun sonucunda silibin verimi de önemli ölçüde etkilenmektedir. Akış hızı parametresi deve dikenini tohumunun dış film transfer katsayısının azalmasını sağlayarak başlangıç hızını artıran etki göstermektedir. Deve dikenini tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlemesinde tanecik boyutu küçültülmesi silibin verimini önemli ölçüde etkilemektedir. Gözeneğin iç kısımlarında da bulunduğu tahmin edilen silibin A ve silibin B bileşiklerinin verimini artıran ve özütlemeyi kolaylaştıran parametredir.

12. ÖZÜT İÇERİSİNDEKİ YAĞLARIN TAYİNİ

Deve dikenî tohumunun süperkritik CO₂ ile özütlemesi tez konusu kapsamında yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen özüt içerisinde silymarin bileşikleri haricinde diğer bileşiklerinde yer aldığı ve bu bileşiklerin silibin verimini etkilediği bulundu. Literatürden tohumların yağ içeriği incelendiğinde özellikle linoleik asit ve oleik asit gibi doymamış yağ asitlerince yüksek yağ içeriğine sahip olduğu görülmüştür (Reverchon, 2006). Süperkritik CO₂ özütlemesi ile deve dikenî tohumundan elde edilen özüt içindeki yağlı kısım ayrılarak gerekli türevlendirme işlemi yapılmış ve ardından GC-FID ile analiz edilmiştir.

Deve dikenî tohumu yağının GC-FID analizi sonucunda belirlenen yağ asidi kromatogramı ve yağ asidi bileşimi aşağıda verilmiştir (Şekil 12.1 ve Çizelge 12.1).



Şekil 12.1. GC-FID kromatogramı

Çizelge 12.1. Deve dikenini tohumu yağının yağ asidi bileşimi

Yağ Asitleri Kompozisyonu	%
C14:0 miristik asit (tetradekanoik asit)	0,09
C16: 0 palmitik asit (hekzadekanoik asit)	8,15
C16: 0 palmitoleik asit	0,10
C17:0 Margarik asit (heptadekanoik asit):	0,07
C17:1 heptadesenoik asit	0,03
C18:0 Stearik asit (oktadekanoik asit)	5,51
C18:1 oleik asit	24,10
C18:2 linoleik asit	54,97
C20:0 Araşidik Asit (eikosanoik asit)	3,03
C18:3 linolenik asit	0,17
C20:1 Gadoleik asit (eikosenik asit)	0,95
C22:0 Behenik Asit (dokosanoik asit)	2,27
C24:0Lignoserik Asit (tetrakosanoik asit)	0,59

Çizelge 12.1 incelendiğinde ise Süperkritik CO₂ ile deve dikenini tohumu özütünün GC-FID ile gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre; linoleik asit (%54,97) ve oleik asit (%24,10) yağ asitlerinin baskın olarak geldiği görülmektedir. Ardından %8,15 ile palmitik asit ve %5,51 ile stearik asit gelmektedir.

Linoleik asit ve oleik asit yağ asitleri; ilaç, kozmetik, boya, tekstil ve deri endüstrilerinde, biyozidel üretiminde, seramik ve kağıt endüstrisinde, deterjan üretiminde, mürekkep üretiminde, amin, yağlayıcı ajan olarak, sabun üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Çiftçi, 2006).

13. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER

Doktora tez konusu kapsamında deve dikenî tohumundan süperkritik CO₂ ile ilaç aktif maddesi olan ve kanser tedavisi başta olmak üzere pek çok alanda kullanılan silymarin bileşiklerinden silibin A ve silibin B bileşiklerinin maksimum verimde özütlemesi amaçlandı. Yapılan çalışmaların sonuçları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

- Tohum içerisinde yer alan yağın uzaklaştırılması hedeflenmiş olup, yağın silibin verimi üzerine ve deve dikenî tohumu üzerine etkisi incelendi. Hegzanla özütleme öncesi ve sonrası ile süperkritik CO₂ özütleme sonrası gözenek çapının hata payı çerçevesinde aynı kaldığı görüldü.
- Hegzan ile özütlenmiş deve dikenî tohumu yüzey alanının işlem görmemiş tohuma göre 4 kat, süperkritik özütleme sonrasında deve dikenî tohumunun yüzey alanının özütleme öncesine göre 4,26 kat arttığı bulundu.
- Deve dikenî tohumu ile süperkritik CO₂ özütleme sürecine; sıcaklık (40-80 °C), özütleme süresi (0-120 min), basınç (160-220 bar), CO₂ akış hızı (3-5 mL/min) ve tanecik büyüklüğü (0,3025-1,2 mm) parametrelerinin özütleme verimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Deneysel çalışmaların sonucunda en uygun koşullar 40 °C sıcaklık, 180 bar basınç, 4 mL/min CO₂ akış hızı, 0,3025 mm tanecik büyüklüğü olarak bulundu. Bu koşullarda elde edilen maksimum özüt verimi 327 mg/g tohum olarak belirlendi.
- Zamanla alınan deve dikenî tohumu özütü verilerinden düşük sıcaklık ve tanecik boyutunda, yüksek basınç ve akış hızında özüt veriminin başlangıç hızının belirgin şekilde arttığı görüldü.
- Yüzey Cevap Yöntemi kapsamında Design Expert 6.08 Trial programı ile sıcaklık, basınç, akış hızı parametrelerinin özütleme verimine etkisi incelendi. Oluşturulan model aşağıda verilmektedir.

$$\% \text{verim} = 10,76 - 8,39 * A + 4,61 * B + 2,61 * C + 2,60 * A^2 + 1,01 * B^2 + 0,34 * C^2 - 2,85 * A * B - 1,15 * A * C - 1,90 * B * C$$

- Süperkritik CO₂ ile deve dikenini tohumunun özütlemesine etki eden en önemli parametrenin sıcaklık ve basınç terimlerinin olduğu görüldü. Optimum koşullarda modelin ve deneysel verilerin sonuçlarının birbirleriyle uyumlu olduğu belirlendi.
- Süperkritik CO₂ özütleme ile deve dikenini tohumundan elde edilen özüt içerisindeki silymarin bileşikler UV-Vis Spektrofotometresi ile tayin edildi. Özüt içerisinde %21 oranında Silymarin bileşiklerinin varlığı saptandı.
- Süperkritik CO₂ özütleme ile deve dikenini tohumundan silibin bileşiklerinin eldesi üzerine özütleme süresi, sıcaklık, basınç, CO₂ akış hızı ve tanecik büyüklüğü parametrelerinin etkileri araştırıldı. Silibin A ve silibin B bileşiklerinin maksimum verimde elde edildiği en uygun koşullar 40 °C sıcaklık, 180 bar basınç, 4 mL/min CO₂ akış hızı, 0,3025 mm tanecik büyüklüğü olarak bulundu. Bu koşullarda elde edilen maksimum Silibin A ve Silibin B verimleri sırasıyla 2,29 ve 1,92 mg/ g tohum olarak belirlendi.
- Deve dikenini tohumu özütü içerisindeki yağın GC-FID ile analiz yapıldı. Bu analiz sonucuna göre deve dikenini tohumunun özütünde linoleik asit ve oleik asit yağ asitlerinin baskın olarak geldiği belirlendi.

İlaç etken maddesi olarak kullanılan ve laboratuvar koşullarında üretimi zor olan silibin A ve silibin B bileşikler bitkilerden klasik özütleme yöntemiyle kolaylıkla elde edilebilmektedir. Ancak bu bileşiklerden özütleme esnasında kullanılan organik çözücüler tamamıyla uzaklaştırılmamakta, ürünün saflaştırılması güçleşmektedir. Süperkritik akışkan ile özütleme yönteminde ise diğer yöntemlere göre özütleme süresi kısalmakta, düşük sıcaklıkta ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir.

*

Çevre dostu olarak bilinen bu yöntemde kimyasal çözücü olarak karbon dioksit seçilmesinin nedeni inert ve ucuz olmasının yanısıra yanıcı, toksik, patlayıcı olmaması, kolay bulunması, kritik sıcaklık ve basınç değerlerinin diğer pek çok gaz göre düşük olmasıdır. Özellikle kritik sıcaklığı oda koşullarına yakın olması Silibin bileşikler gibi sıcaklıkla bozunabilecek ürünlerin özütlemesi için iyi bir çözücüdür.

Ayrıca karbon dioksit oda koşullarında gaz halinde bulunduğundan çözücü kalıntısı üründe bulunmamakta ve çözücü uzaklaştırılması için gerekli ikinci bir ayırma ünitesine ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu çalışmada geleneksel yöntemler yerine süperkritik CO₂ ile özütleme gerçekleştirilerek teknolojik ve ekonomik anlamda yarar sağlanabilmektedir. Bununla birlikte gaz halinde sistemi terk eden CO₂'in yoğunlaştırılarak tekrar sisteme geri kazanılması çalışmayı daha da ekonomik hale getirecektir.

Deve dikenini tohumundan Süperkritik CO₂ ile silibin özütlemesi çalışması kapsamında kalitatif ve kantitatif olarak silibin bileşiklerinin analizinde kullanılan kolonun kiral bir kolon seçilmesi analiz süresini kısaltacaktır, özüt içerisindeki diğer ilaç etken maddelerinin belirlenmesinde hız kazandıracaktır. Elde edilen silibin A ve silibin B bileşiklerinin biyolojik aktifliklerinin incelenmesi çalışmayı bir basamak ileriye taşıyacaktır.

Deve dikenini özütü içerisinde silibin bileşikleri haricindeki taksifolin, silikristin, silidianin apijenin, kuarsetin gibi diğer önemli bileşiklerinde eldesi için çalışma parametrelerinin etkisi incelenmesi önerilmektedir.

Ülkemizin pek çok yerinde yetişen ve ekonomik önemi bulunmayan deve dikenini tohumundan ilaç etken maddesi olan değerli silibin A ve silibin B bileşiklerine üretilmesi yönünde yapılan bu çalışmanın insan sağlığına ve ekonomiye faydalı olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayacağı ve yapılacak olan çalışmalara ek bir kaynak olarak ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. AbouZid, S., (2012). Silymarin Natural Flavonolignans from Milk Thistle. *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Edited by Venketeshwer Rao, **InTech**, ISBN 978-953-51-0296-0, 255-272.
2. Agarwal R., Agarwal C., Ichikawa H., Singh R., P., and Aggarwal B., B., (2006). Anticancer Potential of Silymarin: from Bench to Bed Side. ***Anticancer Research*** 26:4457-4498
3. Aghel, N., Yamini, Y., Hadjiakhoondi, A., Pourmortazavi, S.M., (2004). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of *Mentha pulegium L.* Essential Oil. ***Talanta*** 62 (2), 407–411.
4. Ahmadi-Ashtiani HR, Rezazadeh Sh, Barkhordari E, Hekmat-Nazemi N Baghaei M Bokaie S Rastegar H, (2010). Evaluation of Protective Effects of Nano-formulated Silymarin Against UV Radiation on Guinea Pig Skin. ***Journal of Medicinal Plants***, 9(6): 86-96.
5. Altın G., (2006). Silybum Marianum L. Gaertner ve Fitoterapideki Önemi. Ankara Üniversitesi, Eczacılık ve Farmakoloji, Farmakognozi Anabilim Dalı, ***Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, Yüksek Lisans.15-32.
6. Akanda, M., J., H., Sarker M.,Z.,I., Ferdosh S.,Manap,M.,Y.A., Rahman, N., and Kadir M., O., A., (2012). Applications of Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Palm Oil and Oil from Natural Sources. ***Molecules***, Review 17, 1764-1794
7. Bagheri, H., Manap, M. Y. B. A., Solati, Z. (2014). Response Surface Methodology Applied to Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Piper *Nigrum L.* Essential oil, ***LWT - Food Science and Technology*** 57,149-155
8. Barreto, J., F, Carrier, D.,J., Wallace, Sunny N., Clausen, E., C., (2003). Extraction of Nutraceuticals from Milk Thistle:I. Hot Water Extraction. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***,105–108
9. Berna, A., TaÂrrega, M., Blasco, S.Subirats, (2000). Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed, ***Journal of Supercritical Fluids*** 18 227±237.
10. Bocevaska, M., Sovov´a, H., (2007). Supercritical CO₂ Extraction of Essential Oil From Yarrow, ***Journal of Supercritical Fluids***, 40:360–367.
11. Caldera, G., Figueroa, Y., Vargas, M., Santos, D.T., Marquina-Chidsey, G., (2012). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Antioxidant Compounds From Venezuelan Rosemary Leaves. ***International Journal of Food Engineering*** 8(4).
12. Cansell F., Aymonier, C., Loppinet-Serani, (2003). “Review on Materials Science and Supercritical Fluids”, ***Current Opinion in Solid State and Materials Science***, 7:331-340.

13. Casas, L., Mantell, C., Rodriguez, M., Torres, A., Macias, F., Martínez de la Ossa, E., (2007). Effect of the Addition of Cosolvent on The Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from *Helianthus annuus L.* ***The Journal of Supercritical Fluids*** 41 (1):43–49.
14. Cocero M.J., Gonzalez S., Perez S. and Alonso E., (2000). Supercritical Extraction of Unsaturated Products: Degradation of Beta Carotene Supercritical Extraction Processes, ***Journal of Supercritical Fluids*** ,19: 39-44
15. Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis (OJL 248, 5.9.1991) REV 01.01.2008 ANNEX X- A, B.
16. Consolidated TEXT, Produced by the CONSLEG system of the Office for the official Publications Communities, CONSLEG:1991 R 2568.
17. Corchete P., (2008). *Silybum Marianum* (L.)Gaertn: The Source of Silymarin. ***Bioactive Molecules and Medicinal Plants*** , chapter 6, KG. Ramawat, J.,M, Merillon, Springer Ed.124-148
18. Cvjetko, M., Jokic', S., Lepojevic', Z', Vidovic', S., Maric', B., Radojčić' Redovnikovic', I., (2012). Optimization of the Supercritical CO₂ Extraction of Oil from Rapeseed Using Response Surface Methodology. ***Food Technology and Biotechnology*** 50 (2): 208–215.
19. Çağdaş E., Kumcuoğlu S., Güventürk S., Tavman Ş., (2011). Ultrasound-assisted Extraction of Silymarin Components from Milk Thistle Seeds (*Silybum Marianum l.*), ***Gıda*** 36 (6): 311- 318.
20. Çalıklı A., (2003). Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi”, ***Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi***, Aralık.
21. Çiftçi, Y., (2006). “Bitkisel ve Hayvansal Katı ve Sıvı Yağlar (lipitler)”, Kimya yüksek mühendisi (Gümrük kimyageri) 10-630.
22. Da Porto, C., Voinovich, D., Decorti, D., Natolino A., (2012). Response Surface Optimization of Hemp Seed (*Cannabis Sativa l.*) Oil Yield and Oxidation Stability by Supercritical Carbon Dioxide Extraction, ***Journal of Supercritical Fluids*** 68:45–51.
23. Demirezer Ö., (2007). Tedavide Kullanılan Bitkiler FFD Monografıları. ***Medikal & Nobel Yayınevi***, 36:265-272.
24. Dewik, P., M., (2002). Flavolignans, ***Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach***, ***John Wiley & Sons Ltd.***, 151-153
25. Ding, T., M., Tian, S., J., Zhang, Z., X., Gu, D., Z., Chen, Y.,F., Shi, Y., H., Sun, Z.,P., (2001). Determination of Active Component in Silymarin by RP-LC and LC/MS, ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 155-161

26. Duarte, C., Moldão-Martins, M., Gouveia, A.F., da Costa, S.B., Leitão, A.E., Bernardo-Gil, M.G., (2004). Supercritical Fluid Extraction of Red Pepper (*Capsicum frutescens* L.). *The Journal of Supercritical Fluids* 30 (2), 155–161.
27. Duan, L., Carrier, D.J., Clausen E.C., (2004). Silymarin Extraction from Milk Thistle Using Hot Water, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113–116: 559-568
28. Durante, M., Lenucci, M. S., D’Amico, L., Piro, G., Mita, G., Effect of Drying and Co-Matrix Addition on The Yield and Quality of Supercritical CO₂ extracted pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) oil. *Food Chemistry* 148 (2014) 314–320.
29. Dyankov, Svetlomisir; Simeonov, Evgeni; Sirakov, Angel; Subra-Paternaut, P., (2007). Supercritical Extraction of Active Substances from *Silybum Marianum*, *Nauchni Trudove - Universitet po Khranitelni Tekhnologii*, Plovdiv 54(2):58-63
30. İnternet:“Fructus Silybi Mariae”, Dünya Sağlık Örgütü (WHO). <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fapps.who.int%2Fmedicinedocs%2Fen%2Fd%2FJs4927e%2F29.html+&date=2014-07-22> (2012).
31. Gazák, R., Walterováb D., Kien V., (2007). “Silybin and Silymarin – New and Emerging Applications in Medicine”, *Current Medicinal Chemistry*, Bentham Science Publishers Ltd. 14, 315-338.
32. Gelmez, N., Kincal, N.S., Yener, M.E., (2009). Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidants from Roasted Wheat Germ Based on Yield, Total Phenolic and Tocopherol Contents and Antioxidant Activities of The Extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 48 (3): 217–224.
33. Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y.-H., (2010). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Grape (*Vitis labrusca* b.) Peel by Using Response Surface Methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11 (3), 485–490.
34. Ghasemi, E., Raofie, F., Najafi, N.M., (2011). Application of Response Surface Methodology and Centra Composite Design for The Optimisation of Supercritical Fluid Extraction of Essential Oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* 126(3): 1449–1453.
35. González-Vila, F.J., Bautista, J.M., Gutierrez, A., Del Rio, J., González, A., (2000). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Lipids from Eucalyptus Globulus Wood. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 43 (1): 345–351.
36. Guan, W., Li, S., Yan, R., Tang, S., Quan, C., (2007). Comparison of Essential Oils of Cloven Buds Extracted with Supercritical Carbon Dioxide and Other Three Traditional Extraction Methods. *Food Chemistry* 101 (4): 1558–1564.
37. Guo-qing, H., Hao-ping, X., Qi-he, C., Hui, R., Zhao-yue, W., Lonseny, T., (2005). Optimization of Conditions for Supercritical Fluid Extraction of Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Zhejiang University Science B* 6 (10): 999–1004.

38. Hadolin M., Skerget M., Knez, Z., Bauman, D.,(2001). High Pressure Extraciton of Vitamin E-Rich Oil from *Silybum Marianum*. ***Food Chemistry***, Analytical, Nutritional and Clinica Methods Section, 74:335 -364.
39. Herrero, M., Cifuentes, A., Ibaniez E., (2006).Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-By-Products, Algae And Microalgae”,***Food Chemistry*** 98 136–148.
40. Honjo, M., Mishima, K.,; Matsuyama, K., Sekiguchi, H.; Ando, S., Irie, K., Mishima, K., Fujiwara, M., (2009). Extraction of Silymarins from Milk Thistle Seeds Using Supercritical Carbon Dioxide With Methanol”, ***Solvent Extraction Research and Development***, Japan 16, 111-120.
41. Ivanov, D.S., Čolović, R.R., Lević, J.D., Sredanović, S.A., (2012). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Linseed Oil Using RSM. ***European Journal of Lipid Science and Technology*** 114 (7), 807–815.
42. İçen, H., (2008). “Süperkritik Karbon Dioksit Özütleme Metodu ile Atık Çay Lifleri Saplarından Kafein Eldesi”, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Doktora Tezi, Ankara.
43. İçen, H.,Gürü, M., (2010). Effect of Ethanol Content on Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Caffeine from Tea Stalk and Fiber Wastes. ***Journal of Supercritical Fluids***, 55(1): 156-160.
44. Kassama, L.S., Shi, J., Mittal, G.S., (2008). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Lycopene From Tomato Skin With Central Composite Rotatable Design Model. ***Separation and Purification Technology*** 60 (3):278–284.
45. Kaur, D., Wani, A.A., Oberoi, D., Sogi, D., (2008). Effect of Extraction Conditions on Lycopene Extractions from Tomato Processing Waste Skin Using Response Surface Methodology, ***Food Chemistry*** 108 (2):711–718.
46. Kha, T.C., Phan-Tai, H., Nguyen, M. H., (2014). Effects of Pre-Treatments on The Yield and Carotenoid Content of Gac Oil Using Supercritical Carbon Dioxide Extraction, ***Journal of Food Engineering***,120:44–49.
47. Khajeh, M., (2012). Optimisation of supercritical Fluid Extraction of Essential Oil Components of *Diplotaenia cachrydifolia*: Box–Behnken Design. ***Natural Product Research*** 26 (20): 1926–1930.
48. Khan, F. A., Khattak, M., U., R.,Zahoor M., (2011). Estimation of Inorganic Constituents in The Seeds of Blue and White Flowering Capitulum of *Silybum Marianum*, ***African Journal of Biotechnology***,10 (62):13491-13494 .
49. Kim, K., Bu, Y., Jeong, S., Lim, J., Kwon, Y., Cha, D.S., Kim, J., Jeon, S., Eun, J., Jeon, H., (2006). Memory-Enhancing Effect of a Supercritical Carbon Dioxide Fluid Extract of The Needles of *Abies Koreana* on Scopolamine-Induced Amnesia in Mice. ***Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*** 70 (8): 1821–1826.

50. Kvasnicka, F., Biba, B., Sevcik, R., Voldrich, M., Kratka J., (2003). Analysis of The Active Components of Silymarin”, *Journal of Chromatography A*, 990:239–245
51. Lasekan, O., Abdulkarim, S., M., (2012) Extraction of Oil from Tiger Nut (*Cyperus esculentus* L.) with Supercritical Carbon Dioxide (SC-CO₂), *LWT - Food Science and Technology* 47 287-292.
52. Lee, J., I., Hsu, B., H., Wu, D., Barrett, J., S., (2006). Separation and Characterization of Silibin, Isosilibin, Silydianin and Silychristin in Milk Thistle Extract by Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 57-68 116.
53. Lijun D., Carrier, D., J., Clausen E., (2004). Silymarin Extraction from Milk Thistle Using Hot Water, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113–116:559-568.
54. Liu, Z., Mei, L., Wang, Q., Shao, Y., Tao, Y., (2014). Optimization of Subcritical Fluid Extraction of Seed Oil from *Nitraria Tangutorum* Using Response Surface Methodology, *LWT - Food Science and Technology* 56 168-174.
55. Liu, W., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Tong, M.-H., Wu, N., Liu, X.-L., Zhang, S., (2009). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Seed Oil from *Opuntia Dillenii* Haw and Its Antioxidant Activity. *Food Chemistry* 114 (1), 334–339.
56. Liu, J., Lin, S., Wang, Z., Wang, C., Wang, E., Zhang, Y., Liu, J., (2011). Supercritical Fluid Extraction of Flavonoids from *Maydis Stigma* and Its Nitrite-Scavenging Ability. *Food and Bioproducts Processing* 89 (4), 333–339.
57. Liu, H., Jiao, Z., Liu, J., Zhang, C., Zheng, X., Lai, S., Chen, F., Yang H., (2012). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Phenolics from Date Seeds and Characterization of Its Antioxidant Activity. *Food Analytical Methods*, 1–8.
58. Majdi, S., Barzegar, M., Jabbari, A., Agha Alikhani, M., (2012). Supercritical Fluid Extraction of Tobacco Seed Oil and Its Comparison with Solvent Extraction Methods. *Journal of Agricultural Science and Technology* 14 (5): 1053–1065.
59. Internet: “Milk Thistle”, PDR for Herbal Medicines (2012) <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.scbaghdad.com%2Flibrary%2Fbiobooks%2FPDR.for.Herbal.Medicines.2nd.ed1563633612.pdf&date=2014-07-22>
60. McHugh M. A. and Krukonis V. J., (1994). *Supercritical Fluid Extraction Principles and Practice*, 2nd Ed., **McGraw Hill**, Butterworth-Heinemann, Boston Mass.
61. Montgomery, D.C., (2001). *Design and Analysis of Experiments*. 5th edition, John Wiley and Sons, USA, 427-500.
62. Nagy, L., Kuki, A., Deak, G., Biri, B., Nagy, M., Zsuga, M., Keki, S., (2011) Systematic Identification of Active Ingredients of *Silybum Marianum* Seed, *Journal Medical Area*, XIV (2): 9-12.

63. Nie, S.-P., Li, J.-E., Yang, C., Qiu, Z.-H., Xie, M.-Y., (2010). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil from Herba Moslae by Response Surface Methodology and Its Chemical Composition Analysis. *Food Science and Technology Research* 16 (3), 185–190.
64. Nik Norulaini, N., Anuar, O., Abbas, F., Fatehah, M., Mohd Omar, A., Sahena, F., Zaidul, I., 2009a. Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of Anastatica hierochuntica. *Food and Bioproducts Processing* 87 (2):152–158.
65. Nik Norulaini, N., Anuar, O., Omar, A., AlKarkhi, A.F., Setianto, W.B., Fatehah, M., Sahena, F., Zaidul, I., (2009b). Optimization of SC–CO₂ Extraction of Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L) Smith. *Food Chemistry* 114 (2), 702–705.
66. Nyam, K., Tan, C.P., Lai, O.M., Long, K., Che Man Y., (2010). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Phytosterol from Roselle Seeds with A Central Composite Design Model. *Food and Bioproducts Processing* 88 (2), 239–246.
67. Internet: NOVASEP, (2012). Preparative Supercritical Fluid Chromatography (SFC) Technology from Novasep. <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.novasep.com%2Ftechnologies%2Fchromatography-SFC.asp+&date=2014-07-22>
68. Pei, Y. P., Chen, J., Li, W., (2009). Progress in Research and Application in Silymarin. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 3, 1-8.
69. Peng, J., Dong, F., Xu, Q., Xu, Y., Qi, Y., Han, X., Xu, L., Fan, G., Liu, K., (2006). Orthogonal Test Design for Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Daphnoretin, 7- methoxy-daphnoretin and 1, 5-diphenyl-1-pentanone from *Stellera chamaejasme* L. and Subsequent Isolation by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Journal of Chromatography A* 1135 (2), 151–157.
70. Post-White, J., Ladas E., J. and Kelly K., M., (2007). Advances in the Use of Milk Thistle (*Silybum marianum*), *Integrative Cancer Therapies*, 6: 104.
71. Quaglia MG, Bossù E, Donati E, Mazzanti G, Brandt A., (1999). Determination of Silymarine in The Extract from The Dried *Silybum Marianum* Fruits by High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Journal of Pharm Biomed Anal. Mar*; 19(3-4):435-442.
72. Radjabian, T. Rezazadeh, S. and Fallah H., H., (2008). Analysis of Silymarin Components in the Seed Extracts of Some Milk Thistle Ecotypes from Iran by HPLC, *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A*, 32:A2
73. Rajaei, A., Barzegar, M., Yamini, Y., (2005). Supercritical Fluid Extraction of Tea Seed Oil and Its Comparison with Solvent Extraction. *European Food Research and Technology* 220 (3–4), 401–405.

74. Ramandi, N.F., Najafi, N.M., Raofie, F., Ghasemi, E., (2011). Central Composite Design for The Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Fluid Extraction of Fatty Acids from *Borago Officinalis L.* flower. *Journal of Food Science* 76 (9): C1262–C1266.
75. Rebolleda, S., Rubio, N., Beltrán, S., Sanz, M. T., Luisa, M., Sanjosé, G., (2012). Supercritical Fluid Extraction of Corn Germ Oil: Study of The Influence of Process Parameters on The Extraction Yield and Oil Quality. *Journal of Supercritical Fluids* 72270–277.
76. Reverchon E., De Marco I., (2006). Supercritical Fluid Extraction and Fractional of Natural Matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38:146-166.
77. Reverchon E” Kaziunas, A.,Marrone C., (2000). Supercritical CO₂ extraction of Hiprose Seed Oil: Experiments and Mathematical Modelling”, 55 (12): 2195–2201.
78. Reverchon E” Marrone C., (2001). “Modeling and Simulation of The Supercritical CO₂ Extraction of Vegetable Oils”, *Journal of Supercritical Fluids*, 19 :161-175.
79. Rezaei, K., Temelli, F. (2001). On-line Extraction-Reaction of Canola Oil Using Immobilized Lipase in Supercritical CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 19:263-274.
80. İnternet:Phenomenex, (2012) “HPLC columns application”,Silymarin, Phenomenex catalogue.
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.phenomenex.com%2FApplication%2FDetail%2F1128&date=2014-07-22>
81. Salgın, U. (2007). Extraction of Jojoba Seed Oil Using Supercritical CO₂+Ethanol Mixture In Green and High-Tech Separation Process, *Journal of Supercritical Fluids* 39 330–337.
82. Salgın, U., Salgın, S., (2013). Effect of Main Process Parameter on Extraction of Pine Kernel Lipid Using Supercritical Green Solvents: Solubility Models and Lipid Profiles, *Journal of Supercritical Fluids*, 73 18–27.
83. Sarker, M.Z.I., Selamat, J., Habib, A.S.M.A., Ferdosh, S., Akanda, M.J.H., Jaffri, J.M., 2012. Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of Fish Oil from Viscera of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *International Journal of Molecular Sciences* 13 (9), 11312–11322.
84. İnternet:Medindia (2012). “Silymarin brands”, Silymarin içerikli üretilen ilaçların isimleri ve imalatını sağlayan firmalar.
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.medindia.net%2Fdrug-price%2Flist.asp+&date=2014-07-22>.
85. Sidhu, M.,C., Saini, P., (2012). Silybum Marianum: A Plant of High Medicinal Importance-A review, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 1(2): 72-86

86. Internet: Sigma-Aldrich, (2012). HPLC Analysis of Silymarin on Ascentis, Express C18, G005739 SUPELCO, catalog, product, SUPELCO <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2FSUPELCO%2FG005739%3Fflang%3Den%26region%3DTR&date=2014-07-22>
87. Sharif K.M., Rahman M.M. , Azmir J., Mohamed A., Jahurul M.H.A., Sahena F., Zaidul I.S.M., (2014). Experimental Design of Supercritical Fluid Extraction – A review, *Journal of Food Engineering* 124:105–116.
88. Skerget, M., Kotnik, P., Knez, Z., (2003). Phase Equilibria in Systems Containing α -Tocopherol and Dense Gas. *Journal of Supercritical Fluids*, 26:181-191
89. Sonsuzer, S., Sahin, S., Yilmaz, L., (2004). Optimization of supercritical CO₂ Extraction of Thymbra Spicata Oil. *Journal of Supercritical Fluids* 30 (2): 189–199.
90. Stoiljkovic, Z., Petrovic, S., D., Ilic, B., S.,(2007). Examination of Localization of Silymarin and Fatty Oil in Silybum Marianum L. Gaertn. Fruit”, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 13(2):55-59.
91. Subramaniam S, Vaughn K, Carrier DJ, Clausen EC, (2008). Pretreatment of Milk Thistle Tohum to Increase the Silymarin Yield: An Alternative to Petroleum Ether defatting, *Bioresour Technol.* May 99(7):2501-2506.
92. Sulu, M., “Süperkritik Akışkan Özütleme”, (2012). *Gıda Mühendisliği Dergisi*, Gıda Mühendisleri Odası, 22-24.
93. Sun, Y., Wei, L., Wang, J., Bi, J., Liu, Z., Wang, Y., Guo, Z., (2010). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Saikosaponins from Bupleurum Falcatum with Orthogonal Array Design. *Journal of Separation Science* 33 (8), 1161–1166.
94. Tabera, J., Guinda, Á., Ruiz-Rodríguez, A., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., Albi, T., Reglero, G., (2004). Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High- Added-Value Compounds from A Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (15): 4774–477
95. Tam, C., Yang, F., Zhang, Q., Guan, J., Li, S., (2007). Optimization and Comparison of Three Methods for Extraction of Volatile Compounds from Cyperus Rotundus Evaluated by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (2): 444–449.
96. Turner, C., Whitehand, L.C., Nguyen, T., McKeon, T., (2004). Optimization of A Supercritical Fluid Extraction/Reaction Methodology for The Analysis of Castor Oil Using Experimental Design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (1):26–32.
97. Uquiche, E., Romero, V., Ortíz, J., Del Valle, J., (2012). Extraction of Oil and Minor Lipids from Cold-Press Rapeseed Cake with Supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 29 (3):585–598.

98. Uquiche, E., Huerta E., Sandoval, A., Valle, J., M., (2012). Effect of Boldo (*Peumus boldus* M.) Pretreatment on Kinetics of Supercritical CO₂ Extraction of Essential Oil, *Journal of Food Engineering* 109230–237.
99. Uribe, J. A. R., Perez, J. I. N., Kaul, H. C., Rubio, G. R., Alcocer, C. G., (2011) Extraction of Oil from Chia Seeds with Supercritical CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 56:174–178.
100. Wallace, Carrier, D., J., Clausen E., (2003). Extraction of Nutraceuticals from Milk Thistle Part II. Extraction with Organic Solvents:Part II. Extraction with Organic Solvents, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105–108, 891-903.
101. Wang S.,M., Ling, Y.,C., Giang Y., S., (2003). Forensic Applications of Supercritical Fluid Extraction and Chromatography, *Forensic Science Journal*, 2:5-18 .
102. Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J., Hu, Q., (2007). Antioxidant Activity of *Spirulina Platensis* Extracts by Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Food Chemistry* 105 (1), 36–41.
103. Wang, L., Yang, B., Du, X., Yi, C., (2008). Optimisation of Supercritical Fluid Extraction of Flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry* 108 (2), 737–741.
104. Wang, H., Liu, Y., Wei, S., Yan, Z., (2012). Application of Response Surface Methodology to Optimise Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Essential Oil from *Cyperus Rotundus* Linn. *Food Chemistry* 132 (1), 582–587.
105. Xiao, J.B., Chen, J.W., Xu, M., (2007). Supercritical Fluid CO₂ Extraction of Essential Oil from *Marchantia Convoluta*: Global Yields and Extract Chemical Composition. *Electronic Journal of Biotechnology* 10 (1), 141–148.
106. Xin, W., Xianzhe, Z., Chenghai, L., (2008). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Silymarin from Milk Thistle Tohums. *International Journal Agricultural & Biologocial Engineering*, 1 (1): 75-82.
107. Xu, X., Dong, J., Mu, X., Sun, L., (2011). Supercritical CO₂ Extraction of Oil, Carotenoids, Squalene and Sterols from Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) Bee Pollen, *Food and bioproducts processing* 89: 47–52.
108. Yan-ze L., Yue-wie L., D.,(2012). Standardization and Identification of Minor Components of Silymarin (MK-001) *Chinese Herbal Medicines*, 4(3): 237-244
109. Yang, Y.C., Wei, M.C., Hong, S.J., (2014). Ultrasound-assisted Extraction and Quantitation of Oils from *Syzygium Romaticum* Flower Bud (clove) with Supercritical Carbon Dioxide, *Journal of Chromatography A*, 1323 18–27
110. Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M., Azizi, M., (2007). Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology* 9 (1):35–42.

111. Yi, C., Shi, J., Xue, S.J., Jiang, Y., Li, D., (2009). Effects of Supercritical Fluid Extraction Parameters on Lycopene Yield and Antioxidant Activity. *Food Chemistry* 113 (4): 1088–1094.
112. Yu, J., Dandekar, D.V., Toledo, R.T., Singh, R.K., Patil, B.S., (2007). Supercritical Fluid Extraction of Limonoids and Naringin from Grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) Seeds. *Food Chemistry* 105 (3): 1026–1031.
113. Zahedi, G., Azarpour, A., (2011). Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Passiflora Seed Oil. *Journal of Supercritical Fluids* 58 (1):40–48.
114. Zahedi, G., Elkamel, A., Lohi, A., (2010). Genetic Algorithm Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Nimbin from Neem Seeds. *Journal of Food Engineering* 97 (2):127–134.
115. Zarena, A., Sachindra, N., Udaya Sankar, K., (2012). Optimization of Ethanol Modified Supercritical Carbon Dioxide on The Extract Yield and Antioxidant Activity from *Garcinia mangostana* L. *Food Chemistry* 130 (1):203–208.
116. Zhang, J.Z., Chen, J.C., Kirby, E.D., (2007). Surface Roughness Optimization in An End-Milling Operation Using The Taguchi Design Method. *Journal of Materials Processing Technology* 184 (1–3), 233–239.
117. Zheng X., Wang, X., Lan, Y., Shic, J., Xue, S., J., Liu, C., (2009). Application of Response Surface Methodology to Optimize Microwave-Assisted Extraction of Silymarin from Milk Thistle Seeds. *Separation and Purification Technology* 70:34–40.

EKLER

EK-1. Silymarin içerikli üretilen drug isimleri ve imalatını sağlayan firmalar (Medindia,2012).

No	Genel Adı	Markası	İmalatçı Firma
1	Silymarin	Lymo, Siliv (100 ml)	Alpic Remedies Ltd.
2	Silymarin	Hepatoz (70 mg,140 mg) Hepatoz (100 ml)	Klintoz Pharmaceuticals Pvt Ltd
3	Silymarin	S -Meri	Taurus Laboratories Pvt. Ltd.
4	Silymarin	Silicon, Silicon 140 Silicon Susp.,Silicon Susp 200 Lecivit -S, Lecivit -S 200	Lifeline Biotech Ltd.
5	Silymarin	Prohep Forte, Prohep Forte (70 mg)	Lupin Laboratories Ltd.
6	Silymarin	Siliv, Sylo,Lyma	Finecure Pharmaceuticals Ltd
7	Silymarin	Livarin	Sidhbali Formulation
8	Silymarin	Hepsil (70 mg)	Pramukh Swami Pharma Ltd.
9	Silymarin	Osilma (70 mg, 140 mg)	Osho Pharma Pvt.Ltd.
10	Silymarin	Silyrin, Silyrin B Silyrin (35 mg, 140 mg)	Talent Laboratories
11	Silymarin	Silvia	Allure Remedies Pvt Ltd
12	Silymarin	Hepasil, Silvia (140 mg)	Chemo Drugs
13	Silymarin	Marisil, Marisil (140 mg)	Fem Care Pharma Limited
14	Silymarin	Syrial, Syrial (35 mg,140 mg)	Olcare Laboratories
15	Silymarin	Silimar	German Remedies (Zydus Cadila Healthcare Ltd.)
16	Silymarin	Livtec, Livtec (140 mg)	Ampus Life Sciences Ltd
17	Silymarin	Merin	Biomax Laboratories
18	Silymarin	Siliv (140 mg), Silybon (140 mg) Sylo (200 ml)	Quality Pharmaceuticals Industries
19	Silymarin	Chimarin	Ultra Chiron Pharma Pvt Ltd
20	Silymarin	Silimar (140 mg)	German Remedies (Zydus Cadila Healthcare Ltd.)
21	Silymarin	S -Meri (140 mg) S -Meri (100 ml)	Taurus Laboratories Pvt. Ltd.

EK-1. (Devam)Silymarin içerikli üretilen drug isimleri ve imalatını sağlayan firmalar(Medindia,2012).

22	Silymarin	Hepsil (35 mg), Silmi	Shreeyam Health Care
23	Silymarin	Sylo (140mg) Silybon, Silybon (100 ml, 200 ml)	Micro Labs Ltd
24	Silymarin	Hepsil (70 mg,140 mg) Hepsil Syr	Signova Pharma Pvt Ltd
25	Silymarin	Alrin -B Cap	Admac Formulations
26	Silymarin	Sivylar (70 mg)	Ranbaxy Laboratories Ltd.,
27	Silymarin	Sison, Sison 140	Dr Alson Laboratories Pvt Ltd
28	Silymarin	Heposil -B (70 mg,140 mg) Heposil -B (100 ml)	Legend Pharma
29	Silymarin	Levalon, Levalon (140 mg)	B & B (Micro Labs Ltd.)
30	Silymarin	Limarin (140 mg)	Serum International Ltd.
31	Silymarin	Livosil Forte	Centaur Pharmaceuticals Pvt.Ltd.
3***2	Silymarin	Sivylar (100 ml)	Ranbaxy Laboratories Ltd.,
33	Silymarin	Limarin (100 ml)	Serum International Ltd.
34	Silymarin	Livosil	Centaur Pharmaceuticals Pvt.Ltd.
35	Silymarin	Alrin -B Syr	Admac Formulations
36	Silymarin	Livon -S	Welfo Pharmaceuticals (P) Ltd
37	Silymarin	Livtec (100 ml)	Ampus Life Sciences Ltd
38	Silymarin	Chimarin (200 ml)	Ultra Chiron Pharma Pvt Ltd
39	Silymarin	Silytop,(220 ml)	Prism Pharma
40	Silymarin	Nitlor Plus	BMW Pharmaco India Pvt Ltd
41	Silymarin	Lonate-S	F.C. Remedies
42	Silymarin	Hepalee	Leemed Pharma
43	Silymarin	Shamliv, Shamliv Tab	Shamsri Pharma Pvt. Ltd
44	Silymarin	Aloliv, Aloliv Cap	Bennet Pharmaceuticals Ltd
45	Silymarin	Eliv, Eliv Syrup	Ravian Pharmaceuticals (P) Ltd.

EK-1. (Devam)Silymarin içerikli üretilen drug isimleri ve imalatını sağlayan firmalar (Medindia,2012).

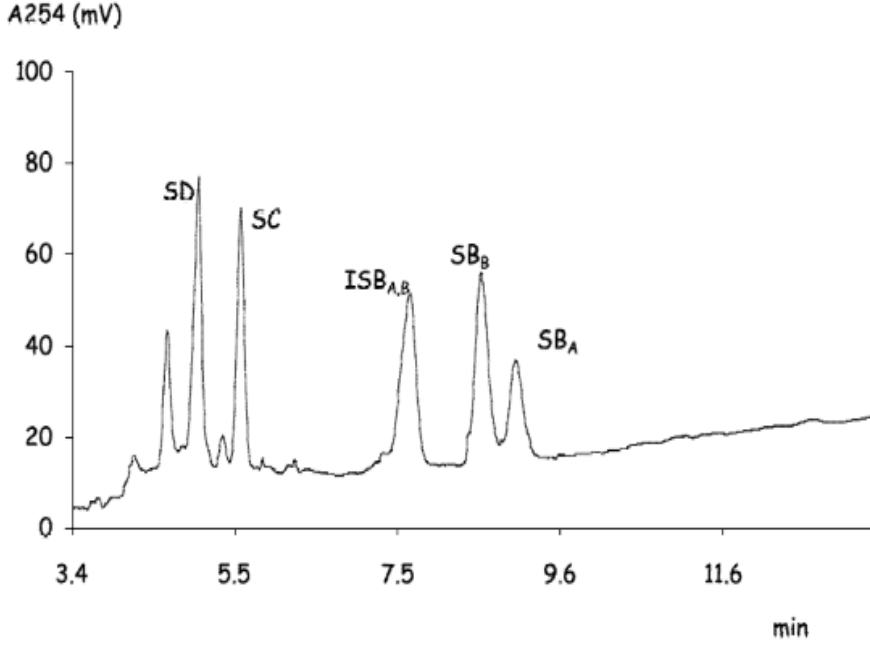
46	Silymarin	Lithin S (100 ml)	Brawn Laboratories Ltd.
47	Silymarin	Lesibal S,(150 ml)	Baltic Pharmaceuticals
48	Silymarin	Lecirin	Vardhman Biotech Pvt. Ltd.
49	Silymarin	Hepavit (200 ml)	Life Vision Medicare Pvt Ltd
50	Silymarin	Speedoliv	Royal Sapphire Remedies
51	Silymarin	Hepanit Tablet	Mac Organics
52	Silymarin	Arosi	Arvincare
53	Silymarin	Nitoliv	Biomax Biotechnics
54	Silymarin	Liveraid	Pharmed Limited
55	Silymarin	Livosure	Bionova Lifesciences (Pragati Biocare Pvt Ltd)
56	Silymarin	Alcohep, Renewliv, Renewliv Forte	Grandix Pharmaceuticals
57	Silymarin	Silikair	PDC Healthcare
58	Silymarin	Hepamarin	Boon & Bastion Formulations
59	Silymarin	Telzaliv, Tezaliv Capsule	Technica Labs & Pharma Pvt Ltd
60	Silymarin	Esimerin Plus	Esquire Drug House
61	Silymarin	Silyvit -DS	Embiotic Laboratories (P) Ltd.
62	Silymarin	Silyvit	Oyster Labs Limited
63	Silymarin	Livosil -B Susp	Centaur Pharmaceuticals Pvt.Ltd.
64	Silymarin	Scav-L	D.S. Lab
65	Silymarin	Livoriv –B(100 ml)	East African (I) Remedies Pvt Ltd
66	Silymarin	Good Liver	Laborate Pharmaceuticals India Ltd.
67	Silymarin	Higado, Higado Plus, Higado – L	Salud Care (I) Pvt. Ltd.
68	Silymarin	Heptosil, Heptosil (200ml)	Bindlysh Biotech Ltd
69	Silymarin	Livbel	Blubell Pharma

EK-1. (Devam)Silymarin içerikli üretilen drug isimleri ve imalatını sağlayan firmalar (Medindia,2012).

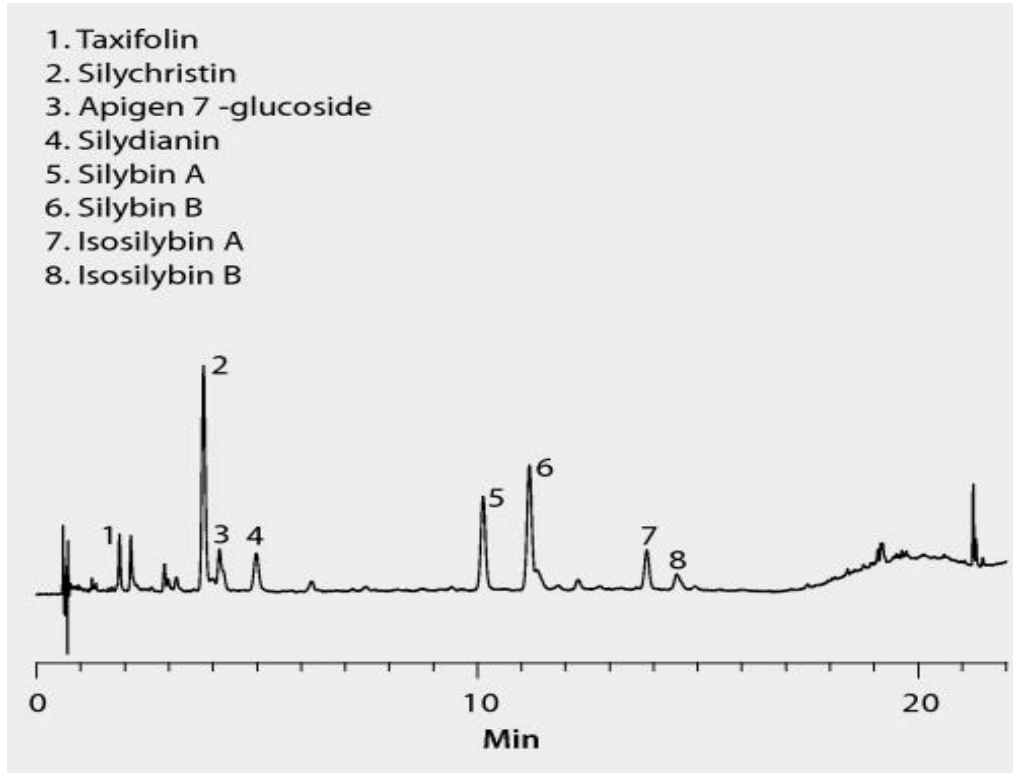
70	Silymarin	Heparex	Colours Life Sciences
71	Silymarin	Livotool, Livotool (60 ml)	Amro Pharma Pvt Ltd
72	Silymarin	Ligand SB	ORN Remedies Pvt. Ltd.
73	Silymarin	Satmax Syrup, Satmax Cap, Hepa	Venus Remedies
74	Silymarin	Hepawin Plus	Waves Bio-Tech Pvt. Ltd.
75	Silymarin	Askaliv, Askaliv (200 ml), Askaliv (35 gm,70 gm) Askaliv Capsule	Asklepios Remedies (P) Ltd.
76	Silymarin	Liveril, Liveril (200 ml)	Meyer Organics Pvt Ltd.

EK-2. Silymarin Bileşiklerine Ait Kromatogramlar

Literatürde rastlanan laboratuvarımızda bulunan kolonun özelliklerine benzer kolonlarla yapılan deneylerden elde edilen silymarin bileşiklerine ait kromatogramlar aşağıda verildi.

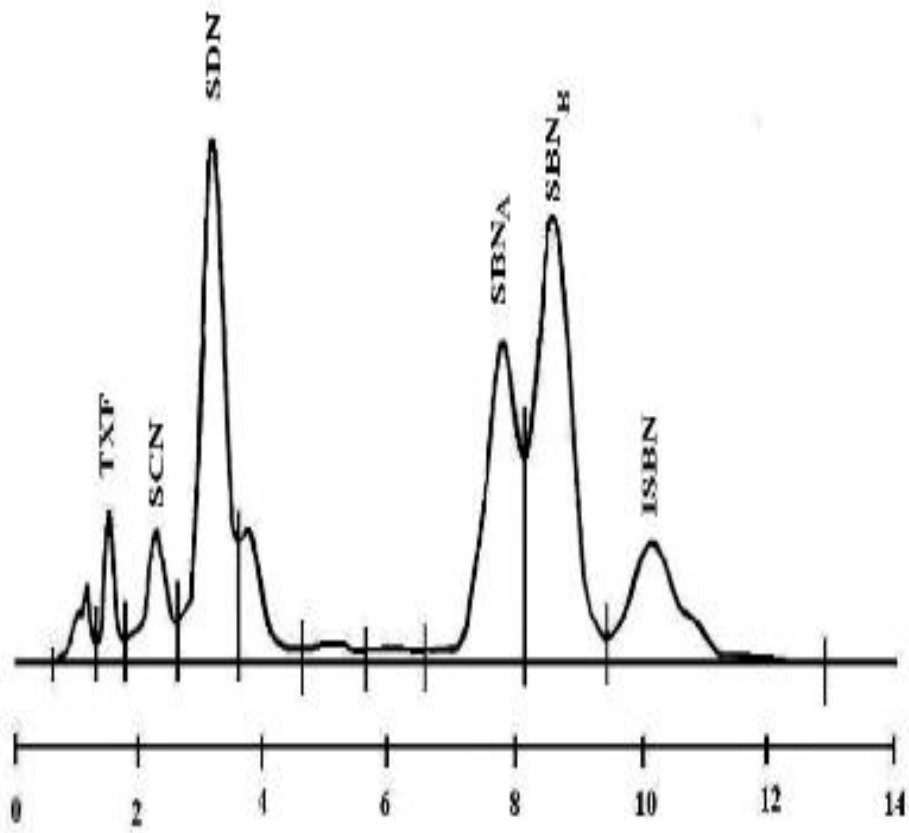


Şekil 2.1.Kvasnicka, F., ve arkadaşlarının önerdiği Kromatogram



Şekil 2.2 .Sigma-Aldrich tarafından önerilen kromatogram

EK-2. (Devam) Silymarın Bileşiklerine Ait Kromatogramlar



Şekil 2.3 . Radjabian ve arkadaşlarının önerdiği Kromatogram

EK-3. Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

46 x 150 mm boyutlarında Acclaim 120 C18, 3 µm kolon laboratuvarımızda mevcuttur. Literatürde bu kolon ile aynı özelliklerde bir analize rastlanmamıştır. Çalışma laboratuvarımızda bulunan kolonun özelliklerine benzer özellikte yapılan silibin analizinin çalışmaları üzerinden yola çıkılarak gerçekleştirildi. Literatürde rastlanan analiz koşulları aşağıdaki çizelgede verildi.

EK-3. Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

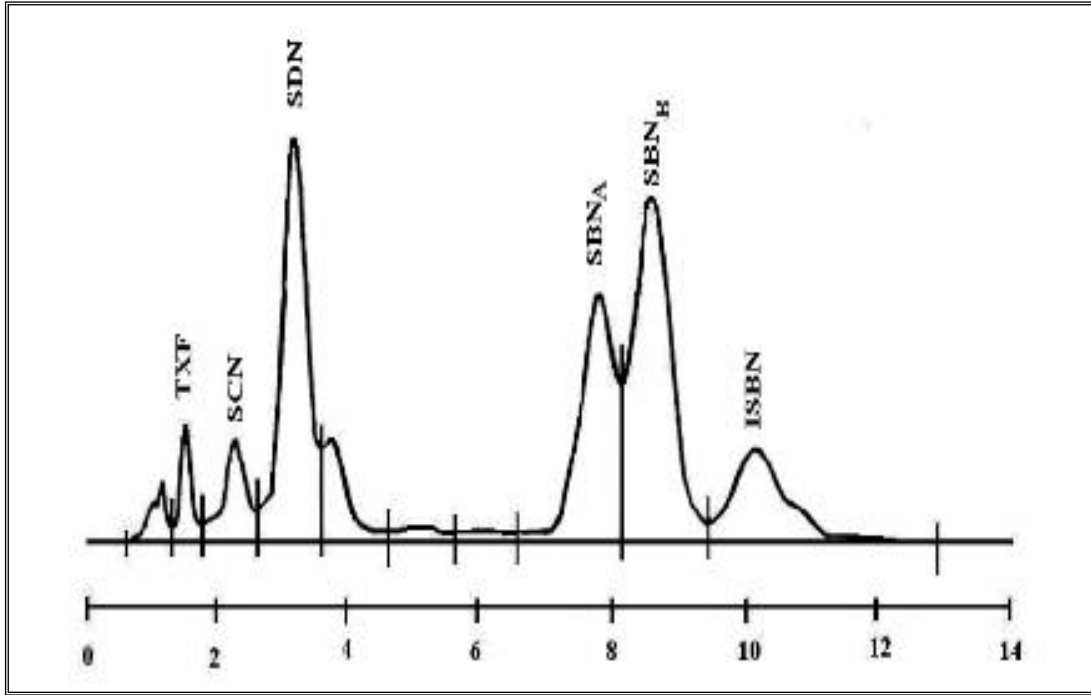
Çizelge 3.1. Literatürde verilen HPLC analiz yöntemleri

Parametreler	1.yöntem Radjabian ve ark.	2.yöntem Shimazsu	3.yöntem Dionex
Taşıyıcı Faz	Metanol: su=1:1 (v/v)	A: 1% Formic Acid in 80/20 Water/Methanol B: 1% Formic Acid in 20/80 Water/Methanol* (Time, %B)(0,15)(5,15)(20,45)(40,45)(41,15)(55,15) Shimadzu Premier	A:Metanol:Su:%85'lik Fosforik Asit 30:70:0.1 B: Metanol: Su: %85'lik Fosforik Asit:70:30:0.1 %50 A-%50 B 30 min %100 B'de 5 min
Kolon	C18, 5 µm,150 x 4.6mm	C18, 5 µm , 150 x 4.6 mm 40 °C	C18, 5 µm, 150 x 4.6 mm
Akış hızı:	1mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Örnek enjeksiyonu:	20 µL	10 µL	5 µL
Dedektör Dalga Boyu	288 nm	288 nm	288 nm
Örnek	10 kat metanol ile seyreltilmiştir.	-	10 kat asetonitril ile seyreltilmiştir.

EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

Yöntem-1

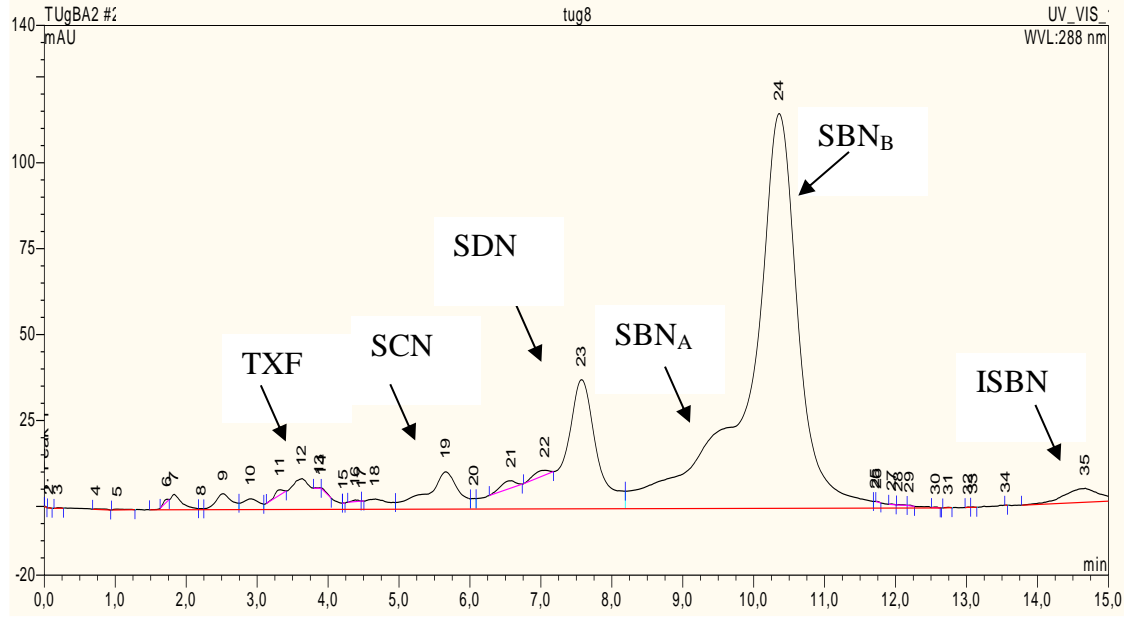
Radjabian ve arkadaşlarının yaptığı çalışma Yöntem-1 olarak belirlenmiştir. 1. Yönteme ait literatürün verdiği kromatogram aşağıda verildi.



Şekil 3.1. Radjabian ve arkadaşlarının önerdiği kromatogram

Ön denemelerde bu yöntem dikkate alınarak tohumdan elde edilen özütler analizlendi. Ancak 1mL/min akış hızı ayırmayı istediğimiz pikleri olumsuz yönde etkileyerek piklerin içi içe çıkmasına neden olmaktadır. Bu sebeple çalışmalar akış hızının azaltılması yönde gerçekleştirildi. 0,8 mL/min ve 0,4 mL/min akış hızında çalışıldı 0,4 mL/min akış hızında anlamlı bir sonuç elde edildi ve elde edilen kromatogram aşağıda verildi.

EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması



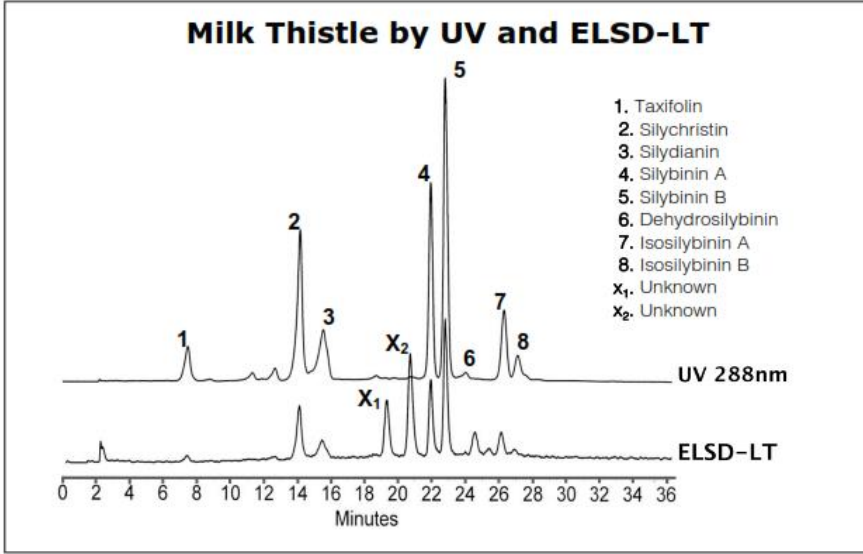
Şekil 3.2. Radjabian ve arkadaşlarının önerdiği yöntem doğrultusunda analizlenen piklere ait kromatogram

Yukarıda ki kromatogramdan da görüleceği üzere silibin A ve B bileşiklerine ait pikler iç içe çıkmaktadır. Bu piklerin ayrılması için 2.yöntem kullanılmıştır.

Yöntem-2

2.yöntemin önerdiği kromatogram aşağıda verildi. (Şekil 3.3). Bu yöntem denenmiş olup anlamlı bir kromatogram elde edilememektedir.

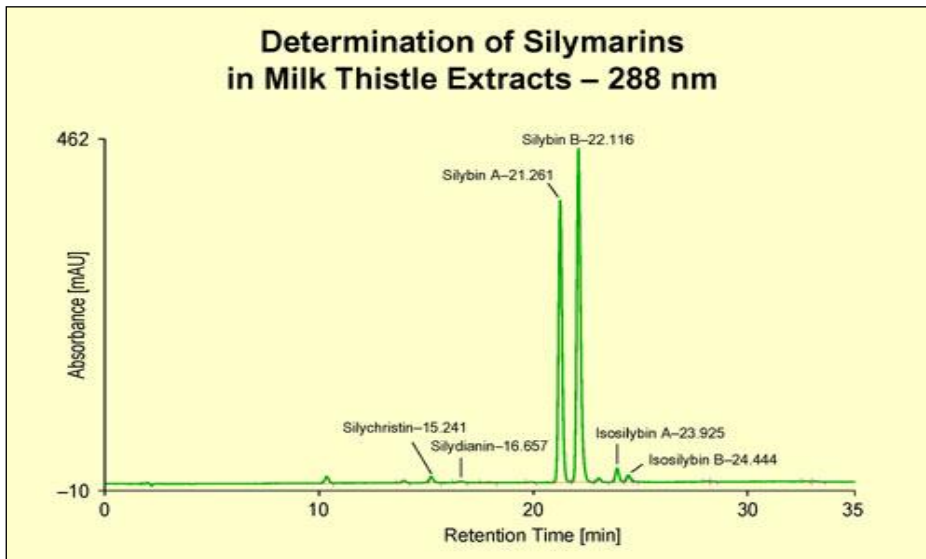
EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması



Şekil 3.4. Shimadzu firmasının önerdiği kromatogram (2.yöntem)

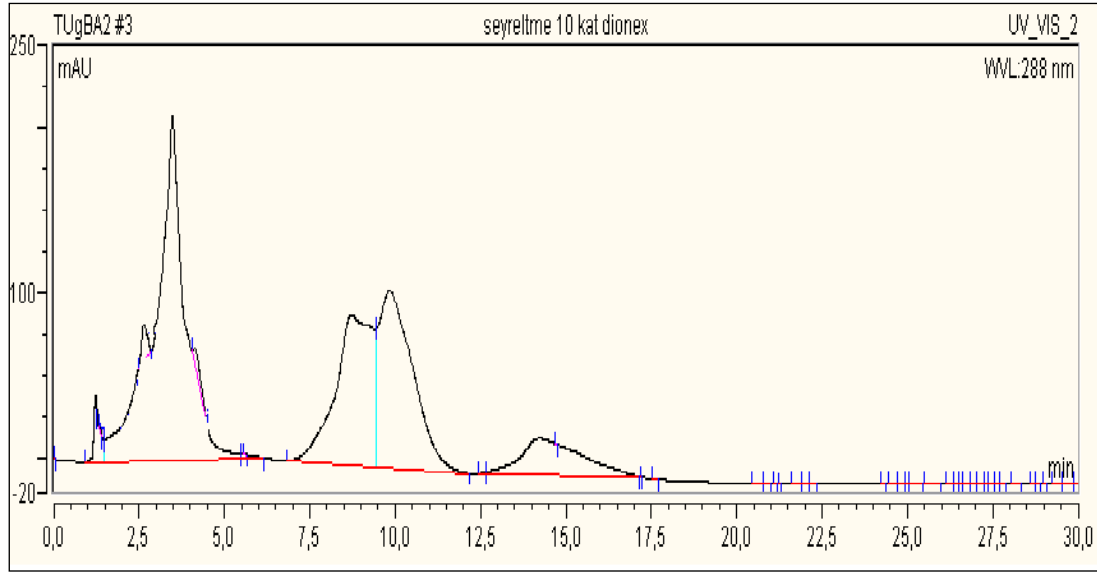
Yöntem-3

İlgili firma ile irtibata geçilerek yeni bir analiz yöntemi olarak 3. Yöntem denendi. Bu yöntem ile aynı koşullar uygulanmış olup, önerilen ve elde edilen kromatogram aşağıda verildi(Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). Bu iki kromatogram kıyaslandığında ise etkin bir analiz yapılamadığı görüldü. Numunenin derişik olarak kolona gönderildiğinden piklerin çakışmış olabileceği düşünülmüş olup numuneler seyreltme yönüne gidildi.



Şekil 2.14. Dionex'in önerdiği kromatogram

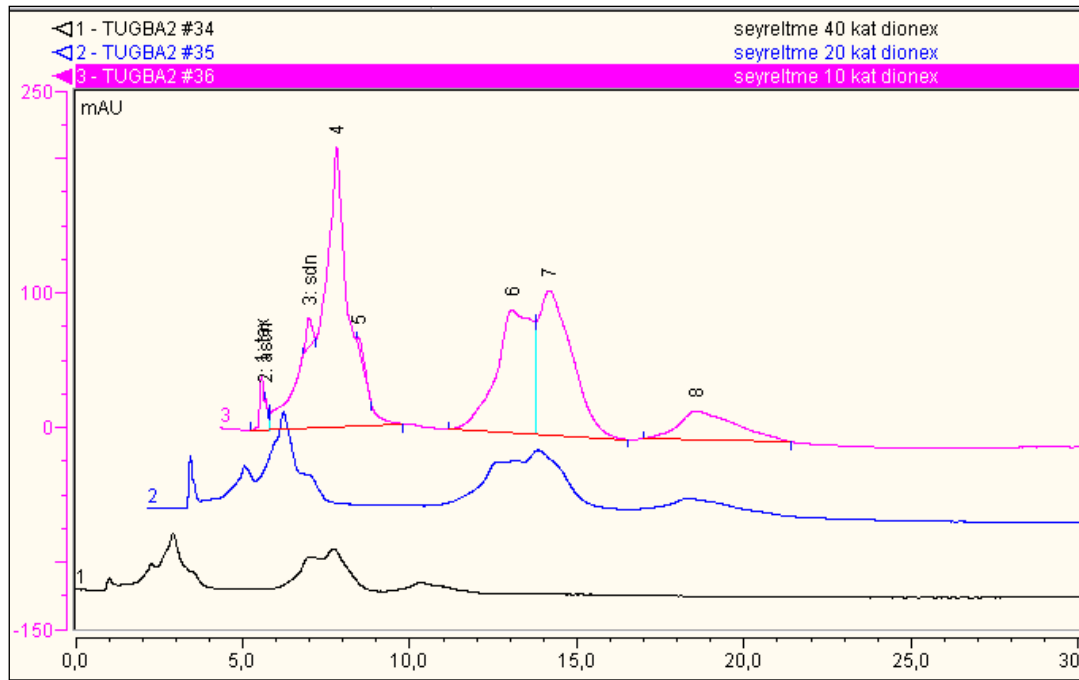
EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması



Şekil 3.5. Deneysel olarak elde edilen kromatogram

Seyreltme Etkisi

Seyreltilen numunelere ait kromatogramlar aşağıda sunuldu.



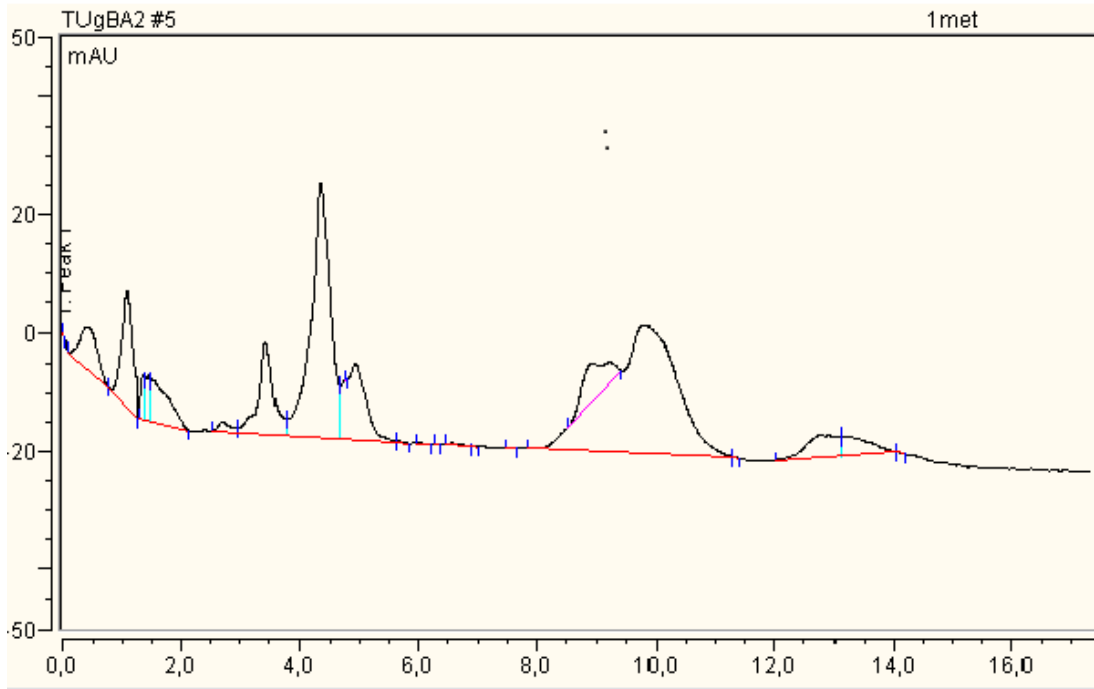
Şekil 3.6. Seyreltme etkisi (Pembe: 10 kat seyreltme, Mavi:20 kat seyreltme, Siyah:40 kat seyreltme)

EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

Şekil 3.6 bakıldığında elde edilen kromatogramlar arasında piklerin ayrılması yönünde belirgin bir fark olmadığı görülmüş, seyreltmeden kaynaklanan bir çakışma gözlemlenmemektedir.

Taşıyıcı Faz Etkisi

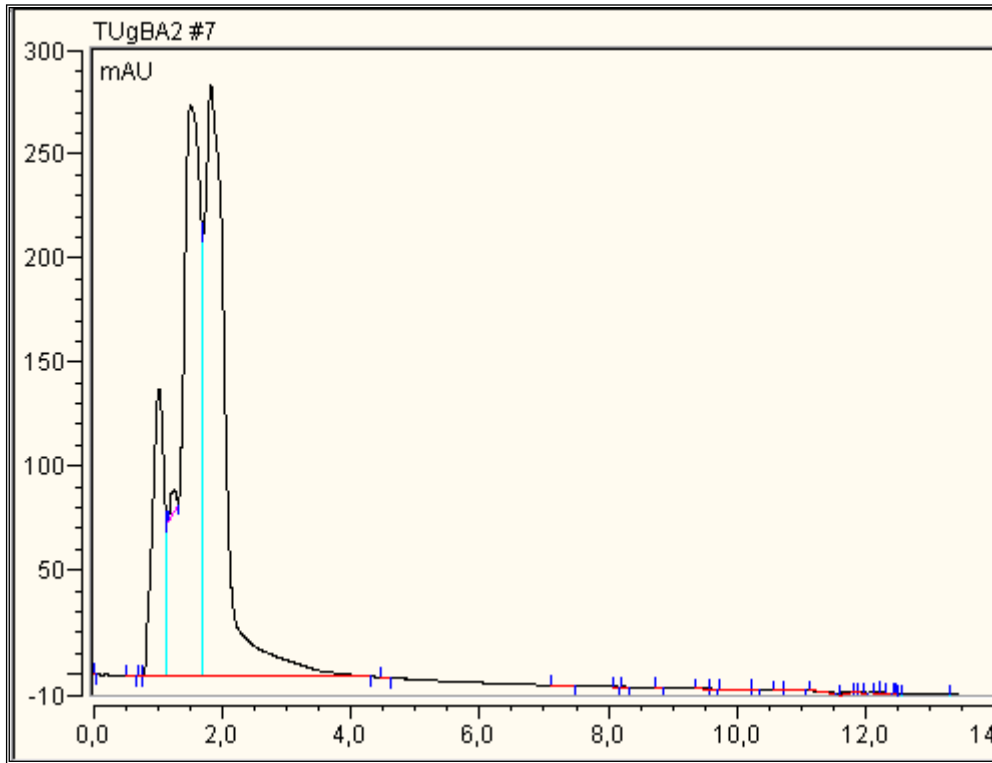
Kullanılan metanolün zamanla eskimesi piklerde kuyruklanmalara sebebiyet vermektedir. Çakışan piklerin ayrılması amacıyla taşıyıcı faz olarak kullanılan metanol kaynağı değiştirildi ve analiz yineleni. Bu kromatogram ilk kullanılan metanol kaynağına oranla piklerde çok hafif omuzlanma olsa da yeterli olmadığı açıktır.



Şekil 3.7. Taşıyıcı faz olan metanolün kaynağının değiştirilmesi ile elde edilen kromatogram

Piklerin yeterince iyi ayrılamaması nedeniyle taşıyıcı faz olarak metanol yerine asetonitril kullanıldı. Asetonitril metanol ile yakın bir polariteye sahip iyi bir çözücüdür. Şekil 2.17 'de görüldüğü üzere asetonitril çözücüsünde iyi bir ayırma sağlanamadığı görüldü.

EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

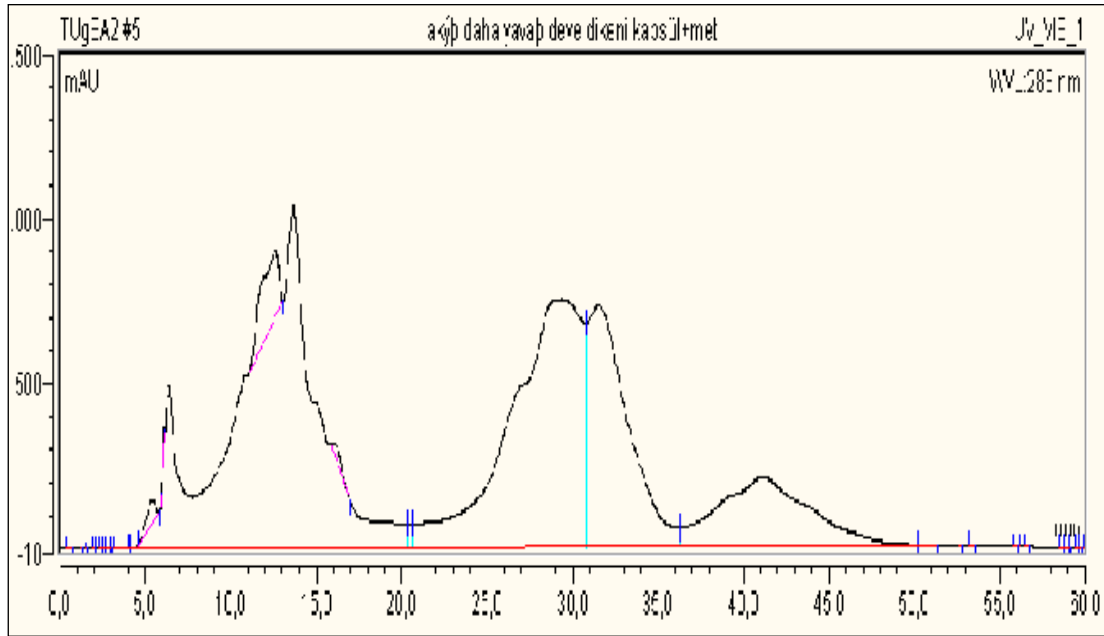


Şekil 3.8. Taşıyıcı faz olarak asetonitril kullanılması ile elde edilen kromotgram

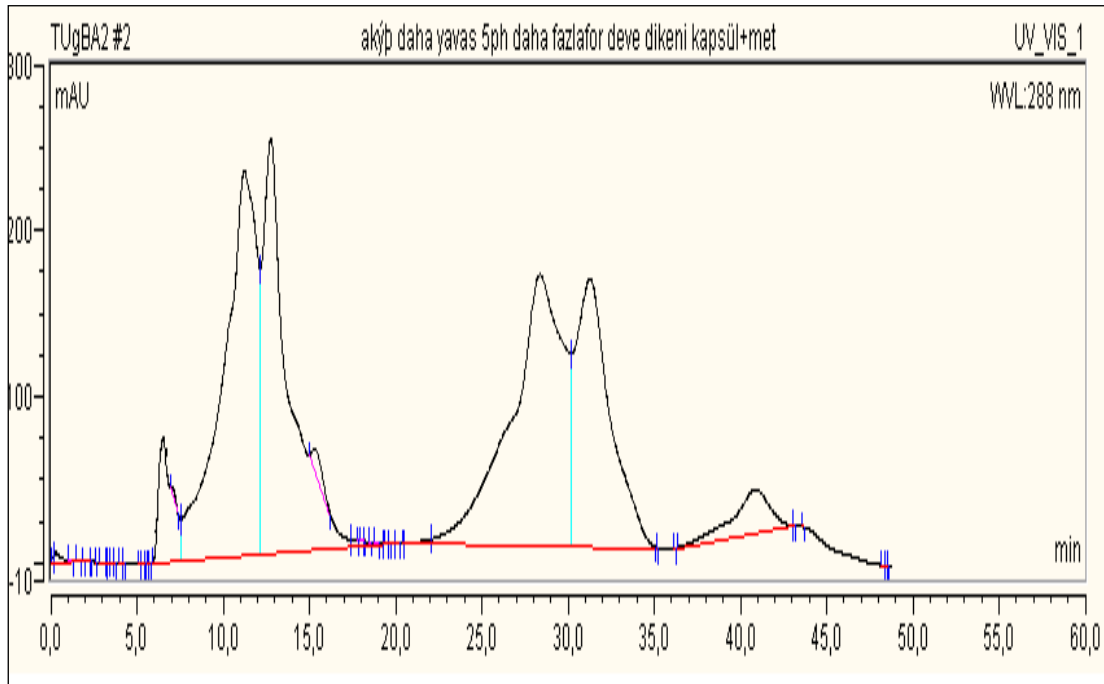
Tampon Etkisi

Analizlenen pikler üzerinde seyreltme etkisi, taşıyıcı faz kaynağının ve çeşidinin etkisi incelenmiş olup yeterince ayırma sağlanamadığından; ayırmaya güçlü bir etkisi olan tampon etkisi araştırıldı. Taşıyıcı fazın pH değıştikçe piklerin birbirlerinden ayrılma oranı da değışmektedir. Bu sebeple numune içerisindeki asit miktarı ve çeşidinin etkisi araştırıldı. Asit etkisi formik asit ve fosforik asit olmak üzere en çok tercih edilen iki asit üzerinde denendi ve elde edilen kromatogramlar aşağıda verildi. Bu kromatogramlar dikkate alındığında ortamda asit olmadığına pikler bir biri içinde çıkarken, asit ilavesiyle pikler içerisinde belirgin yarılmalar görülmektedir. Bununla birlikte fosforik asit ve formik asit denemeleri dikkate alındığında Şekil 3.10 ve Şekil 3.11 kromatogramları benzer sonuçlar göstermektedir.

EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

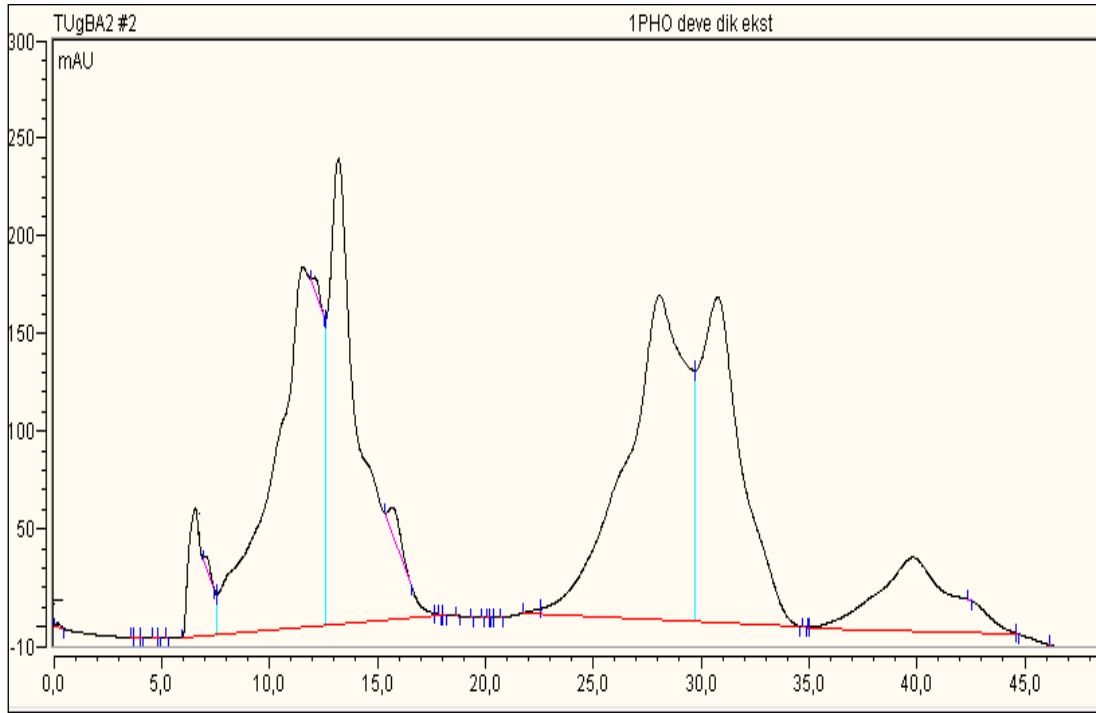


Şekil 3.9. Taşıyıcı faz içerisinde asit yokken elde edilen kromotgram



Şekil 3.10. Taşıyıcı faz içerisinde % 0.5 oranında formik asit ilavesi ile elde edilen kromotgram

EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması



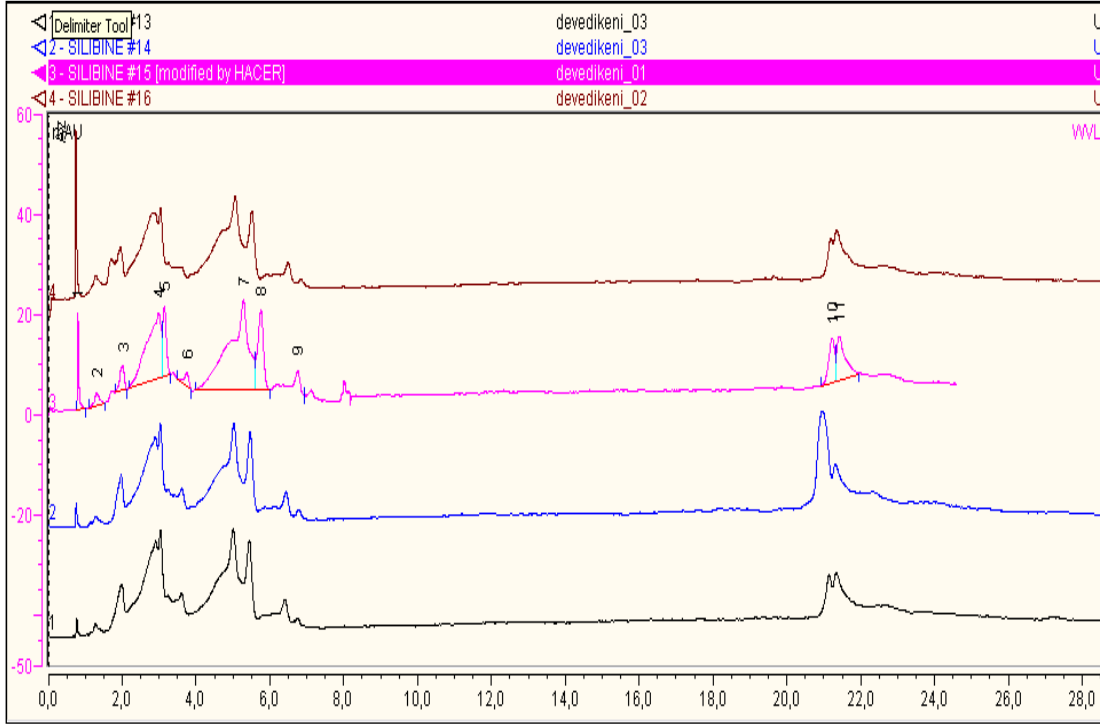
Şekil 3.11. Taşıyıcı faz içerisinde % 0.5 oranında fosforik asit ilavesi ile elde edilen kromotgram

Yukarıda ki çalışmalar sonucunda silibin bileşiklerinin ayrılması için üzerinde çalışılan kolonun ayırma performansının zamanla azalması nedeniyle başka bir kolon ihtiyaç duyuldu ve çalışmalara yeni kolon üzerinden çalışmalara devam edildi. Yeni kolon 4,6 x 150 mm; 3 µm boyutlarında Acclaim 120 C18 özelliklerine sahiptir. Öncelikle kolonun performansının ve tekrarlanabilirliğinin test edilmesi amacıyla numune denemesi yapıldı. Bu amaçla piyasadan kapsül halindeki deve diken ekstresi alınmış, performans ve tekrarlanabilirlik testleri için bu kapsüllerden faydalanıldı. Bu kapsüller metanolde çözülerek 100 ppm çözelti hazırlanmıştır. Bu numuneler 4 kez tekrarlanmıştır (Şekil 3.12).HPLC çalışma koşulları aşağıdaki gibidir.

EK-3. (Devam) Silibin A ve B bileşiklerinin HPLC Analiz Yönteminin Oluşturulması

Çizelge 3.2. HPLC analiz programı-1

Çalışma koşulları	
A çözücüsü	%50 metanol
B çözücüsü	%100 metanol
Akış Hızı	0,8 mL/min
Gradient	5 min %20 B 2 min %20 B 20 min %80 B 30 min %80 B 30,1 min %10 B
Dalga Boyu	288 nm ve 254 nm



Şekil 3.12. Deve dikeneni kapsül numuneleri

Şekil 3.12’de ki kromatogramlar incelendiğinde piklerin aynı absorpsiyon değerinde ve aynı sürede geldiğinden kolon performans deneylerinde tekrarlanabilirliğini sağladığı görüldü. Ancak piklerin beraber gelmesi nedeniyle taşıyıcı fazın pH ayarlamasına gidildi. Yukarıda belirtilen çalışma koşullarında A çözücüsüne % 0,1 formik asit eklendi. Bu şekilde gerçekleştirilen denemelerde anlamlı kromatogram elde edilemediği görüldü.

EK-4. Standart Çözeltilerinin Hesaplamaları

100 ppm standart çözeltisinden 25 ppm, 20 ppm, 15 ppm, 10 ppm ve 5 ppm olmak üzere yeni çözeltiler hazırlanmış olup, yapılan hesaplamalar aşağıda sunuldu.

100 ppm standart çözeltisi

2,5 mg standart 25 mL'ye metanol ile tamamlandı.

25 ppm standart çözeltisi

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \times V_1 = 25 \times 25$$

$V_1 = 6,25$ mL 100 ppm standart çözeltisinden alınır. 25 mL'ye metanol ile tamamlanır.

20 ppm standart çözeltisi

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \times V_1 = 20 \times 25$$

$V_1 = 5$ mL 100 ppm standart çözeltisinden alınır. 25 mL'ye metanol ile tamamlanır.

15 ppm standart çözeltisi

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \times V_1 = 15 \times 25$$

$V_1 = 3,75$ mL 100 ppm standart çözeltisinden alınır. 25 mL 'ye metanol ile tamamlanır.

10 ppm standart çözeltisi

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \times V_1 = 10 \times 25$$

$V_1 = 2,5$ mL 100 ppm standart çözeltisinden alınır. 25 mL 'ye metanol ile tamamlanır.

EK-4. (Devam) Standart Çözeltilerinin Hesaplamaları

5 ppm standart çözeltisi

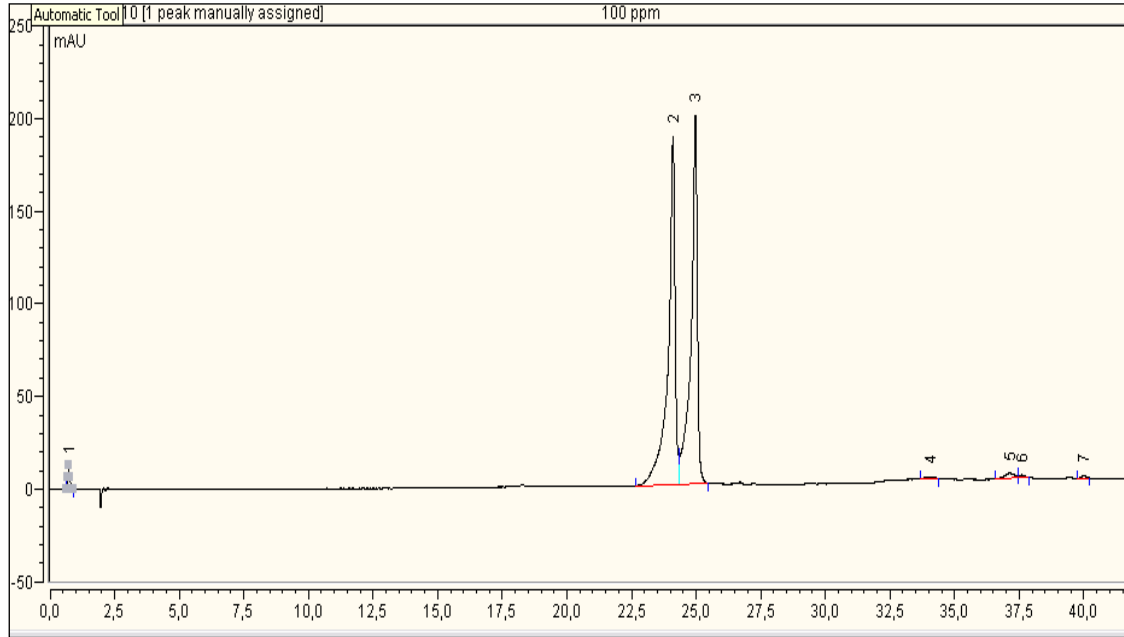
$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \times V1 = 5 \times 25$$

$V1 = 1,25$ mL 100 ppm standart çözeltisinden alınır. 25 mL 'ye metanol ile tamamlanır.

EK-5. Kalibrasyon Grafiği

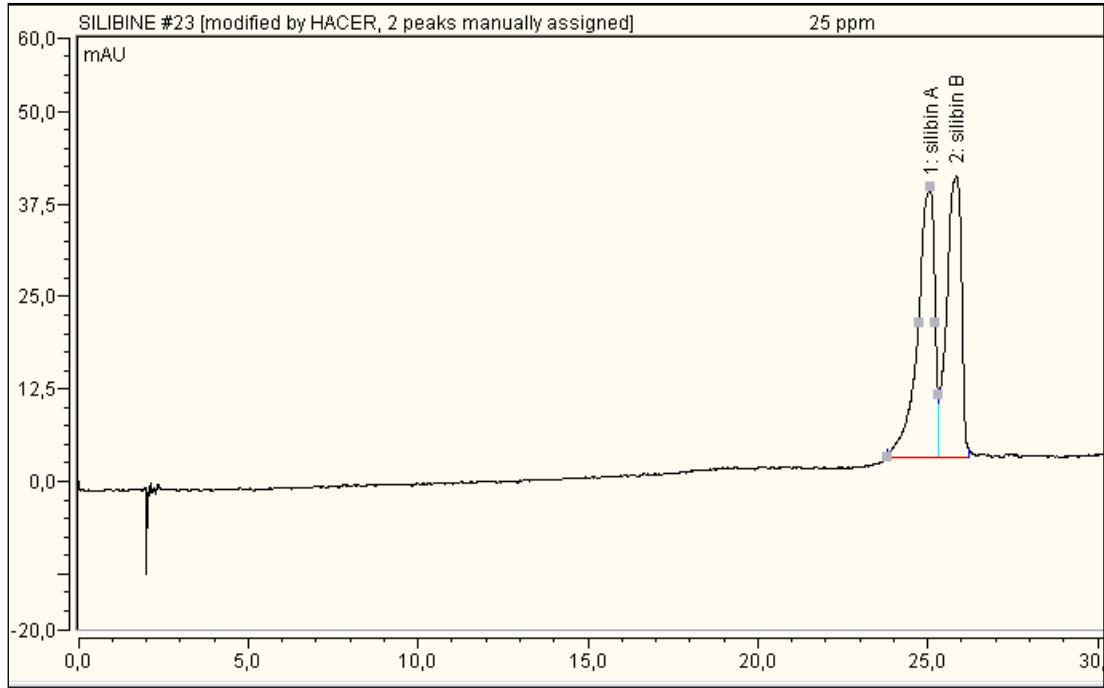
100 ppm metanolde hazırlandı. Silibin A ve B standart maddesi enjekte edildi ve elde edilen kromatogram aşağıda verildi



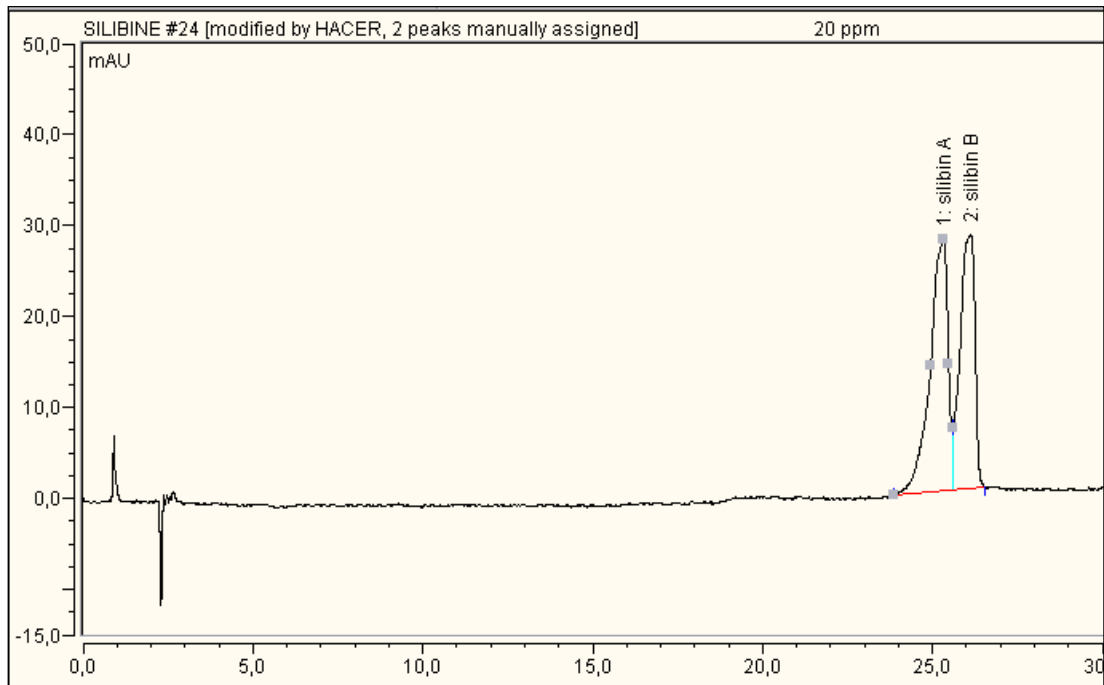
şekil 5.1.. 100 ppm standart maddeye ait Kromatogram

Yukarıdaki kromatogram dikkate alındığında silibin A ve silibin B ‘den oluşan karışımın 100 ppm miktarında anlamlı olarak ayrıldığı görüldü. Bu noktadan sonra kalibrasyon grafiği oluşturulması yönünde pikler düşük derişimlere seyreltildi.

EK-5. (Devam) Kalibrasyon Grafiği

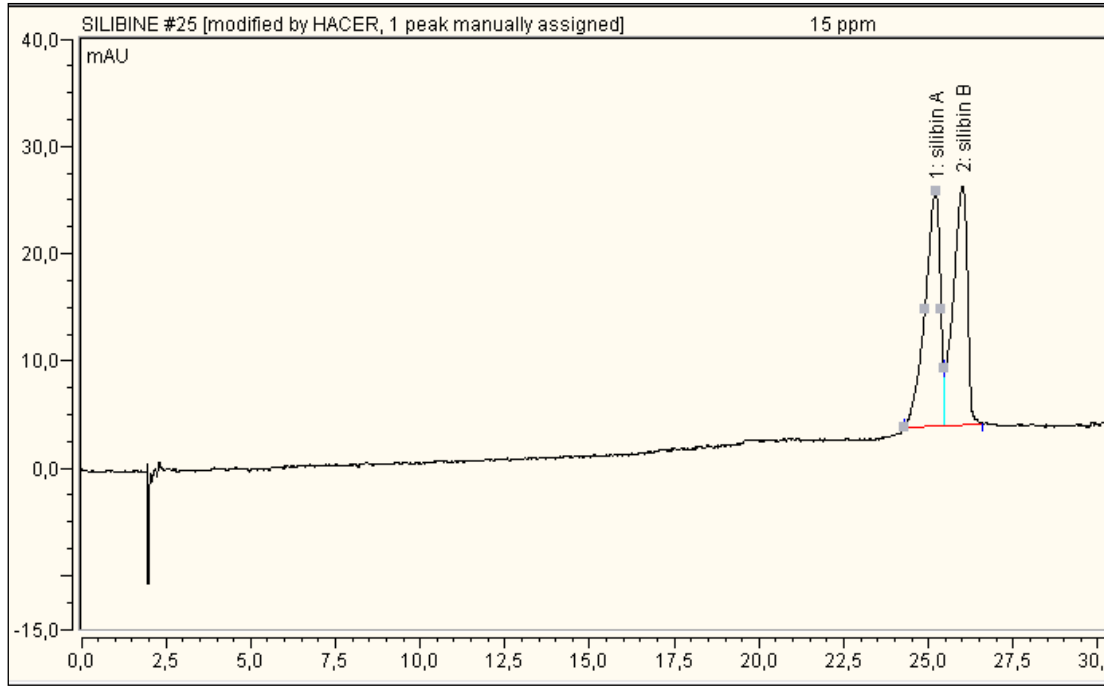


Şekil 5.2. 25 ppm standart maddeye ait Kromatogram

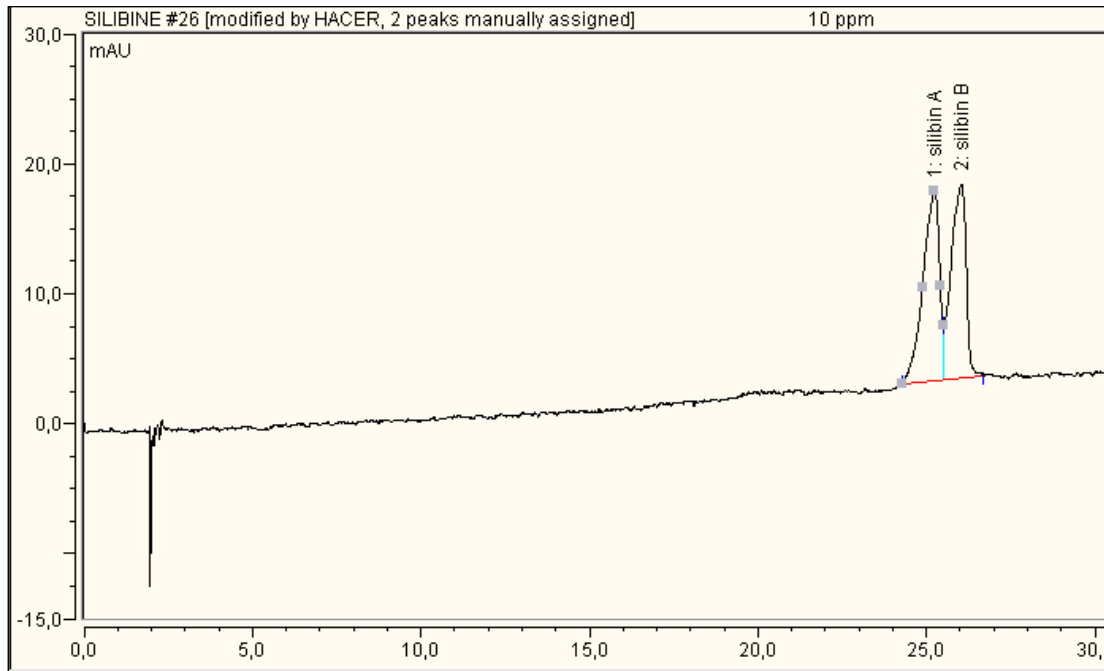


Şekil 5.3. 20 ppm standart maddeye ait Kromatogram

EK-5. (Devam) Kalibrasyon Grafiği

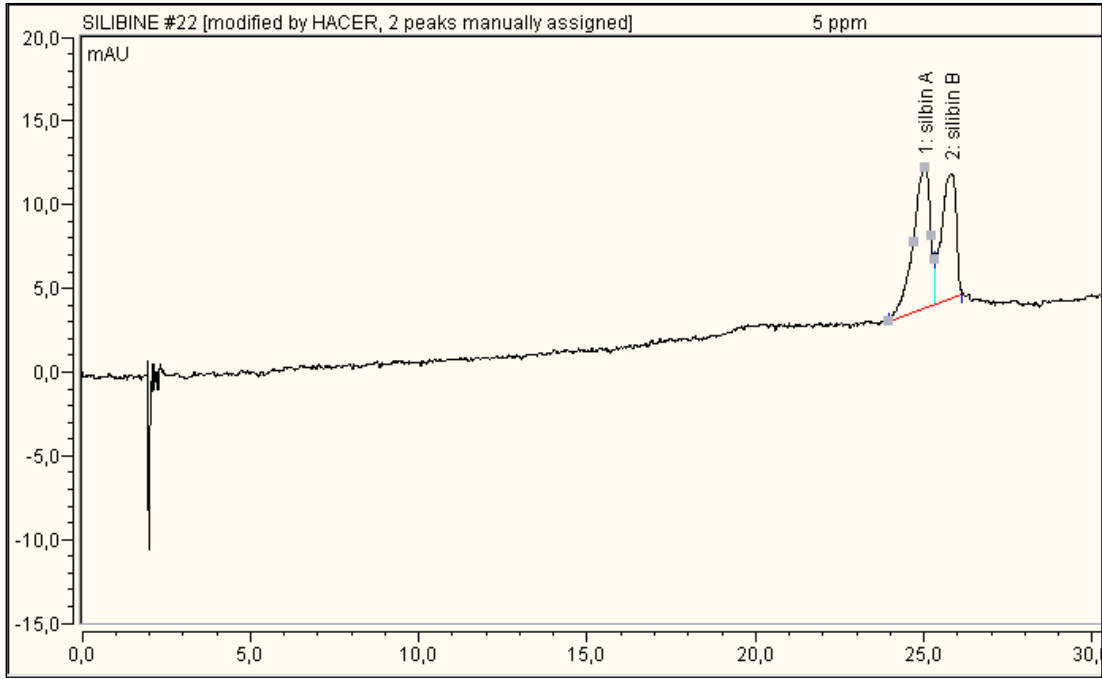


Şekil 5.4. 15 ppm standart maddeye ait Kromatogram



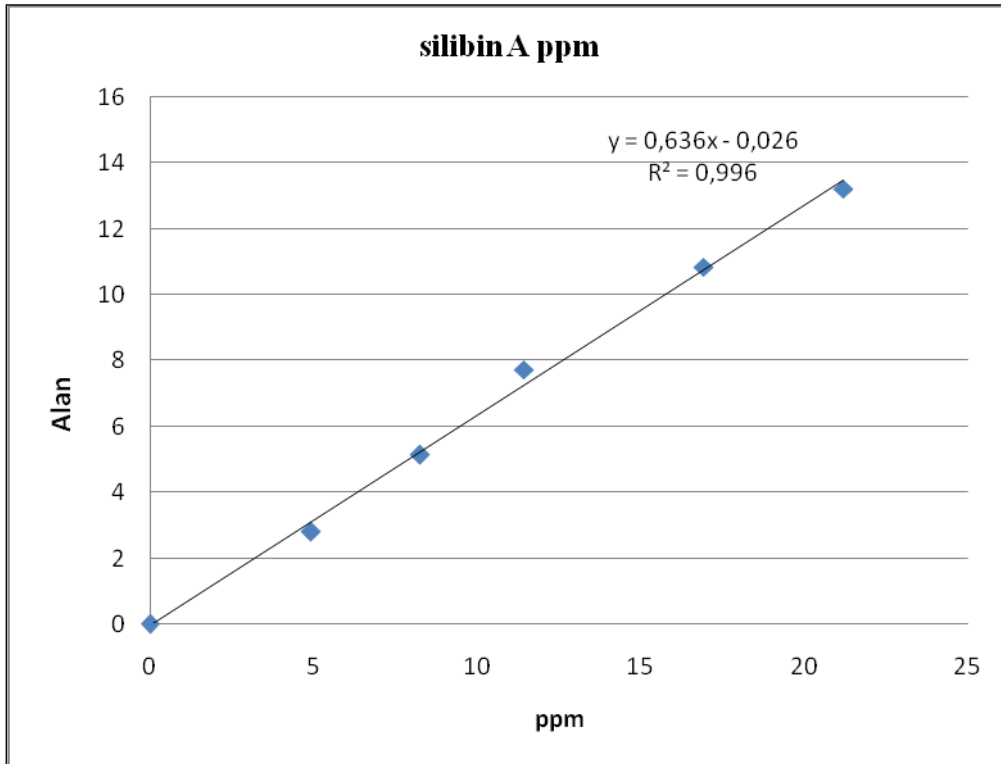
Şekil 5.5. 10 ppm standart maddeye ait Kromatogram

EK-5. (Devam) Kalibrasyon Grafiği



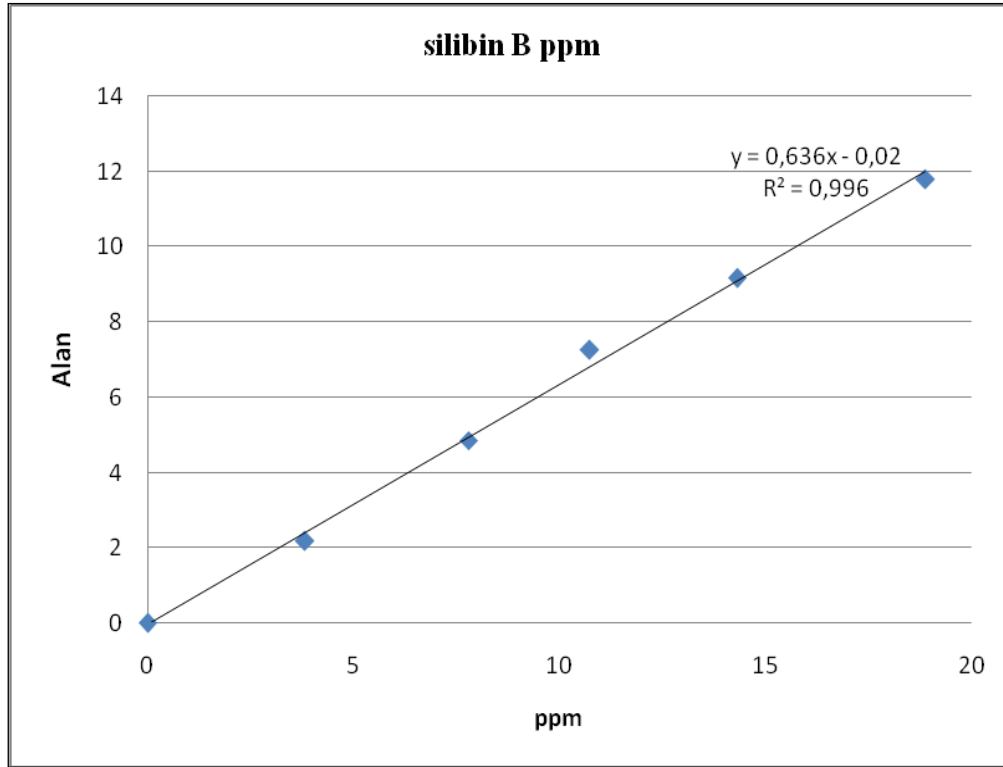
Şekil 5.6. 5 ppm standart maddeye ait Kromatogram

Yukarıdaki kromatogramlardan elde edilen kalibrasyon grafikleri aşağıda sunuldu.



Şekil 5.7. Silibin A'ya ait kalibrasyon grafiği

EK-5. (Devam) Kalibrasyon Grafiği



Şekil 5.8. Silibin B'ye ait kalibrasyon grafiği

Şekil 5.7 ve Şekil 5.8'de yer alan kalibrasyon grafiklerinden de görüleceği üzere silibin A ve silibin B için regrasyon katsayısı $R^2=0,996$ olarak bulunmuştur.

EK-6. Hesaplamalar

Başlangıç Hızı

Farklı CO₂ akış hızı için başlangıç hızları aşağıda verildi.

1) 3 mL/min akış hızı için özütleme verimi başlangıç hızı

$$r_1 = dC_1/dt = (70,23-0)/(30-0) * p = 2,34 * p \text{ mg ürün/mL*min}$$

2) 4 mL/min akış hızı için özütleme verimi başlangıç hızı

$$r_2 = dC_2/dt = (89,25-0)/(30-0) * p = 2,98 * p \text{ mg ürün/mL*min}$$

3) 5 mL/min akış hızı için özütleme verimi başlangıç hızı

$$r_3 = dC_3/dt = (115,22-0)/(30-0) * p = 3,84 * p \text{ mg ürün/mL*min}$$

Akış hızı 3mL/min'den 4 mL/min'e çıktığı durumdaki başlangıç hızındaki artış miktarı,

$$\frac{p * (2,98-2,341)}{p * 2,341} = 2,8 \text{ kat artış}$$

Akış hızı 4mL/min'den 5 mL/min'e çıktığı durumdaki başlangıç hızındaki artış miktarı,

$$\frac{p * (3,84-2,98)}{p * 2,98} = 2,8 \text{ kat artış.}$$

Akış hızı 1 mL/min artıkça başlangıç hızlarında 2,8'lik bir artış olduğu görüldü.

Akış hızı artırıldığında elde edilen özütleme verimleri

3, 4 ve 5 mL/min CO₂ akış hızındaki elde edilen özütleme verimleri sırasıyla 148 mg 166 ve 170 mg ürün/g tohum'dur.

3 mL/min 'den 4 mL/min çıktığı durumda verimdeki artış miktarı

$$\frac{166-148}{148} = 10,8 \text{ kat'dır.}$$

4 mL/min'den 5 mL/min çıktığı durumda verimdeki artış miktarı

$$\frac{170-166}{166} = 2,3 \text{ kat'dır.}$$

Bu artış giderek azaldığı görülmüştür.

EK-6. (Devam) Hesaplamalar

3 mL/min'den 4 mL/min çıktığı durumda toplam silibin verimdeki artış miktarı

$$(2,34-0,74)/2,34=\%68$$

Karbondiyoksit yoğunluğundaki artış

40, 60, 80 °C yoğunlukları sırasıyla 839,9; 723,8; 594,1 kg/m³ şeklindedir. Sıcaklık, 40°C'den 80 °C'ye çıktığında yoğunluktaki % azalma miktarı,

$$\frac{(839,9-594,1)}{839,9} * 100 = \% 29$$

Tanecik Boyutu

1,2 ve 0,3025 mm tanecik boyutu için sırasıyla özütleme miktarları 80,71 ve 327,31 mg ürün/g tohum'dur.

$$\frac{(327,31-80,71)}{327,31} * 100 = \% 75$$

Tanecik boyutu azaldığında özütleme verimi %75 arttığı görüldü.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇELİK, Hatice Tuğba
 Uyuşu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 29/08/1981 Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : -
 Faks : -
 e-posta : htgumusdere@gazi.edu.tr



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/ Kimya Mühendisliği Bölümü	2014
Yüksek lisans	Ankara Üniversitesi/Kimya Mühendisliği Bölümü	2007
Lisans	Ankara Üniversitesi/Kimya Mühendisliği Bölümü	2003

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2005- 2013	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2013-Devam Ediyor	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Kimya Mühendisi

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

- “Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu İle Deve Dikeninden Silybine Özütleme, Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu”, Araştırmacı (06/2013-04).
- Gümüsdere H. T., Artan T Güvenç A., Dönmez G., Mehmetoglu Ü., Textile Azo Dyes Decolourization by Combined Ultrasonication and Microbial Removal, Survival and Sustainability , Environmental Earth Sciences, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 885-892 (2011).

- Artan Onat T., Gümüşdere, H. T., Güvenç, A., Dönmez, G., Mehmetoğlu, Ü., (2010). Decolorization of textile azo dyes by ultrasonication and microbial removal. *Desalination*, 255:154-158.
- Gümüşdere, H. T., Güvenç, A., Mehmetoğlu, Ü., 2007. “Degradation of Textile Dyes by Application of Ultrasound”, European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6), 16-20 September, Book of Abstracts, Vol 1, 959-960. Copenhagen, Denmark.
- . Gümüşdere, H. T., Artan, T., Güvenç, A., Dönmez, G., Mehmetoğlu, Ü., 2007. “Textile Azo Dyes Decolorization by combined ultrasonication and microbial removal”, International Conference on Environment: Survival and Sustainability, ESS2007, 19-24 February, Near East University, Abstracts Book, 460, Nicosia-Northern Cyprus.
- Gümüşdere, H.T., Erte, E., A., Güvenç , Ü. Mehmetoglu, İzoamil Alkolün Esterlesme Tepkimesine Lipaz ve Ses Ötesi Dalgaların Etkisi, 6. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-6), 7-10 Eylül, İzmir, (2004), Bildiri Özetleri Kitabı, RM-1.
- Gümüşdere, H.T., Güvenç, A., Mehmetoglu, Ü., Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Bazı Azoboyar Maddelerin Ses Ötesi Dalgalarla Bozundurulması, 7. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-7), 5-8 Eylül, Eskişehir (2006). Bildiri Özetleri Kitabı, ÇD36.

Hobiler

Kitap okuma, Müzik dinleme



GAZİ GELECEKTİR..