

**ADAÇAYI (*Salvia Officinalis*) YAPRAKLARINDAN
SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT EKSTRAKSİYONU İLE
DOĞAL ANTİOKSİDAN ELDESİ VE TAYİNİ**

Nuriye Demet ŞENSOY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2007

ANKARA

Nuriye Demet ŞENSOY tarafından hazırlanan ADAÇAYI (*Salvia Officinalis*) YAPRAKLARINDAN SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT EKSTRAKSİYONU İLE DOĞAL ANTİOKSİDAN ELDESİ VE TAYİNİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Ayşe Murathan
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Emine KILIÇ

Üye : Prof. Dr. Ahmet BİÇER

Üye : Prof. Dr. Metin GÜRÜ

Üye : Prof. Dr. Atilla MURATHAN

Üye : Doç. Dr. Ayşe MURATHAN

Tarih : 28/06/2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orjinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nuriye Demet ŞENSOY

**ADAÇAYI YAPRAKLARINDAN (*Salvia Officinalis*)
SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT EKSTRAKSİYONU İLE
DOĞAL ANTIOKSİDAN ELDESİ VE TAYİNİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Nuriye Demet ŞENSOY

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2007**

ÖZET

Bu çalışma, ülkemizde doğal olarak yetişen ve Mersin yöresinden temin edilmiş olan adaçayı yapraklarından antioksidan eldesine süperkritik akışkan ekstraksiyonunda basıncın etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Ekstraksiyon, farklı basınç değerleri (75, 80, 85 bar) kullanılarak ve antioksidanların bozunmasını önlemek amacıyla sıcaklık 35 °C' da sabit tutularak yapılmıştır. Soksile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen verim daha düşük bulunurken, süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunda basıncın yükselmesi ile verim artmıştır. Ekstraksiyondan elde edilen ekstraktların değişik dalga boylarında HPLC cihazı yardımıyla analizleri yapılmıştır. Elde edilen ekstraktların HPLC analizi ile pik alanları tespit edilmiştir.

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunda elde edilen ekstraktların maksimum absorplama dalga boyu olan 280 nm' deki pik alanlarının 320 nm ve 400 nm' ye göre daha fazla olduğu bulunmuştur.

Bilim Kodu : 910.1.140
Anahtar Kelimeler : Adaçayı, Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu, Antioksidan
Sayfa adedi : 93
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Ayşe MURATHAN

**OBTAINING OF NATURAL ANTIOXIDANT
FROM SAGE LEAVES (*Salvia Officinalis*) WITH
SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION
(M. Sc. Thesis)**

Nuriye Demet ŞENSOY

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

June 2007

ABSTRACT

This study worked for gaining antioxidant and researching effect of pressure parameter to supercritical fluid extraction of sage leaves which is cultivated naturally in Mersin region.

These extractions were made at various pressure value (75, 80, 85 bar) and because of prevention of antioxidants degeneration, 35 °C temperature was used and so temperature was stabil. Supercritical carbon dioxide extraction method and soxhlet extraction method yields were compared, soxhlet extraction method yield was lower, and then supercritical carbon dioxide extraction yield increased with pressure.

At the end of the extraction; HPLC analysis were made at various wavelengths. Peak areas of supercritical carbon dioxide extracts were found higher at maximum absorption wavelength at 280 nm than 320 nm and 400 nm wavelengths.

Science Code : 910.1.140
Key Words : Sage, Supercritical Carbon dioxide Extraction, Antioxidant
Page Number : 93
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Ayşe MURATHAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen sayın danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Ayşe MURATHAN' a gösterdiği destek ve anlayış için teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince destek ve ilgilerini eksik etmeyen, her zaman böyle güzel bir aileye sahip olduğum için ne kadar şanslı olduğumu hissettiren aileme beni hayatta hiç yalnız bırakmadıkları için teşekkür ederim.

Bu çalışmada Devlet Planlama Teşkilatı (Proje no : 2001K20590) “Gazi Üniversitesi İleri araştırma ve eğitim Programları” isimli proje tarafından sağlanan destekle yürütülmüştür.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|--------------|
| ÖZET..... | iv |
| ABSTRACT..... | vi |
| TEŞEKKÜR..... | viii |
| İÇİNDEKİLER..... | ix |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ..... | xii |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | xiii |
| RESİMLERİN LİSTESİ..... | xiv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER..... | 4 |
| 2.1. Adaçayı..... | 4 |
| 2.1.1. Adaçayının tarihçesi..... | 4 |
| 2.1.2. Adaçayının yapısı ve yetiştirme koşulları..... | 5 |
| 2.1.3. Kullanım alanları..... | 11 |
| 2.2. Antioksidan Maddeler..... | 14 |
| 2.2.1. Antioksidan maddelerin sınıflandırılması..... | 18 |
| 2.2.2. Antioksidan aktivitesinin saptanmasına yönelik metotlar..... | 20 |
| 2.3. Süperkritik Ekstraksiyon Yöntemi..... | 23 |
| 2.3.1. Süperkritik akışkanın tanımı..... | 26 |
| 2.3.2. Süperkritik akışkan seçimi..... | 27 |
| 2.3.3. Süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemi..... | 30 |
| 2.3.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun avantajları..... | 30 |

Sayfa

| | |
|---|----|
| 2.3.5. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun dezavantajları..... | 31 |
| 2.3.6. Süperkritik akışkanlar ile ayırma teknolojisinin..... uygulamaları | 32 |
| 2.3.7. Süperkritik akışkanların kullanım alanları..... | 32 |
| 2.3.8. Ekstraksiyon verimini artırıcı parametreler..... | 33 |
| 2.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ve Antioksidan Tayini..... İle İlgili Literatür Çalışmaları | 35 |
| 2.5. Soksile Ekstraksiyonu..... | 41 |
| 2.6. HPLC Cihazı ve Tekniği..... | 42 |
| 2.6.1. Sıvı kromatografi birimleri ve özellikleri..... | 43 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR..... | 46 |
| 3.1. Materyal..... | 46 |
| 3.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu Deneyleri..... | 47 |
| 3.3. Soksile Ekstraksiyonu Deneyi..... | 48 |
| 3.4. HPLC..... | 49 |
| 4. DENEY SONUÇLARI..... | 52 |
| 4.1. Adaçayı Yapraklarında Nem Miktarı Tayini Deney Sonuçları..... | 52 |
| 4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ve Soksile Ekstraksiyonu..... Deney Sonuçları | 52 |
| 4.3. Adaçayının UV- Visible Spektrofotometre Sonuçları..... | 55 |
| 4.4. HPLC Analiz Sonuçları..... | 55 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 61 |
| KAYNAKLAR..... | 63 |
| EKLER..... | 69 |
| EK-1 Adaçayı ekstraktının UV spektrofotometre analiz grafiği..... | 70 |

Sayfa

| | |
|--|----|
| EK-2 80 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC..... | 71 |
| analiz sonucu | |
| EK-3 80 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 280 nm dalga..... | 72 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-4 85 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC..... | 73 |
| analiz sonucu | |
| EK-5 85 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 280 nm dalga..... | 74 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-6 75 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC..... | 75 |
| analiz sonucu | |
| EK-7 75 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 360 nm dalga..... | 76 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-8 80 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC..... | 77 |
| analiz sonucu | |
| EK-9 80 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 360 nm dalga..... | 78 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-10 85 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC..... | 79 |
| analiz sonucu | |
| EK-11 85 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 360 nm dalga..... | 80 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-12 75 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC..... | 81 |
| analiz sonucu | |
| EK-13 75 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 400 nm dalga..... | 82 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-14 80 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC..... | 83 |
| analiz sonucu | |
| EK-15 80 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 400 nm dalga..... | 84 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-16 85 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC..... | 85 |
| analiz sonucu | |
| EK-17 85 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 400 nm dalga..... | 86 |
| boyunda HPLC analiz sonucu | |
| EK-18 Soksile ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu..... | 87 |
| EK-19 Soksile ekstraktının alfa-tokoferollu 280 nm dalga boyunda HPLC..... | 88 |
| analiz sonucu | |
| EK-20 Soksile ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu..... | 89 |
| EK-21 Soksile ekstraktının alfa-tokoferollu 360 nm dalga boyunda HPLC..... | 90 |
| analiz sonucu | |
| EK-22 Soksile ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu..... | 91 |
| EK-23 Soksile ekstraktının alfa-tokoferollu 400 nm dalga boyunda HPLC..... | 92 |
| analiz sonucu | |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 93 |

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|---|--------------|
| Çizelge 2.1. Adaçayının aromaterapi ve ilaçlarda genel kullanımı..... | 14 |
| Çizelge 2.2. Bazı doğal antioksidanlar..... | 17 |
| Çizelge 2.3. Akışkanların fizikokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması..... | 27 |
| Çizelge 2.4. Bazı süperkritik çözücülerin kritik değerleri..... | 28 |
| Çizelge 2.5. Süperkritik CO ₂ ' in özellikleri..... | 29 |
| Çizelge 3.1. TSE' ye göre adaçayı standartları..... | 46 |
| Çizelge 3.2. HPLC deneyi gradient programı..... | 50 |
| Çizelge 3.3. HPLC deneyinde analiz edilen numeler ve analizin yapıldığı UV-Visible dalga boyları..... | 51 |
| Çizelge 4.1. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu deney sonuçları..... | 52 |
| Çizelge 4.2. 280 nm dalga boyunda HPLC analizlerinin sonuçları..... | 56 |
| Çizelge 4.3. 360 nm dalga boyunda HPLC analizlerinin sonuçları..... | 56 |
| Çizelge 4.4. 400 nm dalga boyunda HPLC analizlerinin sonuçları..... | 57 |

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 2.1. Adaçayında bulunan başlıca fenolik maddelerin.....11 kimyasal yapısı | |
| Şekil 2.2. RRR- α – tokoferolun kimyasal yapısı.....17 | |
| Şekil 2.3. Saf bir madde için sıcaklık-basınç faz diyagramı.....26 | |
| Şekil 2.4. Soksile ekstraktörü.....41 | |
| Şekil 2.5. HPLC cihazı akış şeması.....43 | |
| Şekil 3.1. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu sistemi.....47 | |
| Şekil 4.1. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu.....51 deney sonuçları verim grafiği | |
| Şekil 4.2. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ve soksile ekstraksiyonu.....51 deneylerinin verim karşılaştırılması | |
| Şekil 4.3. 75 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC.....59 analiz sonucu | |
| Şekil 4.4. 75 bar süperkritik CO ₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 280 nm60 dalga boyunda HPLC analiz sonucu | |

RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim | Sayfa |
|--|--------------|
| Resim 2.1. Adaçayının (<i>Salvia Officinalis</i>) bitkisinin görünümü..... | 4 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

μ

Pc

Tc

Açıklama

Mikron ölçü birimi

Kritik Basınç

Kritik sıcaklık

Kısaltmalar

AOM

BHA

BHT

DPPH

GC

HPLC

MS

PG

TSE

TBHQ

Açıklama

Aktif oksijen metodu

Bütillenmiş hidroksi anisol

Bütillenmiş hidroksi toluen

1,1-difenil-2-fenilhidrazin

Gaz kromatografi

Yüksek basınç sıvı kromatografisi

Kütle spektroskopisi

Propil gallat

Türk Standartları Enstitüsü

Tersiyer bütül hidrokinon

1. GİRİŞ

Adaçayı çok eski çağlardan beri ünlü bir şifalı bitki olarak bilinmektedir. Adaçayı, ilaç bitkisi olarak kullanılan bitkilerin arasında en uzun tarihe sahip olan bitkilerden birisidir. Adaçayı bitkisinin yaklaşık olarak 900 türü vardır ve birçok adaçayı türü kozmetikte, parfümeride, ilaç endüstrisinde ve bunların yanında bitkisel çay ve yiyeceklerde kullanılmaktadır [Aleksovski ve Sovova, 2006].

Adaçayı geçen yıllarda fenolik antioksidanlara sahip olması nedeniyle birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmaların sonucunda adaçayı bitkisinin, güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda adaçayı, sahip olduğu esansiyel yağ ve antioksidan bileşenler açısından ekonomik olarak da araştırma konusu olmuştur. Yiyecekler ve bazı doğal gıdaları koruyarak ve bozunmalarını önleyerek raf ömrünü uzatmak için, adaçayı antioksidanları, bu konuda oldukça iyi bilinen biberiye antioksidanlarına alternatif oluşturmuştur. Adaçayı ekstraktlarının daha önce yapılmış olan çalışmalarda birçok fenolik bileşene sahip olduğu açıklanmıştır. Antioksidan özelliği esas olarak, karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asite bağlanmaktadır. Adaçayı ekstraktı aynı zamanda, toplam antioksidan aktivitesine katkıda bulunduğu düşünülen flavonoid ve diğer fenolik bileşenleri içermektedir. Adaçayı ekstraktının ticari olarak kalitesi bu fenolik bileşen içeriğine bağlıdır [Durling ve ark., 2007].

Adaçayı bitkisi ile ilgili yapılan birçok çalışmada, adaçayı bitkisinin sahip olduğu bileşenlerin sağlığı korumaya faydalı olduğu için çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel tıpta oldukça yaygın olarak kullanıldığı görülmüştür. Beyin fonksiyonlarının ölmesi, kanser, kalp rahatsızlıkları ve bağışıklık sisteminin zayıflaması ile ilgili durumlarda uygulanması artmıştır. Bu rahatsızlıkların oluşum sebebi, serbest radikallerin sebep olduğu hücre bozulması olabilir ve insanların bu antioksidanları kullanmaları birçok hastalığı önlemede önemli rol oynayabilmektedir [Lu ve ark., 2001].

Yiyeceklerde, oksidasyon reaksiyonları yalnızca vitamin ve tat kaybına neden olmazlar, aynı zamanda serbest radikaller gibi oksitleyen ürünler oluşturmaktadırlar ve bu

radikaller istenmeyen kimyasal reaksiyonları başlatmaktadırlar. Bu otooksidasyon reaksiyonlarını önlemek için veya bunlardan kaçınmak için, antioksidanlar 50 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Vücudun, ürettiği serbest radikallere (oksidanlara) karşı savunma mekanizması olarak görev yapan bir enzim sistemi vardır ve bu enzimlerin etkinliğini antioksidan maddeler sağlamaktadır [Cuvelier, 1996].

Tüketicilerin son yıllarda doğal ürünlere ilgisinin artmasıyla birlikte, doğal antioksidanlara olan talep artmıştır. BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol) gibi bilinen sentetik antioksidanlar toksik etkileri nedeniyle, yerini doğal antioksidanlara bırakmıştır [Cuvelier, 1996; Durling ve ark., 2007].

Doğal antioksidanlar elde edilmeleri sırasında fiziksel ve kimyasal olarak zarar görerek bozunmaya uğrayabilirler. Bu nedenle, yapısını bozmadan ve aktivitesini düşürmeden en iyi şekilde doğal antioksidanların elde edilebileceği proses koşullarının uygulanması gerekmektedir.

Adaçayı için kullanılan üç ana ekstraksiyon prosesi vardır: Su buharı ekstraksiyonu, organik çözücü ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan ekstraksiyonudur. Su buharı ekstraksiyonu ve çözücü ekstraksiyonunun, ısıya duyarlı bileşenleri bozma, suya duyarlı bileşenlerin hidroliz olması ve çözücü kirliliği gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca, bu teknikte düşük buharlaşma basıncına sahip bileşenler tam olarak ekstrakte edilemeyebilmektedir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu adaçayı yapısında doğal olarak bulunan bileşenlerin ekstraksiyonu için alternatif bir metot olmuştur. Bu ekstraksiyonun, düşük sıcaklıkta çalıştırılabilmesi, kullanılan karbon dioksit gazının ürünü kirletmemesi ve bozunma reaksiyonunun oluşmaması gibi avantajları vardır [Reverchon, 1995].

Bu çalışma, Türkiye’de doğal olarak yetişen adaçayı bitkisinin antioksidan etkisini görebilmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, adaçayı yaprakları süperkritik akışkan ekstraksiyon cihazı ile, çözücü olarak karbon dioksit ve yardımcı çözücü olarak su kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon, farklı basınç değerlerinde ve

antioksidanların bozunmasını önlemek amacıyla düşük sıcaklıkta yapılmıştır. Her basınç değeri için ekstraksiyon verimi hesaplanmış ve verimin basınçla değişimi incelenmiştir. Soksile ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak adaçayı ekstraktı elde edilmiş ve ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile soksile ekstraksiyonu yöntemlerinin verimleri karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen adaçayı ekstraktlarının antioksidan etkisi HPLC cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Adaçayı



Resim 2.1. Adaçayının (*Salvia Officinalis*) görünümü [Wikipedia, 2007]

2.1.1. Adaçayının tarihçesi

Adaçayı çok eski çağlardan beri ünlü bir şifalı bitki olarak bilinmektedir. Adaçayı, ilaç bitkisi olarak kullanılan bitkilerin arasında en uzun tarihe sahip olan bitkilerden birisidir. İlk olarak Romalılar tarafından kutsal bitki anlamına gelen, *herba secura* adı verilerek hastalıkların tedavisindeki etkin özelliği vurgulanmıştır. Rönesans döneminde aromatik bitkiler, ilaç hammaddesi olarak kullanılmıştır. Farmakolojik özelliklerini aydınlatmak amacı ile adaçayından elde edilen esansiyel yağın analizi yapılmış ve epidemik hastalıklara karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılmıştır. 19. yüzyılın başında farklı yapıdaki yağlar ilk kez tanımlanmış ve bu yağlara özel isimler verilmiştir. 1907 yılında İngiliz İlaç Konferansında botanik türlerin adları resmi olarak açıklanmıştır [Lawless, 1995].

Bu bitkinin çiçekleri, gargara ve adaçayı sirkesi yapmak için toplanır (bir avuç çiçek, doğal sirkenin içinde bir süre bekletilir) ve elde edilen sirke, uzunca bir süre hasta

yatağından kalkamayan kişilere rahatlatıcı ve canlandırıcı olarak sürülebilir. Yapraklar daha çiçeklenme başlamadan, mayıs ve haziran aylarında, bitkide kuru ve güneşli günler boyunca eterli yağlar oluşturduktan sonra, öğlen güneşinde toplanır ve gölgede kurutulur.

2.1.2. Adaçayının yapısı ve yetiştirme koşulları

Türk Standartları Enstitüsüne göre adaçayının tanımı: Labiateae (Ballıbabagiller) familyasına mensup *Salvia officinalis* türüne giren çok yıllık bitkilerin kısa parçalar halinde kesilmiş ve tekniğine uygun olarak kurutulmuş, sapları ile birlikte grimsi-yeşil yapraklar olarak yapılmaktadır.

Adaçayı, diş otu veya meryemiye olarak da bilinmektedir. Salvia'lar; tek ya da çok yıllık otlar veya küçük çalılar yapısında olan, gövdeleri dik ve yükseltici, dört köşe, pilos ya da tomentos tüylü, nadiren tüysüz, salgı bezli ya da salgı bezine sahip olmayan, yapraklar basit ya da parçalıdır [Davis, 1998].

Adaçayı 30-70 cm boyundadır ve bitkinin menekşe renkli çiçekleri halka dizilişlidir. Karşılıklı olan beyaz keçeli yaprakları gümüş gibi parıldar ve acımtrak, ıtırılı bir koku yayarlar [Büyükkaya, 2002].

Adaçayı Balkanlar' da ve Akdeniz' de doğal olarak yetişmektedir. Ülkemizde *Salvia* cinsine ait 89 tür bulunmaktadır. Bunların yarısı endemik, yani dünya üzerinde sadece bölgemizde yetişmektedir. Adaçayı çeşitleri Akdeniz Havzasında ve Anadolu' da çok eskiden beri baharat olarak kullanılmaktadır. Güzel renkleri ve kokusu nedeniyle oldukça tercih edilen bir bitkidir. Kurak alanlar ve taşlı bölgelerde, kireçtaşı alanları ve çok az toprağa sahip kayalıklarda yetişebildiği görülmüştür. Bitki, güneşi iyi alan ve iyi drene olan kumlu topraklara ihtiyaç duyar. Adaçayı, genelde sıcaklığı seven bir yapı göstermektedir. İlkbaharda biraz yağış alan ve rüzgardan korunan yerlerde, ılıman iklim bölgelerinde kolaylıkla yetiştiği görülmektedir. Uygun gelişme koşullarının sağlanması durumunda bitkilerden yüksek randımanlı, iyi kalitede yağ elde edilir. Alüvyonlu

topraklarda yetişen adaçayı bitkisi daha az çiçeklidir ve yağ verimi kıyasla daha düşüktür [Büyükkaya, 2002].

Adaçayı eterli uçucu yağlar, tujon, sineol, linalol, borneol, salven, pinen ve kafur, tanenler, triterpenoitler, flavonlar, östojen benzeri maddeler, reçineli bileşikler içermektedir. Bileşimindeki uçucu yağlarda triterpenler ve flavonlar yer almaktadır [Lawless, 1995; Perry, 1996; Guillen ve ark., 1996].

Verim, iklim ve hava koşullarına, toprak bileşimine, bitkinin kuruluk derecesine, odunsu kısımların yaprak ve çiçekli uçların oranlarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Hasat edilecek dönemde, çiçeklenme evresinin başında uçucu yağ miktarının en yüksek düzeye ulaştığı, sonradan tohumların oluştuğu çağa doğru süratle azaldığı söylenmektedir. Bu aşamada yağ randımanı % 0,12-0,15 seviyesindedir [Büyükkaya, 2002].

Sap ve yaprakların distilasyonu çok daha az esans yağı vermesinin yanında, özel bir koku içermektedir. Yalnız yaprakların distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın esterler bakımından daha zengin olduğu görülmüştür. Çiçekli uç kısımların yağ randımanı % 1.09, tüm bitkinin ise % 0.74 olduğu görülmüştür. Uçucu yağın kokusu baskın bir koku değildir [Büyükkaya, 2002].

Adaçayı bitkisinde yaygın olarak rastlanan bileşenler hakkında genel bilgi aşağıda verilmektedir:

Uçucu yağlar

Uçucu yağlar bitkilerden ya da bitkisel droglardan, su veya su buharı damıtması ile elde edilebilen, oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden ve genellikle güzel kokulu olduklarından *uçucu yağ*, *eterik yağ*, *esans* gibi isimlerle anılırlar [Büyükkaya, 2002].

Uçucu yağlar, yağı taşıyan bitki kısımlarından genellikle damıtma yoluyla elde edilmektedirler. Farklı damıtma türleri uygulanabilmektedir. Uçucu yağlar bitkinin yaprak, çiçek, kök, rizom ve odununda daha çok, sap kabuklarında ise nadiren bulunurlar. Bitkilerde genellikle % 1-2 oranında, hatta bazen daha az miktarlarda bulunurlar [Büyükkaya, 2002].

Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, genellikle elde edildiklerinde renksizdirler. Fakat uzun süre beklemekle oksitlenebilir, reçineleşebilir ve renkleri koyulaşabilir. Uçucu yağların pek çoğu renksiz olduğu halde kırmızı (tarçın ve karanfil yağı) ve mavi (papatya yağı) renkli olanları da bulunmaktadır [Büyükkaya, 2002].

Uçucu yağlar oldukça fazla sayıda bileşiğin karışımından oluştuklarından dolayı kimyasal bileşimleri bakımından büyük ayrıcalıklar gösterdikleri halde, fiziksel özellikleri açısından ortak yönleri çoktur. Genellikle sıvıdırlar, kendine özgü kuvvetli ve hoş kokuları vardır, acı ve baharlı lezzetlidirler, kırılma indisleri yüksektir ve optikçe aktifler [Büyükkaya, 2002].

Sabit yağlar

Farmakognozi yönünden, droglarda bulunan lipitlerin en önemli olanları sabit yağlardır. Sabit yağlar karışımında başlıca gliseritlerden başka, serbest yağ asitleri ile sabunlaşmayan kısımlar bulunmaktadır. Sabunlaşmayan kısımlar, steroller ile A, D, E vitaminleri gibi yağda çözünen vitaminlerden başka, az miktarda uçucu yağ, reçine, hidrokarbon ve acı madde ihtiva eder. Sabit yağlardaki gliseritler genellikle trigliseritlerdir. Bitkisel yağları elde etmek için uygulanan yöntem ufak farklılıklarla beraber bütün droglar için aynıdır. Bitkilerin hemen her organında yağ bulunmakla beraber, genellikle tohumlar sabit yağ bakımından zengindir [Büyükkaya, 2002].

Terpenler

Terpenler, beş karbonlu izopren moleküllerinden oluşmuştur. İzopren moleküllerinin birbiriyle baş ve kuyruk konumundan bağlanması ile mono, seski, di, sester, tri, tetra ve politerpenler meydana gelir. Terpenler alifatik ve alisiklik yapıda olabilirler. Hidrokarbonlu terpenlerin yanı sıra oksijen molekülü içeren yani alkol, keton, eter, aldehit, karbonik asit, oksit gibi fonksiyonel gruplu terpenler de doğal olarak bulunmaktadır. Terpenoidler, bitkiler ve hayvanlarda bulunan doğal bileşiklerin en önemli ve en geniş sınıflarından birisidir. Bitkilerde serbest halde bulunabildikleri gibi, glikozitleri, organik asit esterleri ve bir kısmı da proteinlerle birlikte bulunabilmektedir [Büyükkaya, 2002].

Monoterpenler ve seskiterpenler gibi çok küçük molekülü terpenoidler su buharı damıtması ile, daha büyük molekülü terpenoidler ise ekstraksiyon yöntemleri ile ayrılabilirler [Büyükkaya, 2002].

Diterpenler

Diterpenler, doğal ürünler içerisinde yaygın olarak bulunmaktadırlar. Doğal ürünler içerisinde en geniş farmakolojik etkiye sahip olan diterpenlerin araştırılmasına çok eski yıllarda başlanmasına rağmen kromatografik ve spektroskopik yöntemlerin yetersizliği nedeniyle yapılarının aydınlatılması zor olmuştur. Son yıllarda kromatografik yöntemlerin gelişmesiyle diterpenlerin ayrılması ve saflaştırılması, modern spektroskopik tekniklerin gelişmesiyle de yapılarının aydınlatılması daha kolay ve hızlı olmuştur [Büyükkaya, 2002].

Diterpenler, steroidlerden ve triterpenlerden daha kolay oksitlenir. Bu nedenle diterpenlerdeki kimyasal reaksiyonlarda farklılıklar gözlenmektedir. Köprülü halka sistemlerinde Wagner-Meerwein düzenlenmesi ile karbokasyon oluşmaktadır [Büyükkaya, 2002].

Triterpenler

Triterpenler altı izopren biriminden oluşmuş 30 karbonlu iskelete sahip yapılardır. Triterpenler, bitkilerde serbest veya bağlı olarak bulunmaktadırlar. Serbest triterpenler, asit, alkol, aldehit, keton, epoksit ve lakton fonksiyonel gruplarından birini veya birkaçını bir arada taşıyabilirler veya hiç süstitüent taşımazlar [Ulubelen ve ark., 1981].

Triterpenik asitlerin metil esterleri, asetatları gibi esterler ve glikozit halindeki triterpenler, bağlı triterpenlerin başlıcalarını oluştururlar. Ayrıca triterpenoid polimerleri veya reçineleri, triterpenik asitlerin şekerlerle yaptığı esterler ve metoksi grubu taşıyan triterpenler de bağlı triterpenler grubuna dahildirler [Ulubelen ve ark., 1981].

Fenolik maddeler

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar . Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşiklerdir. En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri, oksidasyondan korudukları bilinmektedir [Gökalp, 2006].

Flavonoidler

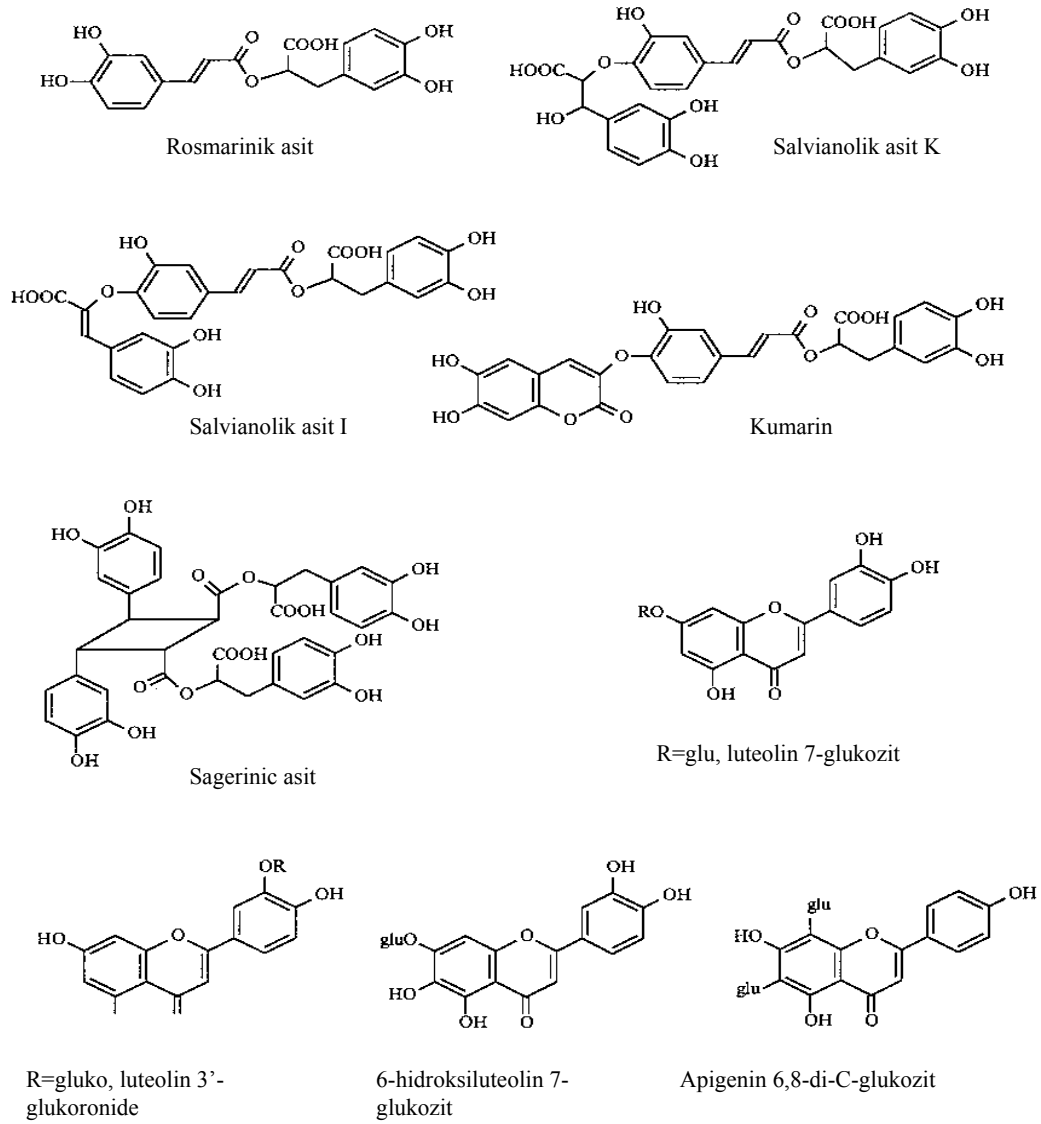
Genellikle sarı renkli olmaları nedeniyle, Latince *sarı* anlamına gelen *flavus* sözcüğünden türetilerek flavonoid adını alan bileşiklerdir. Kimyasal bakımdan 15 karbon atomlu 2-fenil benzopiron yapısı gösterirler [Büyükkaya, 2002].

Bu tür ya da benzer yapıya sahip olan bileşikler ister doğal olarak, ister sentezle elde edilmiş olsun, renklerine bakılmaksızın flavonoid bileşiklerinin sayıca çok artması sebebiyle, iskeletlerindeki farklılıklara göre sınıflandırılmışlardır [Büyükkaya, 2002].

Flavonoidler, yosunların büyük kısmı ile bakteriler hariç, hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunmaktadırlar. Flavonoidler, doğada aglikonları ya da glikozitleri halinde, bitkilerin kök, sap, çiçek, polen, meyve ve tohum gibi hemen her bölümünde bulunabilirler [Büyükkaya, 2002].

Adaçayı aydınlatılmış bileşenleri, fenolik bileşenlerin üç sınıfı şeklinde gruplandırılabilir: Fenolik asitler (kaffeik asit ve rosmarinik asit), flavonoidler (apigenin), fenolik diterpenler (karnosik asit, rosmadial) [Santos-Gomes ve ark., 2002].

Adaçayında bulunan başlıca fenolik maddelerin yapısı aşağıdaki gibidir:



Şekil 2.1. Adaçayında bulunan başlıca fenolik maddelerin kimyasal yapısı
[Lu ve ark., 2001]

2.1.3. Kullanım alanları

Adaçayı bitkisi türleri halk arasında çay olarak sindirim sistemi bozukluklarının tedavisinde ve diüretik olarak kullanılmaktadır. Bazı adaçayı (sideritis) türlerinin romatizma tedavisi ve tansiyon düşürücü amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Nitekim

bazı türlerin antibakteriyel etki gösterdiği, arteriyel kan basıncını düşürdüğü, otonom sinir sistemi üzerinde etkileri olduğu bildirilmiştir. Ayrıca S. Congesta ve S. Arguta' nın antispazmolitik etkilerinin olabileceği açıklanmıştır [Başer ve ark., 1986].

Adaçayı, ilaç bitkisi olarak kullanılan bitkilerin arasında en uzun tarihe sahip olan bitkilerden birisidir. Kanser tedavisinde, tümör oluşumunu engelleyen aktivitesi nedeniyle güçlü bir potansiyele sahiptir [Wang ve ark., 2000]. Adaçayının esansiyel yağı mantar büyümesini inhibe etmektedir ve esansiyel yağ kendisinin kafur bileşimiyle birlikte bulunmaktadır. Aynı zamanda diğer adaçayı bileşenleri de ilaç, böcek sokmalarında antiseptik özelliğe ve mantar önleyici aktivitelere sahiptir [Özdalyan, 1998].

Adaçayı sıkça içildiğinde tüm bedeni güçlendirir, kalp krizi tehlikesini azaltır. Gece terlemelerinde ve aşırı terlemelerde, lavanta çiçeğinin yanı sıra, yardımcı olabilecek bir bitkidir. Gece terlemesine neden olan hastalığı iyileştirir ve bu hastalıkla birlikte görülen aşırı güçsüzlüğe karşı canlandırıcı bir etkisi vardır. Kramplarda, omurilik rahatsızlıklarında, beze hastalıklarında ve organ titrekliliklerinde kullanılmaktadır. Kan temizleyici etkisi vardır. Solunum organlarını ve mideyi balgamsı sıvılardan temizler, iştah açıcıdır. Böcek sokmalarında, sokulan bölgeye adaçayı yaprağının tozu uygulanır. Adaçayı dıştan uygulandığında (çalkalama ve gargara) bademcik iltihabı, boğaz hastalıkları, diş iltihaplanmaları, yutak ve ağız boşluğu iltihaplanmalarında veya ülserlerinde özellikle önerilmektedir. Ayrıca adaçayı, tahriş kaynaklı öksürüklerde de kullanılmaktadır.

Son yapılan çalışmalarda adaçayı bitkisinin alzheimer hastalığının tedavisine katkı sağlayabileceği yönünde bulgulara ulaşılmıştır. Kolinerjik nöronların tahribatı olarak bilinen alzheimer hastalığına karşı adaçayı bitkisinin kolinerjik aktiviteleri düzenleyici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Adaçayında bulunan uçucu yağlar, sindirim üzerinde uyarıcı ve gaz giderici özelliğe sahiptir. İçerdiği etkin bileşiklerle de mide salgılarının arttırılmasına, bağırsak

hareketlerine, safra salgısına, ve pankreas fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Çoğu yemek baharatları gibi adaçayı da sindirim sistemi kasılmalarında kasların gevşemesine yardım ederek, antispazmik bir etki yapar. Bu özellik sindirim sistemi şikayetlerinin azaltılmasındaki geleneksel rolünü gösterir. Avrupa Komisyonu sindirim güçlüğü tedavisinde adaçayının kullanımını onaylamaktadır.

Bunların dışında aromaterapi yoluyla vücuda yapılan masaj sonucu sinirleri düzenleyici, sakinleştirici, rahatlatıcı özelliği nedeni ile banyo yağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca vücut yağları, vücut losyonları, saç şampuanları, kremleri, sabunlar, kolonyalar, deodorantlar, oda spreyleri ve deterjanlarda güzel, rahatlatıcı kokusu nedeni ile tercih edilmektedir [Özdalyan, 1998].

Gıdalarda, bitki aromalı konsantre içeceklerde, meyve sularında, bitkisel yağlarda, alkollü içkilerin bazılarında özellikle varmutta, ayrıca sıcak içeceklerden adaçayı olarak, baharat şeklinde lezzet arttırıcı ve iştah amaçlı olarak kullanılmaktadır [Lawless, 1995].

Bütün bu faydalı özellikleriyle birlikte her uygulamada olduğu gibi adaçayını kullanırken de bazı noktalara dikkat etmek gerekir. İçerdiği yüksek seviyede toksik bir madde olan tujon çarpıntıya neden olabilir. Konsantre adaçayı yağı toksiktir ve içilmemelidir. Adaçayının çözeltisi ve uçucu yağlarının uzun süreli kullanımı epilepsi benzeri titremelere neden olabilir [Özdalyan, 1998].

Çizelge 2.1. Adaçayının Aromaterapi ve İlaçlarda Genel Kullanımı [Lawless, 1995]

| KULLANIM BÖLGESİ | KULLANIM YERİ | KULLANIM AMACI |
|------------------------|--|---|
| Deride Kullanımı | Kesiklerde, beneklerde, böcek ısırıklarında | Antiseptik olarak |
| | Aşırı terlemede, yaraların temizliğinde | Koku giderici olarak |
| Solunum Sistemlerinde | Boğaz iltihabında, üşütmelerde, bademcik iltihabında | Antiseptik olarak |
| Endokrin Sistemlerinde | Menstrual kramplarda | Antispazmotik olarak |
| | Gebelikte, aşırı menstruasyonda | Düzenleyici olarak |
| | Süt akışının artışı durumunda | Hormon düzenleyici olarak |
| | Frijit olma durumunda | Afrodizyak olarak |
| | Huzursuzluk halinde, strese bağlı koşullarda | Hormon düzenleyici, adrenalin, olarak |
| Genel Sistemde | Ateş yükselmelerinde | Ateş düşürücü olarak |
| | Sinir sisteminde genel bozukluk halinde | Sinir dayanımını artırarak düzenleyici olarak |

2.2. Antioksidan Maddeler

Vücudun, ürettiği serbest radikallere (oksidanlara) karşı savunma mekanizması anlamında bir enzim sistemi vardır. Bu enzimlerin etkinliğini artıran maddelere *antioksidan* denir ve antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi, gıdalarla da alınan bir grup kimyasal maddedir. Çaydaki polifenoller, soya ve turuncgillerdeki flavonoidler, kakaodaki siyanidin, kanserden koruyucu etkisi olan ve antioksidan etkili maddelere örnektir [Gökalp, 2006].

Organik bileşiklerin yapısında değişikliklere neden olan atmosfer oksijeni, gıdaların raf ömrünün azalmasına neden olmaktadır. Oksidatif bozunmayı önlemek amacıyla veya

geciktirmek için gıda maddelerini bu bozunmadan korumak amacıyla antioksidan maddeler kullanılmaktadır.

UV ışığının etkisi ile, lipidler ile oksijen arasında otooksidasyon adı verilen serbest radikal zincir reaksiyonu oluşmaktadır. Başlangıç reaksiyonunda serbest reaksiyonlar şekillenmektedir ve reaksiyonun ilerleme aşamasında serbest radikaller farklı radikallere dönüşmektedir. Sonuçta, iki radikalın birleşimi ile kararlı ürün ortaya çıkmaktadır. Otooksidasyon reaksiyonları geri dönüşü olmayan reaksiyonlardır. Başlangıç için aktivasyon enerjisi gerekmektedir ve bu enerji de reaksiyonu teşvik eden prooksidan etkenler tarafından sağlanmaktadır [Richheimer ve ark., 1996; Djarmati, 1991].

Antioksidanlar gıdalarda; onları dengelemek, oksitlenmeyi kontrol ederek ürün kalitesini artırmak, tatsızlık gelişimini engellemek ve önemli ölçüde terapik ajan olarak potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılırlar. Gıdaların oksidasyonu sonucu, istenmeyen kahverengi renk, kötü koku, kötü tat (acılık), duyu kalitede ve vitamin miktarında azalmalar gibi sorunlar oluşur [Gökalp, 2006].

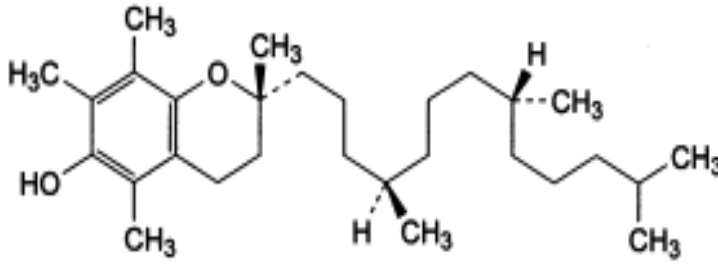
Yiyeceklerde oluşan lipid oksidasyonları, yalnızca vitamin ve tat kaybına neden olmazlar, aynı zamanda serbest radikaller gibi oksitleyen ürünler oluştururlar ve bu radikaller istenmeyen kimyasal reaksiyonları başlatmaktadırlar. Bu oksitlenmeyi önlemek veya bunlardan kaçınmak için, antioksidanlar 50 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır [Cuvelier, 1994].

Antioksidanlar, yiyecek katkı maddesi olarak, oksidatif bozunmaya karşı koruma sağlamak için geniş bir kullanıma sahiptir. Eski zamanlardan beri çeşitli yemeklerde lezzet geliştirmek için kullanılan baharatlar, antioksidan özellikleriyle bilinmektedirler. Çeşitli çalışmalarda, nane familyasından olan adaçayı ve biberiye bitkileri, bilinen türler arasında en fazla antioksidan potansiyeline sahip olanlarıdır. İlk yapılan çalışmalarda, fenolik bileşenler açısından adaçayı ve biberiye benzer özellikler göstermektedir. Antioksidan aktivite özellikleri karnosik asit ve rosmarinik asite bağlanmıştır. Fakat

birçok çalışma bunlara ilave olarak terpenler ve flavonlar içeren aktif bileşenlerin de olduğunu göstermektedir [Lu ve ark., 2001].

Genellikle gıdalarda en fazla kullanılan sentetik antioksidanlar: BHA (Butillenmiş hidroksi anisol), BHT (Butillenmiş hidroksi toluen), PG (Propil gallat) ve TBHQ (Tersiyer butil hidrokinon)' dur. Bu antioksidanlar yağlı kaynaklarda 200 ppm' e kadar toplam miktarda kombinasyon halinde veya tek tek gıdaya eklenir. Gıdada sentetik antioksidanların kullanımı yaklaşık 60 yıl önceye dayanmaktadır. Demir ve bakır gibi metal iyonlarının prooksidan etkileri dikkate alınmalıdır. Böylece EDTA (Etilendiamintetraasetikasit), CA (Sitrik asit) ve polifosfatlar gibi bir kısım asitler veya onların türevleri şelatlama ile metal iyonlarının etkinliğini gidermekte kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda sentetik antioksidanların potansiyel yan etkileri konusunda kuşkular vardır. Bundan dolayı tüketicilerden gelen istek doğrultusunda ve endüstrinin ilgisiyle doğal bileşikler sentetik bileşiklerin yerini almaktadır [Gökalp, 2006].

Doğal antioksidan kaynakları; baharatlar, şifalı bitkiler, çaylar, yağlar, tohumlar, tahıllar, kakao kabuğu, hububatlar, meyveler, sebzeler, enzimler, proteinler olarak sayılabilmektedir. Araştırmacılar flavonoidler, kateşinler, fenoller (karnosol, rosmanol, rosamaridifenol) ve fenolik asit (karnosik asit, rosmarinik asit) gibi çeşitli antioksidanları kapsayan bitki özleri kadar iyi olan, C vitamini tokoferoller ve karotenoitlere de yoğunlaşmaktadırlar. Askorbil palmitat da doğal antioksidanlar arasında sayılmaktadır çünkü, vücutta askorbik ve palmitik asitlere hidrolize olmaktadır. Lamiaceae ailesinin şifalı bitkileri arasında en çok çalışılan biberiyedir ve özleri ilk pazarlanan doğal antioksidanlardandır. Aynı aileye ait olan keklikotu (oregano) lipid sistemlerinde kuvvetli antioksidan olarak birçok araştırma gruplarının ilgisini çekmiştir [Gökalp, 2006].



Şekil 2.2. RRR- α – tokoferol' ün kimyasal yapısı

E vitamini ise kimyasal yapı itibarı ile bir tokoferol olup antisterilite vitamin olarak da bilinir. Tokol ve tokotrienol türevlerinin farklı bileşikleri E vitamini aktivitesi gösterir. En aktifi α -tokoferoldür. α – tokoferol' ün kimyasal yapısı şekil 2.2' de görülmektedir. E vitamini, biyolojik bir antioksidan olup, atardamar hastalıklarının ve kanserin önlenmesi için gerekli olan bir antioksidandır.

E vitamini yağda çözünen vitaminlerdendir. Bu yüzden hücre zarında bol miktarda bulunur. E vitamininin etkilerini gösteren 8 tokoferol ve tokotrienol vardır. Oksijensiz ortamda 200 °C' ye kadar dayanır. Organik asitlerden 100 °C' ye kadar müteessir olmazlar. Alkaliler etki eder. Oksidasyonla biyolojik etkisini hızla kaybeder. Acılaşmış yağda E vitamini bulunmaz. Işık ve bilhassa ultraviyole (morötesi) ışıklara karşı dayanıksızdır. Onun için E vitamini ihtiva eden gıdalar güneşe maruz bırakılmamalıdır. E vitamini antioksidan olduğundan yağlara katılarak yağın dayanıklılığı artırılır.

Çizelge 2.2. Bazı doğal antioksidanlar [Gökalp, 2006]

| Kaynak Materyal | Örnek | Antioksidan |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Sebze Yağları | Soya Yağı | Tokoferoller |
| Tropikal Yağlar | Hurma Yağı | Tokoferoller |
| Bitkisel Yağlar | Hurma Yağı | Karotenoitler |
| Şifalı Bitkiler ve Baharatlar | Biberiye ve Adaçayı | Kompleks fenolikler |
| Tahıllar | Buğday ve Karabuğday | Flavonoidler |
| Baklagiller | Soya | İzoflavonlar |
| Çekirdek yağlar | Kanola ve Hardal | Fenolik asit& Fenilpropanoitler |
| Çaylar | Yeşil Çay | Kateşinler ve Polifenoller |
| Meyve Kabukları ve Çekirdekler | Üzüm Çekirdeği ve kabuğu | Polifenoller ve Taninler |

Antioksidan aktivitesi birçok faktöre bağlıdır. Lipid bileşikler, antioksidan konsantrasyonu, sıcaklık, oksijen basıncı ve diğer antioksidanla ve birçok gıdada ortak bulunan bileşikler örneğin proteğin ve suyun bulunması [Gökalp, 2006].

Doğal antioksidanların kapsamlı etkinliği; radikal reaksiyonlardaki fenolik hidrojen, kimyasal tepkimelerdeki yapısal durum ve doğal antioksidanların radikal reaksiyonlardaki kararlılıklarına bağlıdır [Gökalp, 2006].

2.2.1. Antioksidan maddelerin sınıflandırılması

Antioksidanlar genel olarak primer ve sekonder (antioksidan sinerjistleri) antioksidanlar olmak üzere iki şekilde sınıflandırılırlar.

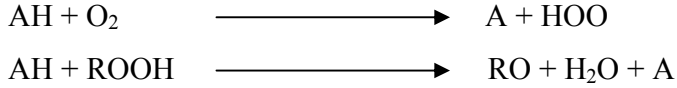
Primer antioksidanlar

Birincil ya da diğer adıyla zincir parçalayan antioksidanlar; lipid radikalleri ile ortamdaki oksijeni kullanarak daha kararlı bir ürün oluşumunu sağlamaktadırlar. Bu bileşenler, fenolik yapıda olup, serbest radikal zincirlerinin lipid oksidasyonunu engellemektedirler. Doğal ve sentetik tokoferoller, alkil galatlar, BHA, BHT, tersiyer bütül hidrokinon bu gruba bağlı olarak fonksiyon göstermektedirler [Rajarho ve ark., 1993; Djarmatı, 1991].

Sağlıklı dokuda oksijen, atmosfere göre daha düşük oranda olduğundan biyolojik dokularda oksijen basıncı önemlidir. Çoğu gıda antioksidanları lipid otooksidanlarını engellemektedirler. Ayrıca fenolik antioksidanlar, indüksiyon periyot süresinin uzamasında etkilidirler. Yağ içerisine katılmaları durumunda, büyük oranda bozunmayı geciktirirler [Cuvelier, 1994].

Otooksidasyon reaksiyonları üzerinde antioksidan konsantrasyonlarının etkisi pek çok faktöre bağlıdır. Bunlar arasında antioksidanların yapısı, oksidasyon koşulları, oksidasyona uğramış yapıdaki değişimler sayılabilir. Fenolik antioksidanların,

antioksidan aktivitesi yüksek konsantrasyonlarda etkinliğini yitirmektedir. Bunlar prooksidant yapı kazanırlar. Bu durum aşağıdaki reaksiyonlarda açıklanmaktadır:



Endo ve arkadaşları, klorofilin karanlıkta antioksidan etkisini bu mekanizma ile açıklamaya çalışmıştır [Endo, 1985].

Sekonder antioksidanlar

Sekonder antioksidanlar diğer adı ile antioksidan sinerjistleri, ortamda primer antioksidanlar bulunmadığı durumda aktivite gösteremezken tersi durumda lipidlerin otooksidasyon reaksiyonunu geciktiren, otooksidasyon zincirinin, serbest radikallerden kararlı türlere dönüşümünü sağlayan bileşikler haline dönüşürler. Bunlar, metal iyonları ile reaksiyon sonucunda etkili hale gelmektedirler. İndirgen ajanlardan askorbik asit, ortamda tokoferollerin ya da diğer fenolik maddelerin bulunması ile sinerjist etki gösterebilmektedir [Özdalyan, 1998].

Şelat yapıcı ajanlar

Bunlar, prooksidan ortamdaki, metal iyonlarını bağlayarak, hidroperoksitlerin bozunması sonucunda radikal olmayan türlerin elde edilmesini içerirler. Gıda lipidleri genellikle iz miktarda metal iyonları içermektedir. İyonlar ortamda enzimler ya da bunların bozunma ürünlerinin bulunması ile artmaktadır. Metal iyonları, rafinasyon ekipmanlarında, metal kaplarda ya da hidrojenasyon süreçlerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Örneğin sitrik asit, amino asit, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) bunlar arasında sayılabilir. Metalik iyonlarla, örneğin bakır ve demir katalitik olaylarda lipid oksidasyonunu hızlandırır. Kelatlar bazen sinerjist etki gösterebilirler. Bunlar genellikle fenolik antioksidanların aktivitesini desteklerler. Ayrıca bunlardan bazıları prooksidan aktiviteye sahiptirler [Rossel, 1983].

Oksijen tutucu ajanlar

UV radyasyonunu absorplayarak ya da tekli oksijeni kullanarak aktivite gösterirler. Bu gruba örnek olarak verilen askorbik asit (vitamin C), askorbil palmitat, izo askorbik asit ve sodyum tuzları yağ içeren gıdalarda stabiliteyi sağlamak amacıyla kullanılırlar. Askorbil palmitatın % 0.01 oranında katılması bitkisel yağlardaki acılığı giderme yönünden BHA ve BHT' den çok daha etkilidir. Oksijen tutucu özellikteki askorbik asitin aktivitesi, şişelenmiş ve kutulanmış ürünlerde etkilidir. Ancak yağlı gıdalarda kullanımı önerilen askorbil palmitat, yağ fazında çözünürlüğü artırıcı etkisi nedeniyle kullanılmaktadır [Cuvelier ve ark., 1992].

Hidroperoksit yıkıcı ajanlar

Dilauril tiyo propiyonik asit hidroperoksitleri dekompoze ederek son üründe kararlılık sağlayan maddelerdir. Ancak bu bileşenlerin, gıdalarda kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından henüz kabul edilmemiştir. Ayrıca ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde yer almamaktadır.

2.2.2. Antioksidan aktivitesinin saptanmasına yönelik metotlar

Doğal ve sentetik antioksidanların aktivitesinin belirlenmesi amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında kullanım alanı en geniş olan yöntem, yağlar ve yağlı maddeler için oksidasyona karşı stabilitenin saptanması yöntemidir [Rossel, 1983].

Stabilite, bitkisel ve hayvansal yağlarda, yağlı ürünlerde, depolama ve kullanım süresince taze tat ve kokunun kalıcılığını koruma kapasitesidir. Doğal yapı ve sistem üzerindeki stres, ortamda prooksidan ya da antioksidan maddelerin bulunup bulunmaması ve ambalajlama yöntemi, stabilite düzeyi ile doğrudan ilişkilidir. Hayvansal yağlarda doymamış yağ asidi içeriği düşüktür. Dolayısıyla, kararsız yapı oluşumu kendiliğinden ortaya çıkar. Gıda maddelerinin üretiminde hayvansal yağ kullanımı sonucunda aynı kararsızlık ürüne doğal olarak yansımaktadır. Bitkisel

yağlarda ise durum farklıdır. Doymamış yağ asitleri miktarının yüksek olması nedeni ile oksidasyona karşı gösterilen direnç hayvansal yağlara oranla çok daha yüksektir. Ayrıca bitkisel yağların yapısında doğal olarak bulunan antioksidanlar nedeniyle daha kararlı yapı görülmektedir. Örneğin zeytinyağında doğal antioksidanlardan tokoferolün bulunması, dayanım süresine olumlu etki edebilmektedir [Özdalyan, 1998].

Yapılan araştırmalar sonucunda stabilitenin belirlenmesi amacıyla birçok test yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden bazıları, örneklerin belirli bir sıcaklıkta oksijenli ya da oksijensiz ortamlarda bekletilmesi, uygun hesaplama yöntemlerinin kullanılması ya da son yıllarda geçerliliği gittikçe artma eğilimi gösteren termal analiz metodlarıdır [Harwalkar, 1990].

Yağda mevcut bozunmanın düzeyini belirlemek amacıyla yapılan testler arasında, peroksit indeksi, tiyobarbitirik asit testi ve kreis testi sayılabilir [Rajarho ve ark., 1993]. İleriye yönelik raf ömrünü saptamak için kullanılan yöntemler aşağıda özetlenmiştir [Cuvelier ve ark., 1990].

Aktif oksijen metodu

Aktif oksijen metodu, kontrollü akış hızında hava kabarcıklarının, 100 °C' deki yağ tüpleri içerisine nüfuz ettirilmesi şeklinde tanımlanabilir. Periyodik olarak üflenen havanın neden olduğu acılaşıma ölçülür. Peroksit gelişimi ile ilk tipik ransit kokunun oluşumu arasında ilişki vardır. Yağdaki ransidite peroksit değeri 20 dolayında iken saptanabilmektedir. Bu değer hidrojene olmuş yağlar için 70 iken, bitkisel yağlarda örneğin pamukyağı ve soya yağında 100' e yakındır. Saatler süren çalışmalar sonunda peroksit değerinin bitiş noktası kaydedilir. Bu metod yaygın olarak bitkisel ve hayvansal yağlarda başlangıç stabilite değerinin antioksidan katılarak ya da katılmadan hesaplanmasında kullanılır. Ancak aktif oksijen metodu değerleri arasındaki korelasyon yağların ya da gıdaların normal depolama koşullarında tutulması sonucu tutarsızlık gösterebilmektedir [Cuvelier, 1996].

Yapılan çalışmalara dayanarak uçucu antioksidanların (BHA, BHT) belirli bir sıcaklıkta test edildiği zaman, aktif oksijen ve ransimat metodu kullanılması onerilmektedir. nk sürekli hava akışı ve havanın yağ içerisine girişi bu tip yöntemlerde uçucu potansiyeli olan antioksidan ve prooksidant bileşenlerin distilasyonuna neden olabilmektedir [zdalyan, 1998].

Fırın stabilite metodu

Fırın stabilite metodu, sıklıkla *Schaal fırın testi* olarak tanımlanır. Yağlar ya da gıdalar temiz cam şişeler içerisinde 65 °C fırın sıcaklığında tutulur. Örnekler belirli aralıklarla duyuşal olarak kontrol edilir. Genellikle bu işlem günler almaktadır. Sonradan acılaşmanın başladığı nokta hesaplanır. Bitkisel ve hayvansal yağlarda bu anda peroksit testi de yapılabilmektedir.

Oksijen bomba testi

Oksijen bomba testi, örneklerin bomba şeklindeki bir cihaza yerleştirilmesinden sonra sabit miktarda oksijen ayarlanarak, sabit sıcaklıkta deneyin devamı sağlanmaktadır. Oksijen basıncı monitrdn izlenebilir. Oksijen alımı hızlandığı noktada basınçtaki düşüş belirlenir, örneğin stabilitesi ile ilişkilendirilir. Bu metot antioksidanların uzun süreli etkilerinin gözlenmesi gerektiğinde kullanılmaktadır.

Karbonil belirleme testi

Lipidlerin ekstraksiyonu ve karbonil bileşenlerinin ölçümü hayvansal yağlarda ve bazı gıdalarda stabilite göstergesidir. Bağımsız olarak aldehitlerle reaksiyona girebilen bileşenleri içermektedir. Peroksitin yanı sıra doymuş tek veya iki çift bağlı aldehitlerin ölçümü, lipidlerin ve gıdaların, oksidasyona karşı eğilimini açıklamaktadır [Tsuda ve ark., 1995].

Malonaldehit miktarı tayini, lipid peroksidasyon ürünü olan, tiyobarbütirik asit reaksiyonu ile elde edilen tiyobarbütirik asit reaktif maddelerinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır [Rajarho ve ark., 1993]. Malonaldehitin, tiyobarbütirik asitle reaksiyonu sonucunda karakteristik pembe renk elde edilmektedir. Malonaldehit et ve balık gibi bazı yiyeceklerde ortaya çıkmaktadır ve acılaşıma, ransit koku oluşumuna neden olmaktadır. Malonaldehitin aynı zamanda, serbest amino grupları ile enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarına girmesi bu yöntemde hatalara neden olabilmektedir [Maillard ve ark., 1996].

Ransimat yöntemi

Ransimat yöntemi, yağlarda stabilitenin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Cihazın çalışma prensibi, iletkenlikteki değişimin belirlenmesi sonucunda elde edilen derecelerin, sıcaklığa karşı logaritma raf ömrü sonu grafiğinde gösterilerek yorumlanması esasına dayanmaktadır [Özdalyan, 1998].

2.3. Süperkritik Ekstraksiyon Yöntemi

Bir maddenin kritik noktası ilk kez Baron Cagniardde'la Tour tarafından 1822'de gözlenmiştir. 1879'da Hannay ve Hogart metal halojenürler gibi katı maddelerin süperkritik metanol ve karbon tetraklorürde çözüldüğünü rapor etmişlerdir. Francis 1954' de yayımladığı bir makalede 261 tane farklı bileşenin süperkritik CO₂ ile çözüldüğünü belirtmiştir. 1980' lerden sonra süperkritik sıvılar analitik kimya uygulamalarında büyük gelişme göstererek hızla pek çok endüstriyel alanda yer almaya başlamıştır. Çevre Koruma Ajansı (EPA), Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) süperkritik akışkan ekstraksiyon metotunun gelişimi için çaba göstermektedir [Yoshida ve ark., 2000].

Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve türevleri şeklindeki organik bileşikler gıda, kozmetik, tarım ve diğer pek çok endüstri alanında önemli miktarda kullanılmaktadır. Bitkilerin kendisi, yaprakları, tohumları veya meyvalarından çoğunlukla uygun

çözücüler eşliğinde organik yağların alındığı geleneksel ekstraksiyon metotlarının (sıvı-sıvı\katı-sıvı) pek çok olumsuzlukları bilinmektedir. Bitkilerin yapısında bulunan uçucu yağlar, bitki maddelerinden bazı ekstraksiyon metotları ile alınmaktadır. Bu amaç için sıkça kullanılan metotlardan biri su buharı ekstraksiyonudur. Bu klasik metotta duyarlı bitki maddeleri nispeten yüksek sıcaklıkla karşı karşıyadırlar ve bu durum ısıya duyarlı bileşenlerden oluşan uçucu yağların bozunmasına neden olmaktadır. Diğer bir yöntem olan, geleneksel çözücü ekstraksiyon metodunda (katı-sıvı ekstraksiyon), sıvı çözücülerin kullanımı son uçucu yağ ürününden, bunların tekrar uzaklaştırılması problemlerine yol açmaktadır [Özer ve ark., 1996].

Su buharı ekstraksiyonu ve çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemlerin, suya duyarlı bileşenlerin hidroliz olması, çözücü kirliliğinin oluşması gibi dezavantajları vardır. Bu yöntemle, düşük buharlaşma basıncına sahip bileşenler tam olarak ekstrakte edilemeyebilmektedir. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonları doğal esansiyel yağların ekstraksiyonu için alternatif bir yöntem olmuştur [Reverchon, 1995].

Süperkritik sıvılarla ekstraksiyon, gazların, yüksek basınç altında sıvı hale dönüşümü veya süperkritik bölgede sıkıştırılması sonucu, çözgen özelliği kazanmasından yararlanılarak, birçok maddenin taşıyıcı materyallerden bileşenlerine ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu yöntemiyle doğal ürünlerin ekstraksiyonu, ilaç endüstrisinde olduğu gibi yiyecek ve parfümeri endüstrisinde de tat ve koku bileşenleri açısından dikkat çekmeye başladı . Su buharı ekstraksiyonu veya kloroform, hekzan gibi organik çözücülerle ekstraksiyon gibi yöntemlerin uygulanması sonucunda elde edilen üründe toksik kalıntı olması problemini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca düşük sıcaklıkta çalışma imkanı vererek ısıya duyarlı bileşenlerin zarar görmesini engellemektedir [Menaker ve ark., 2004].

Son yıllarda süperkritik akışkan tekniği ile bitkisel yağların ekstraksiyonu konusunda araştırma ve teknoloji geliştirme çabalarının yoğunlaştığı gözlenmiştir [Lang ve ark., 2001]. Bu yöntemin özellikle yüksek kütle transferi, yüksek çözünürlük ve inert gaz kullanımı (CO₂ ve Ar gibi) ile yüksek saflıkta ürün eldesine izin vermesi gibi pek çok

avantajları araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Araştırmaların çoğu, CO₂ akışkanıyla yapılan süperkritik ekstraksiyon tekniği ile ürün kalitesi ve saflığının önemli oranda artırılabilceğini göstermiştir [Özer ve ark., 1996; Lang ve ark., 2001; Reverchon, 1995].

Süperkritik ekstraksiyonda kullanılan CO₂, organik çözücülerin aksine, toksik değildir ve çevre kirliliği yaratmaz, ayrıca pahalı bir madde değildir. Organik çözücü ile ekstraksiyonda olduğu gibi, sıvı veya süperkritik karbon dioksit ile ekstraksiyonda da verim, CO₂ miktarına ve CO₂' in bitkiyle temas süresine bağlıdır [Mangold ve ark., 1980].

Süperkritik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen verim, ekstraksiyon süresi boyunca basınç ve sıcaklığa bağlı olduğu kadar ekstrakte edilecek bitkinin boyut ve şekline de bağlıdır. Elde edilen yağlar, renk, tat ve lezzet özellikleri açasından basınç ve sıcaklığa bağlı olarak farklılıklar göstermektedir [Mangold ve ark., 1980].

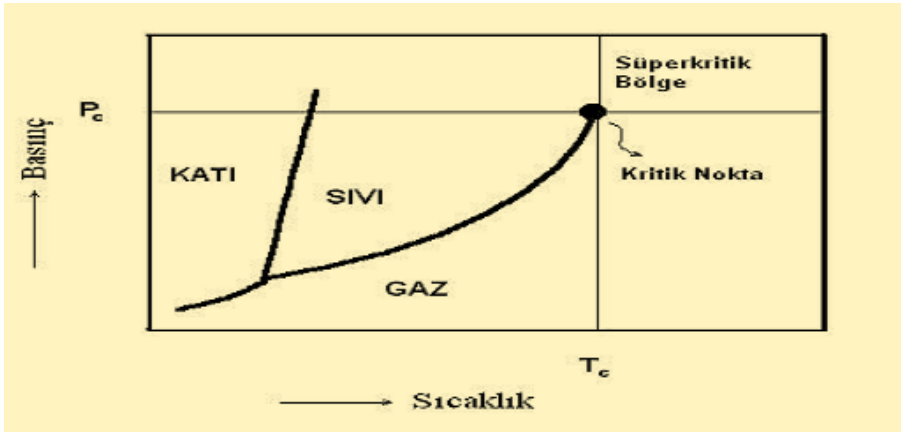
Süperkritik ekstraksiyon doğal esansiyel yağın bileşenlerinin eldesi için alternatif bir yöntemdir. Fakat çözücü, bileşenlerin diğer gruplarını da çözmektedir. Reverchon ve ark., adaçayı yaprağından oksijenli monoterpenin maksimum ekstraksiyonu için süperkritik karbon dioksit yönteminde optimum sıcaklığı 50 °C ve optimum basıncı 9 MPa olarak açıklamaktadırlar [Aleksovski ve Sovova, 2006].

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu distilasyon, soksile, sıvı ekstraksiyon ve sıvı kromatografisi gibi diğer metotlarla başarılabilen üstünlükleri sağlayan bir metottur. Bu metot da çözücü tüketimi ve basamak sayısı azalmakta, analiz süresi kısalmaktadır. Çözücü tüketiminin azaltılması sadece yüksek fiyatlardan kaçınmak açasından değil, çevreye verilme problemi bakımından da önemlidir. Süperkritik akışkanların önemli bir özelliği çözme gücünün, yoğunluktaki değişmeler ile kontrol edilebilmesidir. Farklı polarite ve moleköl boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanımı ile ekstrakte edilebilmektedir. Ayrıca, moleküllerin difüzyon katsayıları bir sıvı ortamındakinden daha fazla olduğundan süperkritik akışkan hızı yüksektir. Bu metot kolaylıkla

otomatikleştirilebilmekte ve kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle birleştirilebilmektedir [Yoshida ve ark., 2000].

2.3.1. Süperkritik akışkanın tanımı

Saf bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında (Şekil 2.2), gaz-sıvı denge eğrisinde ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken, basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık *akışkan* olarak adlandırılır ve bu bölge süperkritik bölgedir. Böylece, maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_c), basıncı ise kritik basıncının (P_c) üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan *süperkritik akışkan* olarak tanımlanır [Froning ve ark., 1990].



Şekil 2.3. Saf bir madde için sıcaklık-basınç faz diyagramı

İlk kez 1879 'da Royal Society seminerlerinde (Londra) Hannay ve Hogart tarafından, bir katının yüksek basınçtaki gazda çözüldüğü, basınç düşürülünce katının çöktüğü açıklanmıştır. Bir kaç yıl sonra Eduard Buchner (1907' de biyokimya alanında Nobel ödülü almıştır), uzun süren bir çalışmanın ardından bir model bileşik olarak, naftalinin süperkritik karbon dioksit içindeki çözünürlüğünü ölçmüştür [Froning ve ark., 1990].

Süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri, sıvılarla gazların özellikleri arasındadır. Bu özellik süperkritik akışkanların daha etkin bir çözücü olmasını sağlamaktadır. Amaca uygun olarak kritik basınç ve sıcaklığın üzerinde koşulların belirlenmesi sonucunda, ekstraksiyon işlemi dakikalarla ölçülen kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir [King, 1989].

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun etkinliği, çözücüye uygulanan basınca, sıcaklığa ve çözücünün yoğunluğuna bağlıdır. Çözünürlük özelliğindeki değişimler kritik basınca yaklaştıkça seçicilik göstermektedir. Bu durum ekstrakte edilmek istenen maddenin molekül ağırlığı ile de ilişkilidir. Yüksek yoğunlukta normalde gaz fazında çok az çözünen maddeler daha fazla çözünür hale geçmektedir [Vega ve ark., 1996].

Çizelge 2.3' de sıvı, gaz ve süperkritik akışkanların çeşitli fizikokimyasal özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.3. Akışkanların fizikokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

| Özellik | Sıvı | Süperkritik Akışkan | Gaz |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| Yoğunluk (kg.m ⁻³) | 600-1600 | 200-1000 | 1 |
| Viskozite (kg.(m.s) ⁻¹) | 1.0x10 ⁻³ | 1.0x10 ⁻⁴ | 1.0x10 ⁻⁵ |
| Yayınlılık (m ² .s ⁻¹) | 1.0x10 ⁻⁹ | 1.0x10 ⁻⁷ | 1.0x10 ⁻⁴ |

2.3.2. Süperkritik akışkan seçimi

Gıda ve ilaç endüstrisinde, süperkritik ekstraksiyonda kullanılacak akışkanın seçimi değerli ve ortam koşullarına duyarlı hammaddeler için 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 özellikler göz önünde bulundurulmalıdır. Çizelge 2.4' 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 ekstraksiyonu için uygun çözücü olmadıkları görülmektedir.

Çizelge 2.4. Bazı süperkritik çözücülerin kritik değerleri [Pala ve ark., 1988]

| Madde | Kritik Sıcaklık (K) | Kritik Basınç (MPa) | Kritik Yoğunluk (g/cm ³) |
|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|
| Metan | 190.6 | 4.6 | 0.162 |
| Etilen | 282.4 | 5.03 | 0.218 |
| Kloroflorometan | 302.0 | 3.92 | 0.579 |
| Karbondioksit | 304.2 | 7.38 | 0.468 |
| Etan | 305.4 | 4.88 | 0.203 |
| Propilen | 365.0 | 4.62 | 0.233 |
| Propan | 369.8 | 4.24 | 0.217 |
| Amonyak | 405.6 | 11.3 | 0.235 |
| Dietileter | 467.7 | 3.64 | 0.265 |
| Pentan | 469.6 | 3.37 | 0.237 |
| Aseton | 508.1 | 4.70 | 0.278 |
| Metanol | 512.6 | 8.09 | 0.272 |
| Benzen | 562.1 | 4.89 | 0.302 |
| Toluen | 591.7 | 4.11 | 0.292 |
| Pridin | 620.0 | 5.63 | 0.312 |
| Su | 647.3 | 22.0 | 0.322 |
| Ksenon | 289.7 | 5.84 | 0.113 |

Süperkritik özellik gösteren akışkanlar yüksek yoğunlukları nedeniyle genellikle iyi bir çözgen gücüne sahiptirler. Kritik noktada sıkıştırılabilirlik özellikleri fazladır. Düşük viskoziteleri, yüksek difüzyon katsayıları ile iyi bir penetrasyon eğilimi göstermektedirler. Bu durum süperkritik akışkanlara kütle transferi gerçekleştirebilme özelliği sağlamaktadır [Pitzer, 1995].

Süperkritik bir akışkanın çözme gücü o akışkanın yoğunluğuna bağlıdır. Süperkritik akışkanların yoğunlukları sıvılara, viskozite ve yayınlıkları ise gazlara benzemektedir. Yoğunluğun artması ile süperkritik akışkanların çözme güçleri artmakta ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedirler. Süperkritik akışkanlar yayınlıklarının artması ve

viskozitelerinin azalması ile, katı yapıdaki gözeneklerde gazlar gibi kolayca yayılabilmekte ve çözme güçleri artmaktadır [King ve ark., 1989].

Çözgen özellikleri ile ilgili olarak kritik basıncın yüksek olduğu maddelerin seçiminden kaçınılmalıdır. Yüksek basınca dayanıklı malzemelerin üretimi ileri teknoloji gerektirdiğinden maliyet artmaktadır. Kritik sıcaklığın yüksek olduğu çözücüler kullanıldığında ise gıda sanayi hammaddelerindeki ısıya duyarlı maddeler bozunma eğilimi gösterebilmektedir. Çözücü olarak seçilebilecek amonyak, toksik etkisi yönünden sakıncalı, propan ise yüksek basınçlarda çalışıldığında patlayıcı olması yönünden tehlikelidir [Pekyardımcı, 1991].

Çizelge 2.5' de ise deneysel sistemde çalışılan süperkritik karbon dioksitin özellikleri ve diğer süperkritik akışkanlara tercih edilmesinin sebebi olan avantajları verilmiştir.

Çizelge 2.5. Süperkritik CO₂' in özellikleri [Pala ve ark., 1988]

| Özellikleri | Avantajları |
|-------------------------|---|
| Faz Dengesi | Düşük molekül ağırlıklı hidrokarbon ve oksijenli bileşiklerle kolayca karışabildiği için iyi bir çözücüdür. |
| | Sudaki çözünürlüğü düşüktür. Sulu çözeltilerden organik maddeler kolay ekstrakte edilebilir. |
| | Diğer organik maddelere oranla uçuculuğu yüksektir. Ürünün saf olarak eldesi daha kolaydır. |
| Termodinamik özellikler | Kritik sıcaklığı düşüktür. |
| | Buharlaşma entalpisi küçüktür. Kritik noktada düşük enerjiye gereksinim duyar. |
| Güvenilirlik | Toksik değildir. |
| | Çevre kirliliğine neden olmaz. |
| | Yanıcı değildir. |
| Ekonomi | Korozif özellik göstermez. |
| | Maliyeti düşüktür. |
| Taşıma özellikleri | Saf halde elde edilebilir özelliği vardır. |
| | Viskozitesi düşüktür. |
| | Difüzyon katsayısı yüksektir. |
| | Isı iletimi kolaydır. |

2.3.3. Süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemi

Sistemdeki sıvı akışkan önce bir pompa ile istenilen basınç değerine ayarlanır. Buradan bir ısıtıcıya gönderilen akışkan istenilen sıcaklık değerine ısıtılır. Böylece süperkritik sıcaklık ve basınç değerlerine getirilmiş olan akışkan sıcaklığı sabit tutulan bir ekstraktöre gönderilir. Ekstraktörde bulunan madde ile temas sonucu, süperkritik akışkanda çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basıncı düşürülür. Basıncının düşürülmesi sırasında çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır.

2.3.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun avantajları

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu sahip olduğu avantajlar nedeniyle klasik çözücü ekstraksiyon yöntemlerinin yerini almaktadır. Süperkritik akışkanlar, düşük viskoziteye ve yüksek yayınlığa sahip olmaları nedeniyle gözenekli yapıdaki katı maddelere, sıvılara oranla daha hızlı yayınlabilmektedir. Yüksek yayınlık gözenek içi kütle aktarım dirençlerini azaltmaktadır ve ayrıca, süperkritik akışkanların yüzey gerilimi çok düşük olduğundan, gözenekli katılara daha kolay girebilmektedir. Böylece artan kütle aktarım hızı işletme süresini azaltmakta ve klasik çözücü ekstraksiyon yöntemlerine oranla işlem daha kısa sürede gerçekleşmektedir [King ve ark., 1989].

- Süperkritik akışkanın dolgu kolon ekstraktöre sürekli olarak beslenmesi, ekstraksiyon işlemlerinde yürütücü kuvvetin artmasına neden olur, bu da kütle aktarım hızını artırır.
- Süperkritik akışkanların çözme güçleri sıcaklık ya da basınç değerlerindeki küçük değişimler ile büyük ölçüde değişmektedir. Bu özellik ürün seçimini ve verimliliğini etkilemektedir. Ayarlanabilir çözme gücü süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan kromatografik uygulamaları için önemli bir avantajdır.
- Süperkritik akışkanlar ile ekstraksiyon işlemi sona erdiğinde, basıncın düşürülmesi ile akışkan, çözünen maddeden kolaylıkla ayrılabilir. Bu yöntemde üründe çözücü kalıntısı kalmamakta ve yeni bir saflaştırma işlemine gereksinim duyulmamaktadır.

- Organik çözücü ekstraksiyonu uygulamalarına göre daha az çözücü harcanması ve özellikle süperkritik akışkanlarla gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde CO₂ kullanılması, çevreye daha duyarlı işlemler ortaya koymuştur.
- Isıya duyarlı bileşiklerin ayırma ve saflaştırma süreçleri için süperkritik akışkan ekstraksiyonu en etkin yöntemdir.
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılan akışkanlar inert çözücülerdir. Bu özellikten dolayı süperkritik koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde herhangi bir hidroliz, oksidasyon ya da bozunma tepkimesi gözlenmemektedir.
- Doğal ürünlerin bileşimlerinde, düşük miktarlarda bulunan değerli endüstriyel ürünlerin ayırma işlemlerinde süperkritik akışkan ekstraksiyonu etkin bir süreçtir.
- Sistem doğrudan bir kromatografik analiz cihazına bağlanabilir ve elde edilen ekstraktın analizi çevrimiçi olarak yapılabilir.
- Süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon süreçlerinde kullanılan akışkan ekstraktöre tekrar geri beslenebilir ve çözücü kaybı azaltıldığından ekonomiktir [King ve ark., 1989].

2.3.5. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun dezavantajları

Süperkritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta (>80 atm) gerçekleşmesinden dolayı yüksek yatırım maliyeti ve yüksek enerji gereksinimi gibi dezavantajları vardır. Son derece önemli olduğu halde ihmal edilen diğer bir dezavantajı ise, 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 [Yamagucci ve ark., 1986].

2.3.6. Süperkritik akışkanlar ile ayırma teknolojisinin uygulamaları

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu, sahip olduğu avantajlar nedeniyle özellikle gıda endüstrisinde çok sayıda uygulaması bulunmaktadır. Bu konuda yapılan araştırmaların çoğu, bir tutucuya bağlanmış kimyasal maddelerle gerçekleştirildiğinden, doğal maddelerin katı yapısına genellikle sıkı bağlarla bağlanan çözünen maddenin süperkritik akışkan ekstraksiyonundaki gerçek davranışını tahmin etmek son derece zordur. Bu nedenle doğal maddelerin süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile ilgili daha yoğun araştırmalar yapılmalıdır.

2.3.7. Süperkritik akışkanların kullanım alanları

Süperkritik akışkanların kullanımı çevresel örneklerin hazırlanması, gıda ve tarım, polimerler ve basınç altında çözücü ekstraksiyonu olarak sayılabilir. Doğal materyallerin, özellikle ısıya, ışığa ve oksijene hassas olan ve kalıntı istenmeyen gıda bileşenlerinin ayrıştırılması için süperkritik akışkanların kullanılmasının daha güvenli olduğu birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir. Süperkritik akışkanların gıda endüstrisine uygulamaları ile ilgili çalışmalar son 20 yılda hız kazanmıştır. Süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon konusunda yapılmış yayınların sayısının ve bu alanda alınan patent miktarının 10 kat artması, endüstrinin de ilgisini göstermektedir. Süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon işlemi pek çok alanda uygulanabilir olduğu halde, alınan patentlerin özellikle gıda, ilaç ve kimyasal endüstri alanında yoğunlaştığı gözlenmektedir.

Ekstrakte edilebilir bileşenlerin yüksek basınçta, süperkritik çözücüde çözünürlüğü artmaktadır. Hidrokarbonlar, pestisitler, herbisitler, yağlar, gıda katkıları, tat vericilerin (flavonların) eldesi ve endüstriyel atık analizleri bu yöntemle yapılmaktadır. Burada CO₂ geleneksel yöntemlerde yaygın olarak kullanılan hegzan, benzen, karbontetraklorür, metanol, aseton gibi çözücülerin yerini almaktadır [Rizvi, 1986].

Süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon cihazı ayrıca kromatografik, spektrometrik, radyokimyasal ve gravimetrik çalışmalara yönelik analitik ölçüde örnek hazırlama amacı ile kullanılmaktadır.

Analitik enstrumanlarla, klasik örnek hazırlama tekniklerinde (sıvı-sıvı, sıvı-katı, soksile) zaman kaybı, çözücü sarfiyatının fazlalığı, deney sırasındaki kayıplar, laboratuvar personeli için çözücülerin sağlığa zararlı toksik etkileri gibi olumsuz koşullar söz konusudur.

Süperkritik akışkanlar ile ticari olarak kahveden kafein uzaklaştırılması, şerbetçiotu ekstraksiyonu, süt yağının kolesterolünün azaltılması, sığır etinden kolesterol ve yağ uzaklaştırılması, yumurta sarısından kolesterolün uzaklaştırılması, mısır, soya ve pamuk çekirdeğinden yağ eldesi, balıklardan yağ ekstraksiyonu, tütün atıklarından nikotin ekstraksiyonu ve alglerden β -karotenin ekstraksiyonu gibi birçok konuda çalışma yapılmıştır.

2.3.8. Ekstraksiyon verimini arttırıcı parametreler

Süperkritik sıvılarla yapılan ekstraksiyon işleminde verimin yüksek olabilmesi için yapılan optimizasyon çalışmalarında değişiklik yapılabilecek parametreler çözünürlük, difüzyon ve örnek matriksi özellikleridir ve bu parametreler birbirleriyle ilişkilidir [Özdalyan, 1998].

Başarılı süperkritik akışkan ekstraksiyonu için örnek matriksinin kullanılan çözücü ile uyumlu olması, süperkritik akışkanlar içerisinde çözünebilmesi gerekir. Çözünürlük, süperkritik akışkan prosesi sırasında kullanılan akışkanın kimyasal yapısı ve yoğunluğu ile doğrudan ilişkilidir. Yoğunluğun yanı sıra basınç da önemlidir. Sabit basınçta sıcaklık artışı, yoğunluğun düşmesine neden olmakta ve bu durum çözünürlüğü doğrudan etkilemektedir [Özdalyan, 1998]. Bu faktör ekstraksiyon işleminin başından itibaren etkilidir. Çözücü olarak sıvı karbon dioksit kullanılıyorsa, karbon dioksit apolar bir madde olduğundan, apolar maddeleri çözme eğilimi gösterir. Bu nedenle düşük ağırlıklı hidrokarbonlar, lipofilik bileşikler (hidrokarbonlar, esterler, eterler) kolayca

ekstrakte edilir. Karbonhidratlar ve aminoasitlerde bulunan hidroksil ve karboksil grupları apolar çözüenlerde çözüenürlüğü azalttığından karbon dioksit ile verimli olarak ekstrakte edilemezler. Matrikse bağılı olarak bazı özel maddeleri çözebilmek için karbon dioksitin yanı sıra kullanılmak üzere seçilen çözücüye *modifier* denir. İkili ya da çoklu akışkanlarla çalışmak gerektiğinde karışımın kritik sıcaklığı, polar ya da polar olmayan yapıda olması gibi özellikler ekstraksiyonun kritik sıcaklık ve basıncını değıştirmektedir. Karbon dioksit, orta süper kritik basınç ve sıcaklıkta hegzan ile aynı çözücü özellik göstermektedir.

İkili karışımlarda, karışımın kritik basıncı saf bileşenlerin kritik basıncından daha yüksek olabilir. Örneğin % 10 metanol ve CO₂ kullanımı sonucu karışımın kritik sıcaklığı 51.60 °C, kritik basınç 1099,47 psi' dir. Saf CO₂ için 31.1 °C, 1070.40 psi olan kritik sıcaklık ve basınç, modifier olarak metanolün kullanımı ile yükselmiştir [Tehrani, 1993].

İkinci parametrede esas olan, kullanılan çözüenin hızlı bir şekilde matriksin gözenekli yapısının içerisine difüzyon yolu ile taşınmasıdır. Difüzyonun etkinliği, difüzyon katsayısı, matriksin şekli ve boyutu ile de ilişkilidir. Hızlı ekstraksiyon için optimum matriks boyutu 1 mm civarında ya da daha küçük olmalıdır [Durling ve ark., 2007]. Süperkritik akışkanlarda düşük vizkozite de yüksek difüzyon anlamı taşımaktadır. Ayrıca difüzyon katsayısının yüksek olması kütle aktarımını kolaylaştırırken, ekstraksiyon verimini de arttırıcı özellik göstermesi yönünden önemlidir [Westwood, 1993].

Üçüncü parametre ise matrikstir. Matriks, analiz edilecek maddenin kimyasal yapısını ve özelliklerini tanımlama anlamında kullanılan bir terimdir. Süperkritik sıvı ekstraksiyonunda matriksin yapısına uygun kritik sıcaklık ve basıncın seçilmesi ile içeriğinde yer alan belirli bileşenler kolaylıkla ekstrakte edilir [Özdalyan, 1998].

Süperkritik akışkanla ekstraksiyon cihazında verim artışı için yapılabilecekler

Verimi arttırmak için aşağıda sayılan değişiklikler yapılabilir :

- CO₂ yoğunluğunun ve çözücü direncinin artırılması gerekirse, basınç değeri artırılabilir.
- Buhar basıncını arttırmak ve karbon dioksitin örnek içerisine tamamen nüfuz etmesini sağlamak için, sıcaklık artırılabilir. Ancak, analiz edilecek maddenin kimyasal yapısının sıcaklığa dayanıklı olması gerekmektedir, tersi durumda yapı bozunabilir.
- Akışkan polaritesinin artırılması için matriks yapısına uygun modifier seçimi yapılarak, modifier konsantrasyonu artırılabilir. Ancak, bu artış deney koşulları içerisinde, kullanılan organik modifier çözgenin çözünürlüğünün maksimum olduğu sınırlarda olmalıdır. Değilse organik çözgen yapıya zarar verebilir.
- Ekstraksiyon süresinin ve kullanılan süperkritik akışkanın hacmi artırılabilir.
- Akışkanın matriks içinde difüzyonunu kolaylaştırmak amacıyla ekstraksiyonu yapılacak madde öğütülebilir.

2.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ve Antioksidan Tayini ile İlgili Literatür Çalışmaları

Antioksidatif aktivite Cuvelier tarafından 1990' da tanımlanan bir yöntemle ölçüldü. Bu yöntemin temeli metil linoleatın bir lipofilik çözelti içinde kaybolmasıdır. Güçlü oksijenlenme şartları altında bu yöntem uygulanmış (110 °C ve 7 ml/dak) ve antioksidatif aktivite, saf oksijen kabarcıklarıyla yoğun oksijenlenen metil linoleatın yarı ömrü referans değer alınarak, metil linoleatın kaybolma miktarının kinetik eğrisinden hesaplanmıştır. Eğrideki nokta değerleri her bir yarım saat sonunda yapılan ölçümle elde edilmiş ve tamamen yok olma süresinin sekiz saatten az sürdüğü bulunmuştur. Antioksidan etkinliği yarı reaksiyon zamanıyla değerlendirilmiştir.

Adaçayı polifenoller (antioksidan aktiviteleri) flavon glikozitleri ve rosmarinik asit türevleri içermektedir. Bu bileşenlerin antioksidan aktiviteleri üç yöntemle ölçülmüştür: DPPH radikal temizleme aktiviteleri, süper oksit anyon radikal temizleme aktiviteleri ve

antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi yöntemleriyle ölçülmüştür. Üç test sisteminde de rosmarinik asit türevleri güçlü antioksidan özellik göstermişlerdir ve Mo(VI)' i Mo(V)' e indirgeyecek ve süper oksit radikallerini temizleyecek kapasitededelerdir [Lu ve ark., 2001].

Chirinos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, iki mashua genotipinin fenolik bileşenlerinin, antosiyanin, flavonların ekstraksiyonu ve antioksidan aktivitesinin tayini geleneksel sıvı-katı ekstraksiyonu metodu kullanılarak optimum şartlar belirlenmiştir. Fenolik bileşenler ve antioksidan aktivitesi çözücü çeşidi, pH seviyesi, çözücü-su oranı ve ekstraksiyon süresinden etkilenmiştir. Genel olarak, toplam fenol miktarı ve antioksidan aktivitesi değerlerinde % 90' lık metanol veya metanol/aseton/su (45/45/10) karışımı % 0,1' lik HCl ile kullanıldığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Aksine, % 0,1' lik HCl ile hazırlanmış % 90' lık metanol çözeltisi antosiyaninlerin ekstraksiyonunda en yüksek seviyeyi yakalamıştır. Aynı zamanda, çözücü karışımı en yüksek seviyede flavonların ekstraksiyonunu sağlamıştır. Mashua genotiplerinden elde edilen saflaştırılmış ekstraktların, toplam fenolik ve antioksidan aktivitesi değerleri, 14.4-18,7 mg gallik asit eşdeğeri/g mashua kuru madde olarak bulunmuştur. Bu çalışmada seçilen çözücülere bağlı olarak, HPLC-DAD fenolik profilleri, her iki mashua genotipinin saflaştırılmış genotipleri için belirlenmiş ve içeriklerindeki farklar gösterilmiştir (280 ve 520 nm' de % toplam alan ile). Her iki mashua genotipinden elde edilen saflaştırılmış ekstraktlar içindeki yüksek miktardaki fenolik maddeler ve antioksidan aktivitesi göstermektedir ki, mashua ekstraktı gelecekte antioksidan kaynağı olarak düşünülebilir [Chirinos ve ark., 2006].

Başer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, petroselinum crispus (maydanoz), anethum graveolens (dereotu), erica sativa (roka)' nın kurutulmuş toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstraktların antioksidan etkileri incelenmiştir. Maydanoz, dereotu ve roka soksile cihazında petrol eteri ile ekstrakte edilerek yağlarından arındırılmış, daha sonra yağları alınmış bitkiler %70 MeOH, %70 MeOH+EtOAc ve 1,2 N HCl (%50 MeOH içinde) + EtOAc kullanılarak ekstrakte edilmişlerdir. Elde edilen her bir ekstraktın antioksidan etkisi *in vitro* olarak incelenmiş, lipit peroksidasyonları ransimat testiyle,

serbest radikal süpürücü etkileri ise DPPH yöntemi ile tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol edilerek kullanılan BHT (Bütillenmiş hidroksi toluol)' nin antioksidan etkileri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca elde edilen fraksiyonların total fenol miktarları Folin-Ciocalteu'nun Fenol Reaksiyonuna göre tayin edilmiş ve fenolik bileşikleri ise Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-DAD sisteminde incelemiştir [Başer ve ark., 2002].

Durling ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 100 mg adaçayı, oda sıcaklığında gece boyunca karanlıkta, 1:1 oranında asetonitril:su çözeltisinin 5 ml'si ile ilk olarak ultra sonikasyon uygulandıktan sonra ekstrakte edilmiştir. Son çözelti polipropilen şırınga ile filtrelenmiştir ve 2ml' lik vialer 250 µL transfer edilmiştir. HPLC analizi için 1:1 oranındaki asetonitril:su çözeltisi ile 1000 µL' ye seyreltilmiştir. Analizler 30 °C' de RP-18 kolonunda yapılmıştır. Solvent solüsyonu A, suyun orto-fosforik asitle pH= 2.5' a getirilerek hazırlanmıştır. Solüsyon B, asetonitrille hazırlanmıştır. A ve B lineer gradientin % 95 olduğu metod kullanılarak karıştırılmıştır. A, 40 dakikanın üzerinde % 55' e düşürülmüş ve sonraki 10 dakikada % 0' a düşürülmüştür. Solvent bu derişimde koyulduğunda, A %95' e yükseltilmiş ve 65 dakikalık analiz boyunca % 95 de kalmıştır (akış hızı 1.0 ml/dakika, enjeksiyon hacminin 10 µL olduğu durumda). 280 nm ' de pikler görülmüştür. Rosmarinik asit ve karnosik asit örnekler içerisinde belirlenmiştir. Her bir örnek için rosmarinik asit miktarı, görünen rosmarinik asit pikinin alanı temel alınarak hesaplanmıştır ve rosmarinik asit standardıyla karşılaştırılmıştır. Karnosik asit eşdeğer içeriği, karnosol, karnosik asit ve metil karnosate piklerinin alanları birleştirilerek hesaplanmıştır ve karnosik asit standardıyla karşılaştırılmıştır [Durling ve ark., 2007].

Santos-Gomes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yüksek oranda adaçayı filizinin çoğalması ve lineer olarak filizlerin büyümesi, 1.5 mg/L benzyladenine ve 0.05 mg/L diklorofenoksiasetik asit eklenmesiyle meydana gelmiştir. Buna rağmen, bu özel üretimin bu koşullar altında, toplam antioksidan fenolikleri düşük orandadır. Kullanılan kinetin konsantrasyonlarındaki değişiklikler, önemli ölçüde filizlerin oluşum oranını ve lineer filiz büyümesini etkilememiştir. Fakat, biyokütle ve antioksidan fenoliklerinin

üretimini etkilemiştir. Filizlerden elde edilen ekstraktlarda 17 tane fenolik antioksidan bileşeni tanımlanmıştır. Karnosik asit ve metil karnosat dışındaki diğer bileşenler ticari standartlar kullanılarak aydınlatılmıştır. Rosmarinik asit ve karnosol bütün antioksidan fenolik ekstraktları içinde en önemlileridir. Kinetinin konsantrasyonunun artışı, birçok fenolik diterpenin ve bir kısım da karnosolün birikimini düşürmüştür [Santos-Gomes ve ark., 2002].

Salvia türleri, dünya çapında geleneksel tıpta oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Kamatou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, birbirine oldukça yakın özellikteki, üç Güney Afrika türü adaçayı, antioksidanları, antimikrobiyal özellikleri ve toksisite profilleri açısından araştırılmıştır. Esansiyel yağlar, antiinflammatör ve antimikrobiyal özellikleri yok etmektedir fakat, zayıf antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermektedir. HPLC analizleri sonucunda, her üç çeşit adaçayı içinde, rosmarinik asitin varolduğu görülmüştür ve aynı zamanda, karnosik asitin ise yalnızca, iki tür (*Salvia repens*, *Salvia stenophylla*) içinde olduğu görülmüştür. GC ve MS analiz sonuçları da göstermektedir ki, yağlar kalitatif ve kantitatif olarak değerlidir. β -caryophyllene büyük miktarda, her üç tip adaçayı içinde bulunmaktadır. Bu üç adaçayı çeşidinin in vitro olarak, farmakolojik aktivitelerinin kanıtlanması sonucu, Güney Afrika' da geleneksel tıpta kullanılması bilimsel olarak da desteklenmiştir [Kamatou ve ark., 2005].

Bitkisel ve hayvansal yağlarda, oksijen absorpsiyonu ve reaksiyonu sonucu ağırlık artışının ölçülmesi stabilite belirlenmesinde kullanılan başka bir metottür. Oksijen ölçümüne yönelik manometrik teknikler vardır. Aynı zamanda absorplanan oksijen miktarının, peroksit değeri, çift bağ konjugasyonu ve karbonil bileşenleri miktarı ile de ilişkilidir. Spektrofotometrik analiz sonucu ise, konjuge çift bağ yapısı ve diğer doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında oluşan değişimleri göstermektedir [Özdalyan, 1998].

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile tamarin tohumundan antioksidan ekstraksiyonu için araştırma yapılmış. Sıcaklık ve basıncın farklı kombinasyonları etanol

yardımcı çözücüsü olduğu ve etanol yardımcı çözücüsü olmadığı durumlar için denenmiştir. Sıcaklık ve basınç yükseldiğinde, ekstrakte edilen antioksidan miktarının da arttığı görülmüştür. Modifiyer olarak etanolun kullanılması ekstraksiyonun verimini arttırmıştır. Etanollu süperkritik karbon dioksit ekstraktı (30 Mpa, 80 °C), linoleik asit otooksidasyonu için güçlü bir antioksidandır. Sonuçlar göstermektedir ki tamarin tohumundaki antioksidanlar süperkritik karbon dioksit yöntemiyle, ekstrakte edilebilir ve belki bunlar yiyeceklerin lipid peroksidasyonunu engelleyecek ve yiyeceklerin raf ömrünü uzatabilecektir [Tsuda ve ark., 1995].

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu bitkilerden elde edilen ekstraktın incelenmesi için kullanılmaktadır. Basıncın ve modifiyerin elde edilen yağın verimi üzerine etkisi ve yağın içeriği üzerine çalışılmıştır. Ekstraksiyon basıncı 17,2- 25,5 MPa aralığında, sıcaklık ise 45 °C olduğu şartlarda çalışılmıştır. Modifiyer olarak etanol kullanılmaktadır. Ekstrakt içindeki bileşenler gaz-sıvı kromatografi ile analiz edilmiş ve tutulma zamanı indeksi veri tabanları kullanılarak tanımlanmıştır [Menaker ve ark., 2004].

Ekstraksiyon basıncı ve akışkan modifiyer ile birlikte ekstraksiyon verimine ve bunun kompozisyonunu etkilemektedir. Adaçayının agar well difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal aktivite testi, esansiyel yağ ile süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrakt arasında önemli farklılıklar bulunduğunu göstermiştir [Menaker ve ark., 2004].

Bitkisel ve hayvansal yağlar, kimyasal yapıları nedeniyle oksidasyona karşı dayanım gösterirler. Yağların oksidasyona karşı gösterdiği direnme süresine oksidatif indüksiyon süresi denir. Antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılmaktadır. Oksidatif indüksiyon süresindeki artış, antioksidan katkısı ve antioksidan etkisi ile ilişkilidir [Harwalker, 1990; Clansarı, 1995; Privalov, 1995].

Antioksidan aktivitesinin saptanmasında difüzyon metodundan da yararlanılmıştır. Agar kapları kullanılarak oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Antioksidan aktivitesinin yoğunluk ve karoten renginin kalıcılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [Castro, 1986].

Süperkritik karbon dioksit ile lavanta çiçeklerinden uçucu yağların ekstraksiyonu yapılmış ve çalışmada çözücü akış hızının, sıcaklığın, basıncın ve ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon hızına olan etkisi incelenmiştir. Çalışmanın bir bölümünde 323 K ve $1.456 \cdot 10^{-3}$ kg/dakika akış hızı için basıncın ekstraksiyon verimi üzerine etkisini incelemiştirler. 80, 120 ve 140 bar basınç değerlerinde, basıncın artmasına paralel olarak ekstraksiyon veriminin de arttığını gözlemiştir [Akgün ve ark., 2000].

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu yöntemi ile nane yapraklarından uçucu yağın ekstraksiyonu yarı sürekli bir sistemde yapılmış ve ekstraksiyon hızının düşük sıcaklıklarda ve yüksek basınçlarda yüksek olduğu gözlenmiştir [Goto ve ark., 1993].

Doğal antioksidanları tanımlamada kullanılan tiyosiyanat yöntemi, Osawa ve Namiki tarafından yapılan çalışmada okaliptüs yaprağında denenmiştir. Linoleik asit ve etanol karışımı, 0,2 M fosfat tamponu ve antioksidan ile 40 °C' de inkübe edilerek, peroksit değeri ve tiyosiyanatla reaksiyon sonrası absorban değerine bağlı olarak hesaplanan peroksit değeri elde edilmiştir [Özdalyan, 1998].

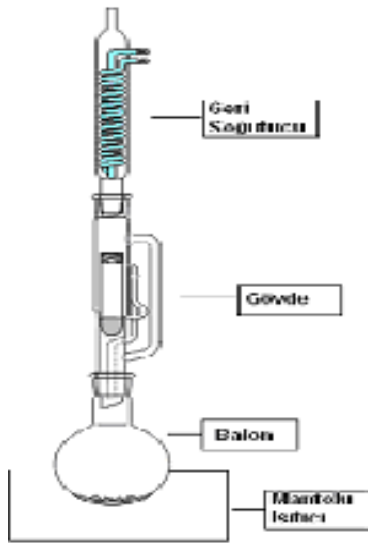
Lavanta bitkisinin uçucu yağ ürünlerinin CO₂ akışkanı kullanılarak süperkritik şartlar altında ekstraksiyonunda ürün verimi üzerine basıncın etkisi incelenmiş ve çalışmalar sürekli bir sistemde yapılmıştır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilen ürün miktarları buhar distilasyonu sonuçları ile karşılaştırılmış ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu deneyinde 95 bar basınçta çalışıldığında, ekstraksiyon süresi 3,5 saat tutulduğunda maksimum ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır [Biçer ve ark., 2003].

Likit veya süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu doğal esansiyel yağların ekstraksiyonu için alternatif bir teknik olmuştur. Bu proses düşük sıcaklıklarda çalıştırılabilir. CO₂ ürüne kontamine olmaz ve bozunma reaksiyonu oluşmaz. Bu

çalışmada solvent içinde CO₂' in yoğunluğu yaklaşık olarak 0,6 g/cm³ ' den düşüktür. Böylece doğal esansiyel yağların hepsini ekstrakte etmek mümkün olmuştur [Reverchon, 1995]. Annatto tohumlarından gıda renklendiricisi olarak endüstride kullanılan bixin ve norbixin eldesi , yonca yaprağı protein karışımından lutein ve karoten eldesi [Lorenzo ve ark., 1991] çalışması laboratuvar ölçekli olarak yapılmıştır .

Kuşburnu tohum yağı süperkritik karbon dioksit yöntemiyle ekstraksiyon prosesini optimize etmek için, çeşitli uygulama şartlarında ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon şartlarının yağdaki yağ asidi kompozisyonlarına etkisi gözlenmiştir. Deneysel şartları; basınçlar 150, 300, 450 bar, sıcaklık 40, 60, 80 °C, CO₂ akış hızı 2, 3, 4 ml/dakika. Deneysel sonuçları göstermektedir ki tohum yağı ekstratında temel olarak linoleik asit içermektedir. Proses optimizasyonu için yapılan deneysel tasarım analizleri sonuçları göstermektedir, basınç ve sıcaklık tohum yağının ekstraksiyon verimi üzerinde etkili parametrelerdir. Buna rağmen, yağın bir kısmının süperkritik karbon dioksit de çözünürlüğü olduğunu deneysel datalarda gözlemlenmiştir ve basit denklemler kullanılarak korelasyon yapılmıştır [Machmudah ve ark.,2006].

2.5. Soksile Ekstraksiyonu



Şekil 2.4. Soksile ekstraktörü

Soksile ekstraktörü, 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından icat edilen bir laboratuvar cihazıdır. Önceleri, katı bir deney numunesinden yağ ekstrakte edilmesi için tasarlanmış olmasına rağmen, bir bileşiği bir katıdan ekstrakte etmenin zor olduğu her şartta kullanılabilir. Genellikle, kuru deney numunesi soksile ekstraktörüne yerleştirilen, filtre kağıdından yapılmış yüksük şeklinde bir ekstraksiyon tüpüne konulur. Ekstraktöre, çözücü (genellikle dietil eter ya da petrol eteri) içeren şilifli bir cam balon ve yoğunlaştırıcı takılır. Çözücü ısıtılır ve böylece buharlaştırılır. Sıcak çözücü buharı yoğunlaştırıcıya ilerler, yoğunlaşarak katı numunenin üzerine düşer. Numuneyi içeren ekstraksiyon tüpünün bulunduğu yüksük yoğunlaşan çözücü ile tam dolduğunda, geri devir kolunun seviyesine ulaşır ve sifon oluşarak çözücü tekrar cam balona boşalır. Bu yoğunlaşma, yükselme ve sifon döngüsü, riflaks olarak adlandırılır ve sürekli tekrar edilir. Her döngü sırasında, katının içerdiği bir miktar yağ çözücüde çözünür. Ama çözücü ısıtılan cam balona ulaştığında orada kalır, döngüye tekrar katılmaz. Bu durum, bu ekstraksiyon metodunun en önemli avantajıdır, sadece saf çözücü katıyı ekstrakte etmek için buharlaşır ve yoğunlaşarak döngüye katılır. Bu nedenle bir cam balonda katıyı çözücü içerisinde ısıtarak ekstrakte etme yöntemiyle karşılaştırıldığında soksile ekstraktörü ile uygulanan bu yöntemin verimi daha yüksektir. Bir ekstraksiyonun sonunda arta kalan çözücü, ekstrakte edilen yağ buharlaştırılarak uzaklaştırılabilir.

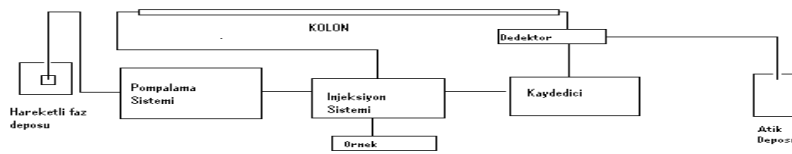
2.6. HPLC Cihazı ve Tekniği

Sıvı kromatografisi bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşikler bir kolonda bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek kolon içinde farklı hızda ilerler, kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Bu kromatografi uzun seneler öncesinden bilinmesine rağmen gelişmesi hızlı olmamış, ancak yeni tip kolon maddelerinin bulunması ve yüksek hareketli faz hızları kullanılmasıyla ayırmaların kısa zamanda gerçekleştirilmesi ve kolonların defalarca kullanılabilmesi son senelerde bu tip kromatografinin önem ve kullanma alanlarını genişletmiştir [Erdik ve ark., 2000].

Yeni tip sıvı kromatografisi bir kolona silika jel gibi absorban koymak ve ayrılacak bileşiği bir sıvı fazla beraber tabii akışıyla bu kolondan geçirmek suretiyle yapılan kolon kromatografisinden çok farklıdır. Burada taşıyıcı sıvı hidrolik veya mekanik çalışan pompalarla kolona basılarak yüksek hareketli faz hızı sağlanmakta, ayırma çabuk ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrıca bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip kaydedilmektedir. Böylece yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine yüksek işlevli sıvı kromatografisi denmektedir [Erdik ve ark., 2000].

2.6.1. Sıvı kromatografi birimleri ve özellikleri [Toğrul, 1995]

- a) Hareketli/ Taşıyıcı Faz Deposu
- b) Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa(lar)
- c) Enjeksiyon (Örnek Yükleme) Birimi
- d) Ayırma Birimi ; Kolon(lar)
- e) Ölçüm Birimi; Dedektör(ler)
- f) Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör
- g) Atık Deposu



Şekil 2.5. HPLC cihazı akış şeması

HPLC 'de uygun filtreden geçirilmiş ve içerdiği çözünmüş gazlar vakum uygulanarak ultrasonik banyoda 15 dakika kadar tutarak uzaklaştırılmış uygun bir çözücü ya da çözücü karışımı hareketli faz deposunu konulur. Ucunda çelik veya teflon bir filtre içeren teflon pompa giriş hortumu çözücü içine daldırılır. Filtre, pompaya hava

gitmemesi için çalışma boyunca sıvının içine tamamen dalmış durumda olmalıdır [Toğrul, 1995].

Çözücü pompalama sistemi vuruntusuz (puls içermeyen) akış oluşturmak üzere çift pistonlu bir ya da iki ayrı çözücüyle programlı çalışılacaksa iki pompa içeren bir sistemdir. Pistonların biri emerken diğeri bastığında sıvı kromatografisi için çok önemli olan düzgün bir akış elde edilir. Pompa sistemi üzerindeki bir basınç göstergesinden pompa çıkış basıncı gözlenebilir. Akış hızı ve kullanılan çözücü aynı olduğunda gösterge basıncı da aynı olmalıdır. Kolonda bozulma / tıkanma basıncın artmasına sebep olur. Pompanın düzgün çalışabilmesi için emme ve basma hattında hava olmamalıdır. Pompa hareketli faz deposundan aldığı çözücüyü önce enjektör sistemine gönderir. Enjeksiyon sistemi otomatik ya da manuel olabilir. Manuel olan sistemde enjeksiyon (örnek yükleme) işleminin rahat yapılabilmesi ve çözücü akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için analiz edilecek örnek çok uçlu bir vananın içerdiği kanala verilir. Vananın istendiği anda pozisyonu değiştirilerek hareketli fazın örneği içeren kanaldan geçmesi dolayısıyla örneği de beraberinde taşınması sağlanır. Çözücü enjeksiyon sisteminden geçtikten sonra sıvı kromatografisi sisteminin ayırma birimi olan kolona gelir. Sıvı kromatografisi kolonları paslanmaz çelik veya kartuş şeklindedir. Analitik kolonlar, yani kantitatif amaçlı 2 - 8 mm iç çaplı mikropartiküler yada peliküler dolgu içeren kolonlardır. Sıvı kromatografisi koşulları iyi ayarlandığında, kolonda birbirinden ayrılan maddeler taşıyıcı faz ile birlikte ölçüm birimi olan dedektöre gelirler. Dedektör maddenin derişimi ile orantılı bir özelliğini ölçmelidir [Toğrul, 1995].

Sıvı kromatografisinde ayırmaya etki eden değişkenlerden bir tanesi hareketli fazdır. Değişik tuzların belli bir pH' ya tamponlanmış sulu çözeltileri genellikle iyon değiştirme tipi kolonlar için ve organik çözücüler sıvı-kromatografisi tipi kolonlar için kullanılır [Erdik ve ark., 2000].

Genellikle hareketli faz bir sefer kullanılır; ama zor bulunan ve pahalı olanlar damıtılıp saflaştırılarak tekrar tekrar kullanılabilir. Kolonlar genellikle 10 - 60 ml/saat akış hızında çalışır. Bu akış hızlarını elde etmek için hareketli faza uygulanan basınç 30-400

atm arasında değişir. Basınç kolonun geğirgenliğine hareketli fazın viskozitesine, dolgu maddesinin büyüklüğüne bağlıdır. Kolon boyu uzatıldığında, dolgu maddesi tanecik boyu küçüldüğünde aynı akış hızını elde etmek için kolonun girişindeki basıncın daha yüksek olması gerekir. Hareketli fazın akış hızı, dedektör çıkışına konan bir kaba belirli hacimdeki sıvının toplanması için geçen zaman ölçülerek bulunur [Erdik ve ark., 2000].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

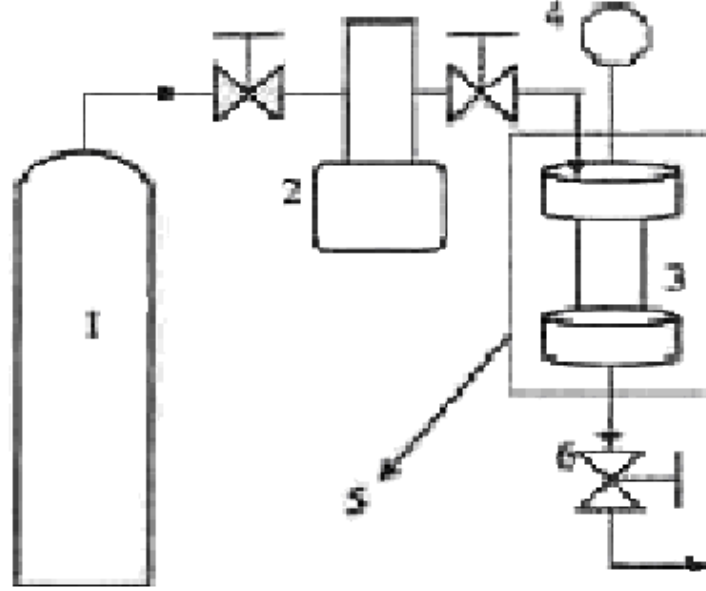
Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi ile antioksidan elde etmek için kullanılan adaçayı bitkisi, Mersin yöresinden temin edilmiş olup 2006 yılı mahsuludur. Doğal olarak yetiştiği yerden getirtilen adaçayı oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. TSE’ de belirtilen TS 4281 sayılı adaçayı standartlarına göre deneyde kullanılan adaçayı bitkisinin nem tayini yapılmıştır. Çizelge 3.1’ de TSE’ ye göre adaçayı standartları verilmiştir.

Çizelge 3.1. TSE’ ye göre adaçayı standartları

| İlgili TS Numarası | Özellikler | Standartta Öngörülen Değerler (Ağırlıkça) |
|--------------------|--------------------------------|---|
| TS 2134 | Rutubet Miktarı | En çok % 8 |
| TS 2133 | Toplam Kül Miktarı | En çok % 10 |
| TS 2133 | HCl’ de çözünmeyen kül miktarı | En çok % 15 |
| TS 3594 | Kusurlu adaçayı miktarı | En çok % 8 |

Adaçayı yaprakları sap kısmından temizlenerek, temas yüzeyini arttırmak için 1 - 3 mm arasındaki boyutlarda, Retsch marka ZM 200 model marka öğütücüde öğütülmüştür. Optimum partikül büyüklüğü 1 mm’ dir [Durling ve ark., 2007]. Deneylerde % 99.9 saflıkta CO₂ (Habaş) kullanılmıştır.

3.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu Deneyleri



Şekil 3.1. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu Sistemi : 1.CO₂ silindiri 2.Şırınga pompası 3.Ekstraktör 4. Termometre 5.Isıtma sistemleri(Su Banyosu) 6. Çek vana

Adaçayından süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi için kullanılan deney düzeneği Şekil 3.1' de verilmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu deneylerinin yapıldığı deney düzeneği üç ana bölümden oluşmaktadır. Birincisi maksimum karbon dioksit akış hızı 107 mL/dakika olan ve maksimum basıncı 517,1 bar olan şırıngalı pompa (ISCO, model 260 D şırıngalı pompa), ikinci olarak, yüksek basınca dayanıklı 304 paslanmaz çelikten yapılmış bir ekstraktör (L=15 cm, D=4 cm), sonuncu bölüm ise ekstraktın toplandığı bölümdür.

Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu deneylerinde, sıcaklık, çözücü: numune oranı, ekstraksiyon süresi ve karbon dioksit akış hızı sabit tutulmuş, basınç parametresi değiştirilmiştir. Yaklaşık olarak 1 mm boyutundaki partiküller ekstraktöre

yerleştirilmiştir. Yardımcı çözücü olarak ekstraktöre saf su eklenmiştir. Yardımcı çözücü kullanılarak, ekstraksiyon süresi kısaltılmış ve ekstraksiyon verimi artırılmıştır [Lang ve ark., 2001]. Çözücü: numune oranı, literatür çalışmasındaki optimum değerler dikkate alınarak, 20:1 olarak seçilmiştir [Durling ve ark., 2007]. Ekstraktörün üst kapağı içine vanadaki ve hattaki tıkanmayı önlemek amacıyla delik açıklığı 0,1 mm olan bir süzgeç (poliamid malzeme) yerleştirilmiştir. Deney öncesi çalışmalarda numunesiz çalışıldığında sistemin yaklaşık olarak 60 dakikada yatışkın duruma geldiği gözlenmiştir ve ayrıca bu çalışmalar sırasında sistemdeki safsızlıklar giderilmiştir. Deneye başlamadan önce ekstraktör ve bağlantı elemanları termostatlı su banyosu ile 35 ° C sıcaklıkta yaklaşık 30 dakika beklenerek sistemin dengeye gelmesi sağlanmıştır.

Sıvı karbon dioksiti alabilmek için karbon dioksit tüpü içerisine sifon yerleştirilmiştir. Pompa giriş vanası açılarak sıvı CO₂ şırıngalı pompa içerisine beslenmiştir. Sıvı CO₂ istenilen basınç değerine pompa ile getirilmiştir. Deney sırasında çalışılan basınç değerleri 75, 80 ve 85 bardır. Ekstraktör ve bağlantı elemanları bir termostat yardımıyla deney sıcaklığı olarak seçilen, 35⁰C' a kadar ısıtılmıştır. Bu sıcaklık değeri ısıya duyarlı olan antioksidan bileşiklerin zarar görmemesi için optimum sıcaklıktır [Durling ve ark., 2007]. Pompa ile sıkıştırılarak istenilen basınca getirilmiş olan CO₂, süperkritik sıcaklığa da ekstraktörün ısıtılmasıyla getirilmiştir. Sistemin yatışkın duruma gelmesi için yaklaşık bir saat beklenmiştir. Daha sonra çek vana açılarak ekstraksiyon işlemi başlatılmıştır. Literatür araştırmasına dayanarak CO₂ akış hızı yaklaşık 1 mL/dakika olarak tutulmuştur [Biçer ve ark., 2003]. Yaklaşık 2,5 saat deney süresinin tamamlanmasıyla ve bu sürenin sonunda ekstraktör çıkışındaki iğne vanadan genleşme sonucu basıncı düşen CO₂ gazının çıkışı gözlenmiş ve sistem basıncının 1-2 bara düşürülmesinden sonra ekstraktın alınmasıyla deney son bulmuştur.

3.3. Soksile Ekstraksiyonu Deneyi

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun yanı sıra ekstraksiyon verimlerini kıyaslamak amacıyla soksile ekstraksiyonu deneyi yapılmıştır. Bu deneyde, 1 mm partikül

büyükliğünde öğütülen adaçayı yaprakları, 15 gram tartılarak kartuşa sarılmıştır. Kartuş içine sarılmış olan numune soksile cihazına yerleştirilmiştir. Balon jojeye 1 L saf su konulmuştur ve balon joje içerisine kaynama taşı atılmıştır. Ekstraksiyon süresi 195 dakika sürmüştür ve soksile ekstraksiyonu süresince oluşan sifon sayısı beştir. Elde edilen ekstrakt oda sıcaklığına soğutulduktan sonra suyu uçurularak verim hesabı yapılmıştır.

3.4. HPLC (YBSK Analizi)

Ekstreler YBSK sistemi (hp 1100), Diode Array detektör (DAD 1 A hp) kullanılarak analiz edilmiştir. Ters faz C₁₈ Ultrasphere (Waters, 300 x 3,9 mm; partikül çapı 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Çözücü A, metanol:su:asetik asit (10:88:2, hacimsel) ve çözücü B, metanol:su:asetik asit (90:8:2, hacimsel) dağılım sistemi fenolik asitler ve flavonlar için hareketli faz olarak kullanılmıştır [Öztürk ve ark., 2002]. Gradient programı 0 dan %15 B ye 15 dakikada, 15 den %50 B ye 5 dakikada, 50 den %70 B ye 9 dakikada 70 den %100 B ye 6 dakikada arttırılmış ve 5 dakikada da başlangıç konsantrasyonuna dönmüştür. Kolon sıcaklığı 30 °C olarak seçilmiştir. Analizde 1 ml/dakikalık akış hızı kullanılmış ve 280 nm, 360 nm ve 400 nm' de ölçüm alınmıştır [Öztürk ve ark., 2002]. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu (75, 80, 85 bar) ve soksile ekstraksiyonu deneyleri sonucunda elde edilen ekstraktlar HPLC ile analiz edildikten sonra, numunelerin içine α – tokoferol doğal antioksidanı katılarak antioksidan etkisine bakılmıştır. Her bir HPLC analiz süresi 40 dakika sürmüştür.

HPLC analizleri yapılmadan önce 75, 80 ve 85 barda yapılan süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ve soksile ekstraksiyonu ekstraktlarının karbon dioksit sebebiyle kirlilik içermediği bilindiğinden saf haliyle ayrı ayrı olmak üzere ve 1:1 oranda (hacimce) α – tokoferol doğal antioksidanı ile birlikte olmak üzere ayrı ayrı 280 nm, 360 nm ve 400 nm dalga boylarında HPLC spektrumları alınmıştır. α – tokoferol maddesi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalından temin edilmiştir. α – tokoferol

10 ml kloroformda çözülmüştür ve faz ayırımına bırakılmıştır. Faz ayrımı olduktan sonra α – tokoferolün içinde bulunduğu alt fazdan alınmış ve HPLC analizi yapılmıştır.

HPLC analizinde kullanılan gradient programı çizelge 3.2’ de verilmiştir. Bu program literatür verileri doğrultusunda uygulanmıştır [Öztürk ve ark., 2002].

Çizelge 3.2. HPLC deneyi gradient programı

| Enjeksiyon Miktarı | 10 μ L | | | |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------|
| Zaman(Dakika) | % Çözücü A | % Çözücü B | Akış(ml/dakika) | Maksimum Basınç(bar) |
| 0 | 100 | 0 | 1 | 400 |
| 15 | 85 | 15 | 1 | 400 |
| 5 | 50 | 50 | 1 | 400 |
| 9 | 30 | 70 | 1 | 400 |
| 6 | 0 | 100 | 1 | 400 |
| 5 | 100 | 0 | 1 | 400 |

Çizelge 3.3’ de ise 280 nm, 360 nm ve 400 nm dalga boylarında değişik süperkritik ekstraksiyon basınçlarında ve soksile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların saf halde ve tokoferol ile birlikte düzenlenmiş halde olmak üzere numune dökümü verilmiştir.

Çizelge 3.3. HPLC deneyinde analiz edilen numuneler ve analizin yapıldığı UV-Visible dalga boyları

| Dalga Boyu (nm) | Numuneler | Dalga Boyu (nm) | Numuneler | Dalga Boyu (nm) | Numuneler |
|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|
| 280 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 360 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 400 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı |
| 280 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 360 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 400 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı |
| 280 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 360 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 400 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı |
| 280 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 360 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 400 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol |
| 280 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 360 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 400 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol |
| 280 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 360 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 400 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol |
| 280 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı | 360 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı | 400 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı |
| 280 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı + α – tokoferol | 360 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı + α – tokoferol | 400 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı + α – tokoferol |

4. DENEY SONUÇLARI

4.1. Adaçayı Yapraklarında Nem Miktarı Tayini Deney Sonuçları

Adaçayı yapraklarında nem tayini deneyi iki paralel hazırlanarak, 1,5 saat 135 °C etüvde gravimetrik olarak yapılmıştır. Bu iki paralelin aritmetik ortalaması alınarak adaçayının nemi % 6,62 olarak hesaplanmıştır.

4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ve Soksile Ekstraksiyonu Deney Sonuçları

Çizelge 4.1. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu deney sonuçları

| BASINÇ (Bar) | EKSTRAKSİYON SÜRESİ (Saat) | ÇÖZÜCÜ: NUMUNE ORANI | SICAKLIK (°C) | VERİM (g özüt/ g kuru adaçayı) | Toplam (g özüt) |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|---|--------------------|
| 75 | 4 | 20:1 | 35 | 0,06 | 0,300 |
| 80 | 4 | 20:1 | 35 | 0,134 | 0,400 |
| 85 | 4 | 20:1 | 35 | 0,146 | 0,728 |

Adaçayı bitkisinden süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ve soksile ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlar üzerinde basıncın ve bu iki ekstraksiyon yönteminin verimlerini karşılaştırabilmek amacıyla 110 °C' de sabit tartıma getirilmiş porselen numune kaplarına alınan ekstraksiyon ürünleri, 105 °C sıcaklığa getirilmiş etüvde kurutulmuş ve gram kuru madde başına gram özüt olarak, verim ayrı ayrı hesaplanmıştır. Hesaplama sonuçları aşağıda verilmiştir:

75 bar basınç deney sonucu: 86,8 g boş kap ağırlığı, 5 g kuru adaçayı

Etüvde kurutulmuş numune + kap ağırlığı: 87,1 g

$$87,1 - 86,8 = 0,300 \text{ g Özüt}$$

$$\text{Verim} = 0,300 / 5 = 0,06 \text{ g özüt/g kuru adaçayı}$$

80 bar basınç deney sonucu: 56,2 g boş kap ağırlığı, 3 g kuru adaçayı

Etüvde kurutulmuş numune + kap: 56,6 g

$$56,6 - 56,2 = 0,400 \text{ g Özüt}$$

$$\text{Verim} = 0,400 / 3 = 0,134 \text{ g özüt/g kuru adaçayı}$$

85 bar basınç deney sonucu: 100,735 g boş kap ağırlığı, 5 g kuru adaçayı

Etüvde kurutulmuş numune + kap: 101,463 g

$$101,463 - 100,735 = 0,728 \text{ g Özüt}$$

$$\text{Verim} = 0,728 / 5 = 0,146 \text{ g özüt/g kuru adaçayı}$$

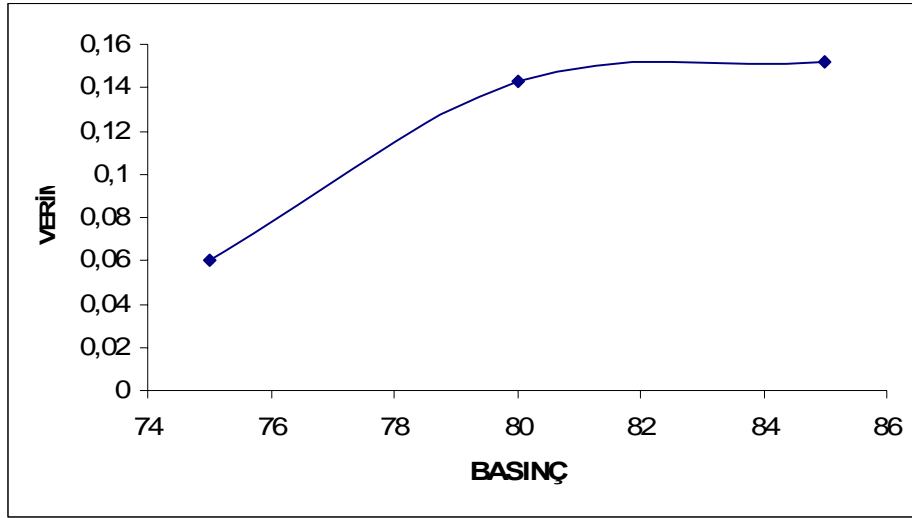
Soksile deney sonucu : 210,2 g boş kap ağırlığı, 15 g kuru adaçayı

Etüvde kurutulmuş numune + kap: 210,5 g

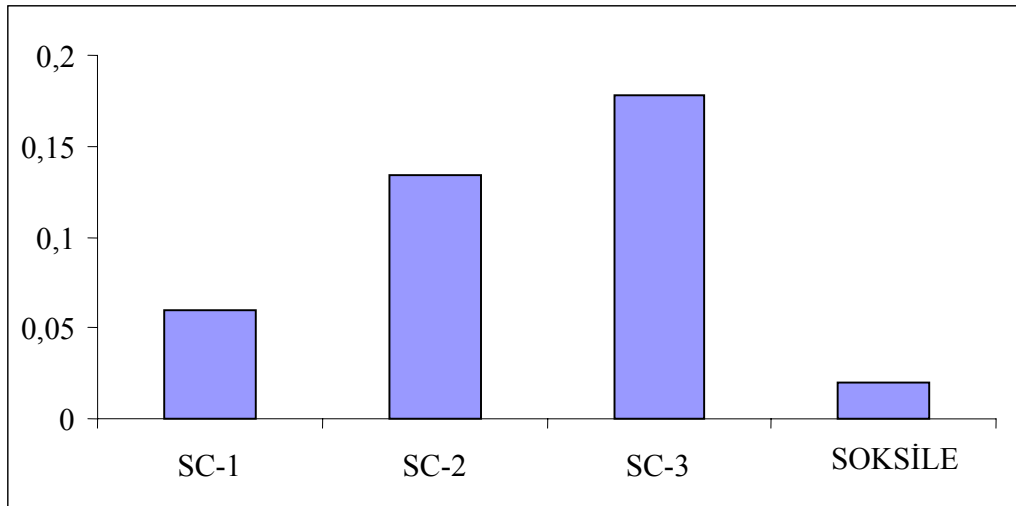
$$210,5 - 210,2 = 0,300 \text{ g Özüt}$$

$$\text{Verim} = 0,3 / 15 = 0,02 \text{ g özüt/g kuru adaçayı}$$

Sonuçlardan görüleceği üzere, süperkritik ekstraksiyonunun basıncının artmasıyla verimde yükselme tespit edilmiştir. Soksile ekstraksiyonu verimi ise süperkritik şartlara göre oldukça az bulunmuştur. sonuçların grafik olarak gösterimi şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu deney sonuçları verim grafiği



Şekil 4.2. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ve soksile ekstraksiyonu deneylerinin verim karşılaştırılması

Şekil 4.1’ de görüldüğü gibi süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunda basınç arttıkça, ekstraksiyon verimi de artmaktadır. 75 bar ile 80 bardaki ekstraksiyon verimi arasında görülen fark basınç arttıkça azalmaktadır. Bu nedenle daha yüksek basınçlarda çalışmanın ekonomik olmayacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca elde edilen ekstraktlar ultra viole ışığından etkilenmemesi amacıyla karanlıkta korunarak UV ve HPLC

spektrumları elden geldiğince çabuk yapılmıştır [Richheimer ve ark., 1996; Djarmati, 1991].

4.3. Adaçayının UV- Visible Spektrofotometre Sonuçları

UV spektrumu 200 - 3600 nm dalga boyu aralığında çalışabilen Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS/NIR spektroskopi cihazında alınmıştır. UV spektrum sonuçlarında adaçayından elde edilen özütün maksimum absorplama dalga boyu 280 nm civarında olduğu görülmüştür. Literatür çalışmalarında adaçayı ekstraktı için maksimum absorplama dalga boyunun 280 nm olduğu belirtilmiştir [Santos-Gomes ve ark., 2002]. UV spektroskopi analiz sonucu EK-2' de verilmiştir.

4.4. HPLC Analiz Sonuçları

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile 75, 80 ve 85 bar basınçlarda ve soksile ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların HPLC cihazı ile analizi 280, 360 ve 400 nm' lerde yapılmıştır. Numunelere 1:1 oranda α – tokoferol ilave edilerek analizler tekrarlanmıştır. Numunelere α – tokoferol eklenmeden ve eklendikten sonraki analiz sonuçları karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2' de 280 nm dalga boyunda çalışılan ekstraktların pik alanları verilmiştir. Çizelgeden görüleceği üzere adaçayı yaprakları için verilen maksimum absorplama dalga boyu olan 280 nm' de pik alanlarının oldukça yüksek olduğu ve α – tokoferol ile düzenlenmiş pik alanlarında ise toplamda yaklaşık 3 katı pik alanı bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. 280 nm dalga boyunda HPLC analizlerinin sonuçları

| Dalga Boyu (nm) | Numuneler | Tutma Zamanı (Retention Time) | Pik Alanı |
|-----------------|---|-------------------------------|-----------|
| 280 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 3,134 | 452,688 |
| 280 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 3,079 | 417,588 |
| 280 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 3,134 | 560,637 |
| 280 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 3,114 | 1354,504 |
| 280 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 3,106 | 1370,734 |
| 280 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 3,110 | 1467,588 |
| 280 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı | 3,148 | 405,906 |
| 280 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı + α – tokoferol | 3,118 | 1392,332 |

Çizelge 4.3’ de 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonuçları görülmektedir. 280 nm’ ye göre pik alanlarında oldukça düşüş olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. 360 nm dalga boyunda HPLC analizlerinin sonuçları

| Dalga Boyu (nm) | Numuneler | Tutma Zamanı (Retention Time) | Pik Alanı |
|-----------------|---|-------------------------------|-----------|
| 360 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 8,368 | 125,951 |
| 360 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 8,154 | 103,396 |
| 360 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 8,231 | 74,968 |
| 360 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 8,243 | 68,579 |
| 360 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 8,186 | 102,546 |
| 360 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 8,178 | 38,623 |
| 360 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı | 5,919 | 460,233 |
| 360 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı + α – tokoferol | 5,846 | 256,980 |

Çizelge 4.4’ de ise 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonuçları görülmektedir. 360 nm’ ye göre pik alanlarında 10 katı kadar azalma olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. 400 nm dalga boyunda HPLC analizlerinin sonuçları

| Dalga Boyu (nm) | Numuneler | Tutma Zamanı (Retention Time) | Pik Alanı |
|-----------------|--|-------------------------------|-----------|
| 400 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 8,275 | 10,272 |
| 400 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 8,242 | 10,720 |
| 400 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı | 8,389 | 13,485 |
| 400 | 75 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 8,221 | 10,303 |
| 400 | 80 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 8,299 | 11,392 |
| 400 | 85 barda SC-CO ₂ Ekstratı + α – tokoferol | 8,347 | 13,634 |
| 400 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı | 10,239 | 49,291 |
| 400 | Soksile Ekstraksiyonu Ekstratı + α – tokoferol | 10,192 | 31,161 |

Çalışılan dalga boyları 280-400 nm arasında olup ultraviyole bölgeyi temsil etmektedir. Literatürde de maksimum absorplama dalga boyunun 280 nm olduğu belirtildiğinden, 280 nm dalga boyundaki pik alanlarının 360 nm ve 400 nm' e göre daha yüksek bulunmasının sebebi böylelikle ortaya çıkmıştır [Santos-Gomes ve ark., 2002].

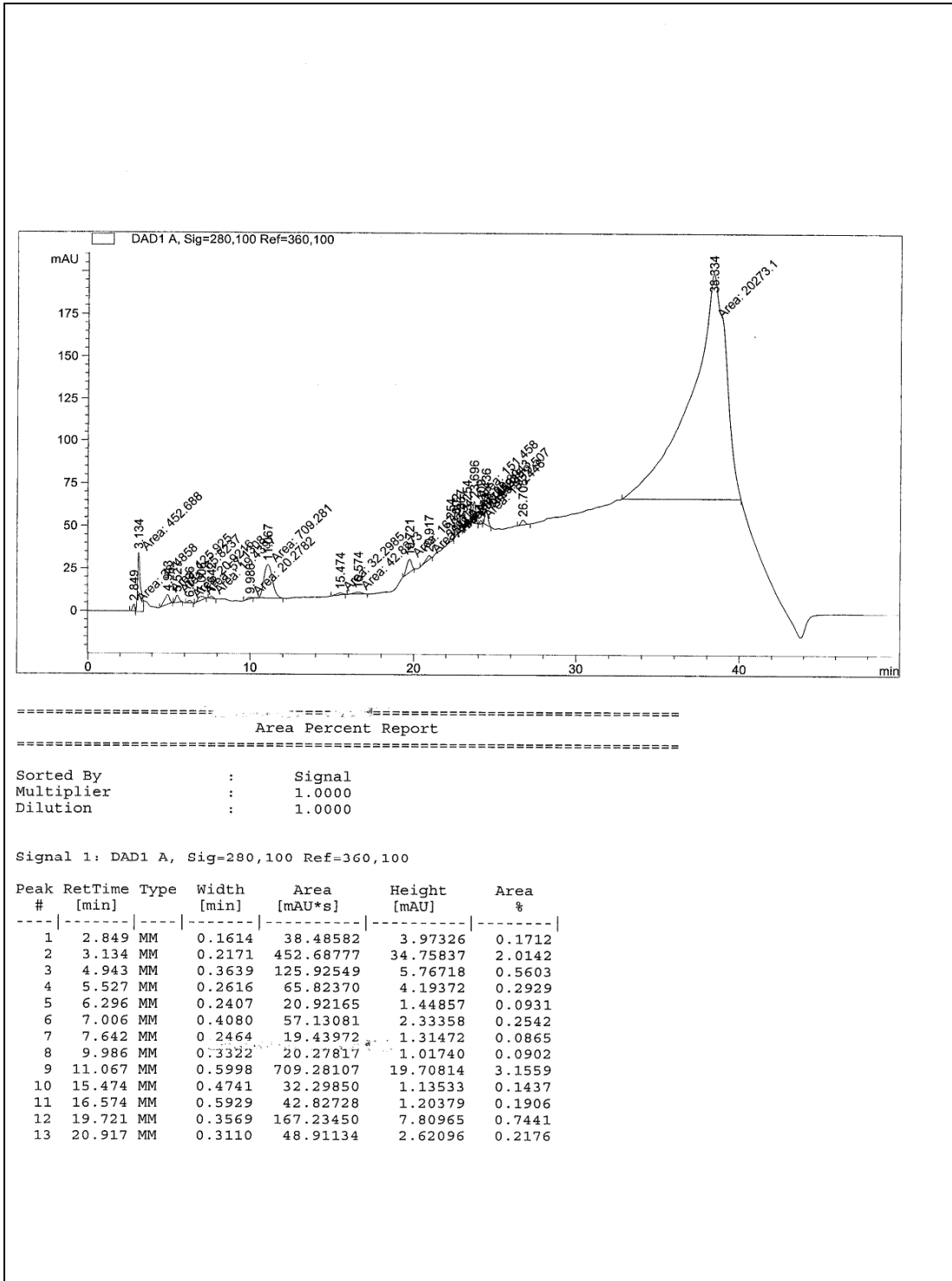
Adaçayı yapraklarında bulunan fenolik antioksidanların yağ içerisine katılması ile bozunmayı geciktirdiği bilinmektedir [Cuvelier, 1994]. α – tokoferolün adaçayı ekstratındaki rosmarinik asitle sinerjistik etki oluşturduğu bilindiğinden, değişik basınçlarda elde edilen süperkritik ekstraksiyon ekstraktlarının ve soksile ekstraktının HPLC analizi yapılmıştır [Wada ve Fang, 1992].

HPLC cihazı yardımıyla adaçayı süperkritik ekstraksiyonu ekstraktlarının analizi 280 nm, 360 nm ve 400 nm dalga boyunda olmak üzere elde edilen ekstraktlarla α – tokoferol analizi karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuca göre kullanılan karbon dioksit çözücüsünün kirlilik oluşturmama ve diğer pozitif özelliklerinden dolayı herhangi bir yan etkisinin olmadığı HPLC analizleri sonucunda elde edilmiştir [Chirinos ve ark., 2006].

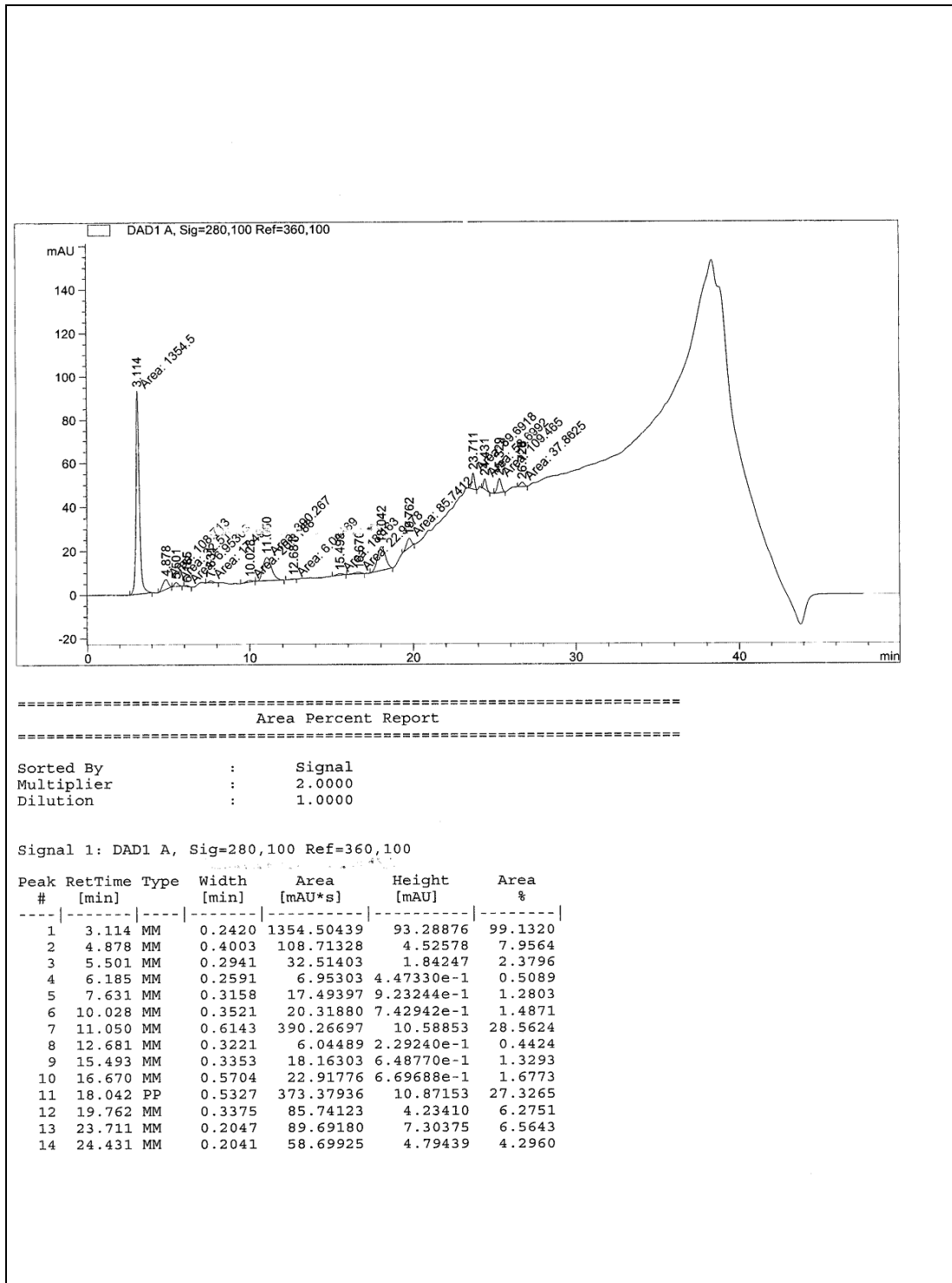
HPLC analizleri sonucunda elde edilen ekstraktlarda her bir örnek için görünen pik alanları, 1:1 oranında α – tokoferol uygulanmış pik alanlarıyla karşılaştırılmıştır. Sinerjistik etkiden dolayı α – tokoferollü pik alanlarının çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir [Durling ve ark., 2007].

Süperkritik ekstraksiyon basıncının artırılması ile ekstraksiyon veriminde artış kaydedildiğinden HPLC analiz sonuçlarından da görüleceği üzere pik alanlarında artış tespit edilmiştir. [Tsuda ve ark., 1995]

Bir örnek olmak üzere, şekil 4.3’ de 280 nm’ de 75 bar süperkritik basınçta elde edilen özütün HPLC analiz çıktısı verilmiştir. Şekil 4.4’ de ise aynı dalga boyunda aynı basınçta elde edilen özütün sinerjistik etkiden dolayı α – tokoferol ile birlikte olmak üzere HPLC analiz çıktısı verilmiştir. Tutma zamanı şekil 4.3’ de 3,134 dakika iken, şekil 4.4’ de 3,114 olduğu ve böylelikle tutulma zamanlarının hemen hemen aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. 75 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu



Şekil 4.4. 75 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa-tokoferollu 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mersin yöresine ait adaçayı yapraklarına değişik basınçlarda süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu uygulanmıştır. Ekstraksiyonda sıcaklık 35 °C' de; karbon dioksit akış hızı 1mL/dakika olacak şekilde sabit tutulmuştur. Ayrıca soksile ekstraksiyonu da uygulanarak her iki ekstraksiyondaki verim karşılaştırılmasına geçilmiştir. Süperkritik şartlarda basıncın arttırılmasıyla verimin arttığı ancak, soksile ekstraksiyonunda ise verimin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklığın 35 °C' de sabit tutulmasının sebebi, adaçayı yapraklarında bulunan antioksidan çeşitlerinin yapısını korumak ve bozunmayı önlemektir.

Her iki ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen adaçayı ekstraktlarının HPLC cihazı ile analizi yapılmıştır. Yapılan süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunda kullanılan karbon dioksitin toksik olmaması sebebiyle elde edilen ekstraktların saflık yüzdelerinin yüksekliğinden dolayı doğrudan doğruya HPLC analizlerinin yanısıra α – tokoferol ile 1:1 oranda birlikte kullanımı sinerjistik etki oluşturduğundan düzenlenmiş olarak her bir ekstrakt ayrı ayrı olmak üzere sırasıyla 280 nm, 360 nm ve 400 nm dalga boylarında HPLC analizleri yapılmıştır [Wada ve Fang, 1992; Chirinos, 2007]. Adaçayı ekstraktlarının tokoferolle kullanımı, sinerjistik bir etki oluşturduğundan HPLC analizi yapılan numunelere 1:1 oranda α -tokoferol katılmış ve pik alanları kıyaslanarak alfa-tokoferol katılan numunelerin pik alanlarının büyüdüğü gözlenmiştir [Wada ve Fang, 1992]. Elde edilen ekstraktların doğal antioksidan olan α -tokoferol' ün etkisini arttırıcı yönde etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen ekstraktların soksile ekstraksiyonuna göre daha fazla miktarda HPLC pik alanlarına sahip olduğu bulunmuştur. 280 nm dalga boyunda elde edilen HPLC sonuçlarına göre süperkritik şartlarda basıncın arttırılması ile verimde artış olduğu gibi pik alanlarında da artış kaydedilmiştir [Tsuda ve ark., 1995]

Ülkemizde adaçayı bitkisi doğal olarak yetişmekte ve bu türlerin 89 tanesi endemik, yani yalnızca ülkemizde yetişmektedir. Birçok hastalığın tedavisinde adaçayı bitkisinin sahip olduğu güçlü antioksidan özelliği önemli rol oynamaktadır. Sentetik ürünlerin toksik

olması ve kullanımını sonucu ortaya çıkan yan etkileri sebebiyle ve tüm dünyanın artık doğal ürünlere yönelmesinden dolayı adaçayı bitkisinin çeşitli yararlı yönlerinin ortaya çıkartılması konusunda ticari çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akgün, M., Akgün, A.N., Dinçer, S., “Extraction and Modeling of Lavender Flower Essential Oil Using Supercritical Carbon Dioxide” , *Industry Engineering Chemistry Research*, 39:473-477, (2000).
- Aleksovski, S. A., Sovova, H., “Supercritical CO₂ Extraction of Salvia Officinalis L.” , *The Journal of Supercritical Fluids*, baskıda (2006).
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., “Gıda Maddelerinde Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri Arasında Cuprac Yönteminin Yeri” , *Food Chemistry*, 52: 7970-7981, (2004).
- Başer, K.H.C., Koca, F., Tümen, G., Akyalçın, H., “Türkiye’ de Yetişen Sideritis Türleri” , *12. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 79-85, (1994).
- Biçer, A., Özkan, G., Ergen, A., “Lavanta bitkisi çiçeklerinden süperkritik CO₂ ile uçucu yağların ekstraksiyonuna basıncın etkisi” , *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 16(4): 717-723, (2003).
- Büyükkaya, F., “Sideritis Trojana (Tüylü Çay, Sarıkız Çayı, Adaçayı, Dağ Çayı) Bitkisinin Kimyasal Analizi ve Bileşenlerinin Yapılarının Aydınlatılması” , Yüksek Lisans Tezi, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çanakkale, 2-35, (2002).
- Castro, M., In Proceeding World Conference on Emerging Technologies in Fats and Oils Industries, *AOCS Champaign*, 392, (1986).
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y., “Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua(*Tropaeolum tuberosum* Ruiz&Pavon) tubers” , *Separation and Purification Technology*, 55: 2, 217-225, (2007).
- Clansari, A.m., “Simultaneous Determination of Thermal Diffusivity and Conductivity Using a Modified Differential Scanning Calorimeter” , *IFT Annual Meeting*, 261, (1995).
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., “Comparison of The Antioxidative Activity of Some Acid-Phenols Structure-Activity Relationship” , *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 56(2): 324-325, (1992).
- Cuvelier, M., Cuvelier, E., Berset, C., Richard, H., “Antioxidant Constituents in Sage” , *Food Chemistry*, 42: 665-669, (1994).

Cuvelier, M. E., Berset, C., Richard, H., "Use of new for Determining Comparative Antioxidant Activity of BHA, BHT, Tocopherols and Extracts from Rosemary and Sage" , *Science Des Aliments*, 10: 797-806, (1990).

Cuvelier, M.E., "Antioxidant Constituents in Sage" , *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42: 665-669, (1994).

Cuvelier, M.E., "Antioxidative Activity and Phenolic Composition of Pilot Plant and Commercial Extracts of Sage and Rosemary" , *Journal of American Oil Chemistry Society*, 73(5): 645-652, (1996).

Davis, P.H., "Flora of Turkey and East Aegean Islands" , *Edinburg University Press*, 7, (1988).

Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigoray, S., "Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. Cultivated in South Brazil" , *Food Chemistry*, 100: 603-608, (2007).

Djarmati, Z., Jankov, R.M., Schwirtlich, E., Djulinac, B., Djordjevic, A., "High Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Sage by Supercritical CO₂ Extraction" , *JAOCs*, 68(10):731-734, (1991).

Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., Perry, N. B., "Extraction of phenolics and essential oil from dried sage(*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures" , *Food Chemistry*, 101: 1417-1424, (2007).

Endo, Y., "Antioxidant Effects on Chlorophyll and Pheophytin on the Autoxidation of Oils" , *Journal American Oil Chemistry Society*, 62(9): 1387-1390, (1985).

Erdik, E., Obalı, M., Yüksekşık, N., Öktemer, A., Pekel, T., İhsanoğlu, E., "Denel Organik Kimya" , *Ankara Üniversitesi*, Ankara, 133-136, (2000).

Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Pierce M.M., Niemann, L., Siekman, D.K., "Extraction of Cholesterol and Other Lipids from Dried Egg Yolk Using SC-CO₂" , *Journal of Food Science*, 55 (1): 95-98, (1990).

Goto, M., Sato, M., Hirose, T., "Extraction of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide" , *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 26: 401-407, (1993).

Gökalp, N., "Doğal antioksidanlar" , Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 7-33, (2006).

Guillen, M.D., Cabo, N., "Characterization of the Essential Oils of some Cultivated Aromatic Plants of Industrial Interest" , *Journal Science Food Agriculture*, 70: 359-363, (1996).

- Harwalkar, V.R., "Thermal analysis of Foods", *Applied Food Science Series*, 1-65, (1990).
- Ibanez, E., Oca, A., Murga, G., Sebastian, S. L., Tabera, J., Reglero, G., "Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants" , *Food Chemistry*, 47: 1400-1404, (1999).
- Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., Gono-Bwalya, A.B., Zyl, R.L., Vuuren, S.F., Lourens, A.C.U., Başer, K.H.C., Demirci, B., Lindsey, K.L., Staden, J., Steenkamp, P., "The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African Salvia Species" , *Journal of Ethno-Pharmacology*, 102:382-390, (2005).
- King, M.B., Catchpole, O.J., "Physochemical data required for the design of near critical fluid extraction process", *The Journal of Supercritical Fluids*, 9:273-279, (1989).
- Lang, Q., Wai, C. M., "Supercritical Fluid Extraction in Herbal and Natural Product Studies a Practical Review" , *Talanta*, 53:771, (2001).
- Lawless, J., *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*, *Element Books Limited*, Great Britain, 21-69, (1995).
- Lorenzo, T.V., Schwartz, S.J., Kill, P.K., "Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids from Dunaliella algae" , In Proceeding of the 2nd Intern. Symp. on the Supercritical Fluids, *Mc Hugh M.A.*, 2, (1991).
- Lu, Y., Leap Foo, L., "Antioxidant activities of polyphenols from sage (Salvia officinalis)" , *Food Chemistry*, 75: 197-202, (2001).
- Maillard, M.N., Giampaoli, P., Cuvelier, M.E., "Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography Mass Spectrometry Characterization of Antioxidant" , *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43: 339-347, (1996).
- Menaker, A., Kravets, M., Koel, M., Orav, A., "Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs" , *C. R. Chimie*, 7: 629-633, (2004).
- Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., Motonobu, G., "Supercritical CO₂ Extraction of Rosehip Seed Oil: Fatty acids composition and process optimization" , *Food Chemistry*, 70: 270-272, (2006).
- Özdalyan, N., "Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi ile Elde Olunan Adaçayı Ekstratının Antioksidan Özellikleri Üzerine Bir Çalışma" , Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 5-37, (1998).

- Özer, E., Platin, S., Akman, U., Hortaçsu, Ö., “Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Spearmint Oil from Turkish Mint-plant Leaves” , *Journal of Chemistry*, 16: 273-283, (1992).
- Öztürk, N., Tunalıer, Z., Koşar, M., Başer, K.H.C., “Petroselinum Crispum, Anethum Graveolens ve Eruca Sativa’ nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi” , *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, Eskişehir, 376-384, (2004).
- Pala, M., Saygı, Y.B., “Süperkritik Akışkanlarla Ekstraksiyon ve Gıda Sanayinde Kullanım Alanları” , *Gıda Sanayi*, 5: 9-14, (1988).
- Pekyardımcı, Ş., “Süperkritik Akışkanlar Teknolojisi” , *Gıda Sanayi*, 16(6):407-411, (1991).
- Perry, N., Baxter, A., Brennan, N., “Dalmatian Sage Differing Oil Yields and Compositions from Flowering Accessions” , *Flower and Fragrance Journal*, 11(4):231-238, (1996).
- Pitzer, K.S., “The Volumetric and Thermodynamic Properties of Fluids” , *Journal American Chemistry Society*, 77: 3427, (1995).
- Privalov, “ Precise Scanning Calorimeter for Studying Thermal Properties of Biological Macromolecules in Dilute Solutions” , *Analytical Biochemistry*, 232(1): 79-85, (1995).
- Rajarho, S., Sofos, J.N., Schmidt, G.R., “Solid Phase Acid Extraction Improves Tiobarbütiric Acid Method to Determine Lipid Oxidation” , *Journal of Food Science*, 58(4): 921-924, (1993).
- Reverchon, E., Della Porta, G., “Supercritical CO₂ Extraction and Fractionation of Lavender Essential Oil and Waxes” , *Food Chemistry*, 43: 1654-1658, (1995).
- Richheimer, S. L., Bernart, M., “Antioxidant Activity of Lipid Soluble Phenolic Diterpenes from Rosemary” , *JAOCs*, 73: 507-514, (1996).
- Rizvi, S.S., “Supercritical Fluid Extraction Fundamental Principles and Modeling Methods” , *Food Technology*, 7: 55-65, (1986).
- Rossel, J.B., “Rancidity in Foods” , *Hamilton Applied Science Publishers*, London, 21, (1983).
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Fernandes-Ferreira, M., “Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage” , *Plant Science*, 162: 981-987, (2002).

Schreiber, G., "An Interlaboratory Trial on the Identification of Irradiated Spices, Herbs and Spice-Herb Mixtures by Thermoluminescence" ,*Journal of AOAC International*, 78(1): 88-93, (1995).

Seberta, M.M., Chesler, S.N., "Supercritical Fluid Extraction Procedure for Trace Organic Species from Solid Samples" , *Journal Chromotography*, 447:53-63, (1988).

Stahl, E., Schütz, E., Mangold, H. K., "Extraction of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide" , *Food Chemistry*, 28:1153-1157, (1980).

Tehrani, J., "Succesful Supercritical Fluid Extraction Strategies" , *American Laboratory Isco Bulletin*, Isco, Inc. Lincoln, 71: 4010-4015, (1993).

Thomson, D., "Response Surface Experimentation", *Journal of Food Processing Preservation*, 6:155-188, (1982).

Toğrul, T., "İnstrumental Analiz" , *Ankara Üniversitesi*, Ankara, 19-38, (1995).

Tsuda, T., Mizuno, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., Osawa, T., "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidative Components from Tamarind Seed Coat" , *Food Chemistry*, 43: 2803-2806, (1995).

Ulubelen, A., Miski, M., Marby, T.J., "A new diterpenoids from *Salvia Tomentosa*" , *Journal Natural Product*, 44(1): 119-124, (1981).

Vega, P.J., Balaban, M.O., Sims, C.A., O' Keefe, S.F., Cornell, J.A., " Supercritical Carbon dioxide Extraction Efficiency for Carotenes from Carrots by RSM" , *Journal of Food Science*, 61:757-759, (1996).

Wada, S., Fang, X., " The Synergistic Antioxidant Effect of Rosemary Extract and Tocoferol in Sardine Oil Model System and Frozen Fish Meat " , *Journal of Food Process Preservation*, 16: 263-274, (1992).

Westwood, S.A., Supercritical Fluid Extraction and Its Use in Chromotographic Sample Preparation , *Blackie Academic and Professional*, USA, 1-67, (1993).

Wong, J.W., Hashimoto, K., Shibamoto, T., "Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts and Vitamin E in a Model Meat System" , *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43: 2707-2712, (1995).

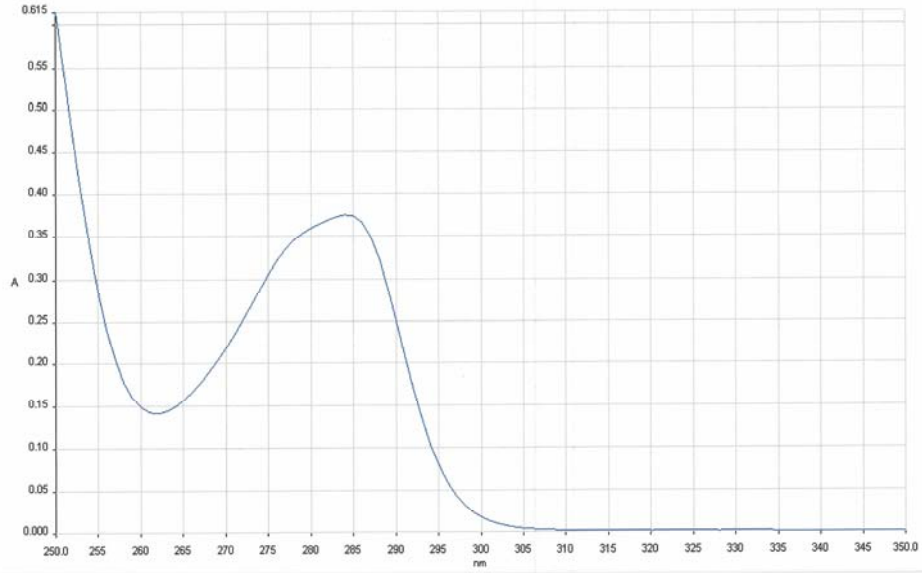
Yamagucci, K., Murakami, M., Nakano, H., Konosu, S., Kokura, T., Yamamoto, H., Kosaka, M., Hata, K., "Supercritical Carbon dioxide Extraction of Oils from Antarctic Krill" , *Journal Agriculturel Food Chemistry*, 10: 117-126 (1986).

Yang, Y., Gharaibeh, A., Hawthorne, S. B., Miller, J. D., “Combined Temperature/Modifier Effects on Supercritical CO₂ Extraction Efficiencies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Environmental Samples” , *Food Chemistry*, 67: 641-646, (1995).

Yoshida, S., Iso, S., Uno, S., Meguro, Y., Sasaki, T., “Pressure dependence of extraction behavior of plutonium(IV) and uranium(VI) from nitric acid solution to supercritical carbon dioxide containing tributylphosphate” , *Nuclear Energy*, 1: 101-106 (2000).

EKLER

EK-1. Adaçayı ekstraktının UV spektrofotometrik analiz grafiği



EK-2. 80 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

ta File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\ANTIOKSI.D

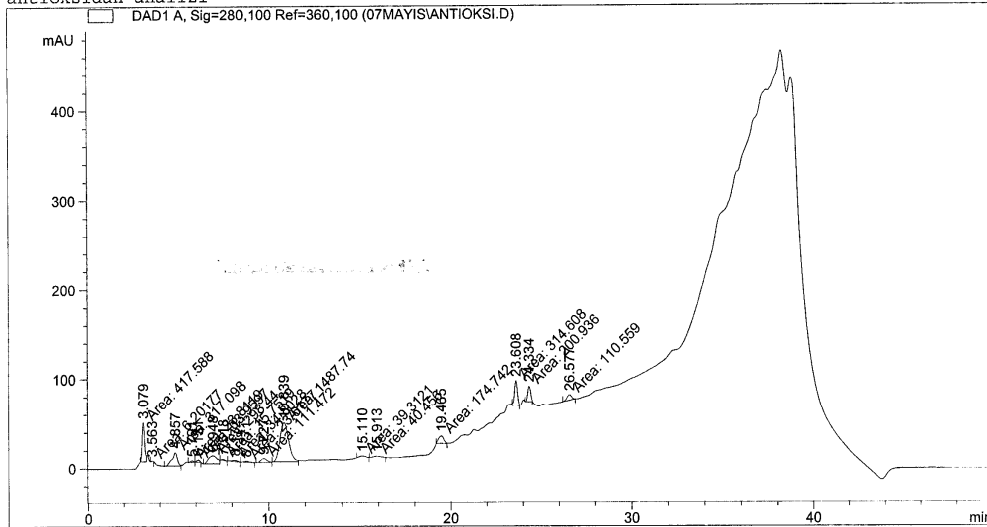
```

=====
Injection Date : 5/23/07 6:55:21 PM      Seq. Line : 1
Sample Name   :                          Vial : 52
Acq. Operator : I.OZGUR                   Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/23/07 6:55:08 PM by I.OZGUR
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/23/07 7:46:08 PM by I.OZGUR
               (modified after loading)
  
```

80 atm
Ekstrakt
pekeri

antioksidan analizi



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 3.079 | MM | 0.1597 | 417.58810 | 43.59241 | 11.4373 |
| 2 | 3.563 | MM | 0.1125 | 6.20177 | 9.18498e-1 | 0.1699 |
| 3 | 4.857 | MM | 0.3500 | 317.09821 | 15.10127 | 8.6850 |
| 4 | 5.791 | MF | 0.2218 | 23.81191 | 1.78908 | 0.6522 |
| 5 | 6.131 | FM | 0.2144 | 33.95970 | 2.63994 | 0.9301 |
| 6 | 6.948 | MM | 0.5540 | 298.43976 | 8.97801 | 8.1740 |
| 7 | 7.518 | MM | 0.2130 | 15.75189 | 1.23247 | 0.4314 |
| 8 | 8.172 | MM | 0.3823 | 34.80282 | 1.51733 | 0.9532 |
| 9 | 8.771 | MM | 0.3263 | 23.61774 | 1.20618 | 0.6469 |
| 10 | 9.727 | MM | 0.4133 | 111.47239 | 4.49525 | 3.0531 |
| 11 | 10.839 | MM | 0.5664 | 1487.74023 | 43.77832 | 40.7478 |
| 12 | 15.110 | MM | 0.2800 | 29.31034 | 1.76137 | 1.0767 |
| 13 | 15.913 | MM | 0.4903 | 40.45602 | 1.37520 | 1.1081 |

Instrument 1 5/23/07 7:51:11 PM I.OZGUR

Page 1 of 2

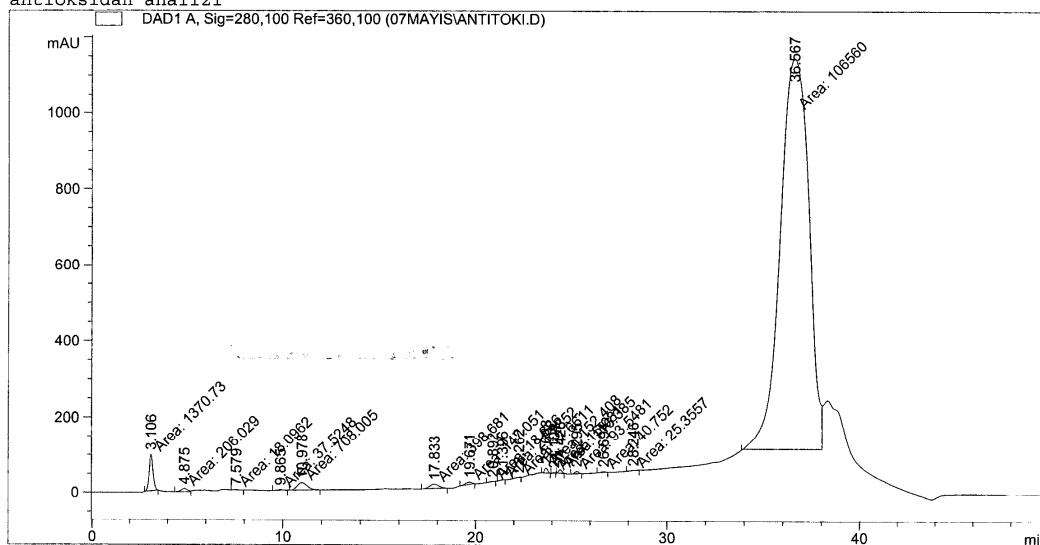
EK-3. 80 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\ANTITOKI.D

```

=====
Injection Date : 5/23/07 7:46:44 PM          Seq. Line : 2
Sample Name    :                               Vial : 52
Acq. Operator  : I.OZGUR                      Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/23/07 7:46:08 PM by I.OZGUR
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/24/07 8:18:17 AM by I.OZGUR
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|--------|
| 1 | 3.106 | MM | 0.2358 | 1370.73425 | 96.88104 | 1.2467 |
| 2 | 4.875 | MM | 0.3894 | 206.02872 | 8.81758 | 0.1874 |
| 3 | 7.579 | MM | 0.2878 | 18.09620 | 1.04794 | 0.0165 |
| 4 | 9.865 | MM | 0.3687 | 37.52480 | 1.69610 | 0.0341 |
| 5 | 10.978 | MM | 0.6071 | 708.00458 | 19.43674 | 0.6439 |
| 6 | 17.833 | MM | 0.5770 | 398.68106 | 11.51570 | 0.3626 |
| 7 | 19.671 | MM | 0.3899 | 147.05057 | 6.28560 | 0.1337 |
| 8 | 20.892 | MM | 0.2933 | 18.88604 | 1.07307 | 0.0172 |
| 9 | 21.396 | MM | 0.2078 | 21.73516 | 1.74357 | 0.0198 |
| 10 | 22.262 | MM | 0.3286 | 17.66108 | 8.95694e-1 | 0.0161 |
| 11 | 23.688 | MM | 0.1903 | 152.40833 | 13.34834 | 0.1386 |
| 12 | 24.104 | MM | 0.1371 | 15.08104 | 1.83302 | 0.0137 |
| 13 | 24.426 | MM | 0.2097 | 116.38544 | 9.25110 | 0.1059 |
| 14 | 25.295 | MM | 0.2490 | 93.54809 | 6.26276 | 0.0851 |

Instrument 1 5/24/07 6:13:00 AM I.OZGUR

EK-4. 85 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

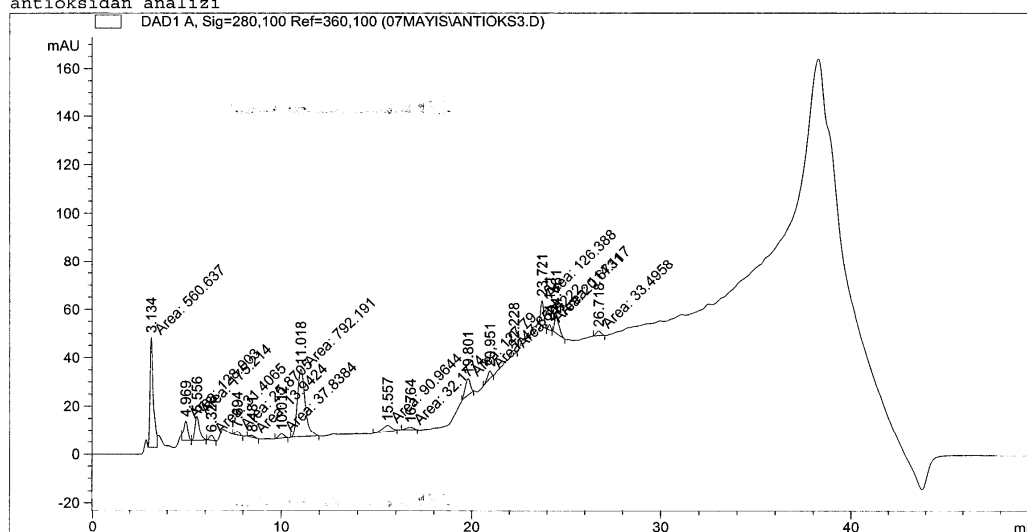
File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\ANTIOKS3.D

```

=====
Injection Date : 5/23/07 10:20:42 PM      Seq. Line : 5
Sample Name   :                          Vial : 54
Acq. Operator : I.OZGUR                   Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/23/07 10:20:06 PM by I.OZGUR
               (modified after loading)

Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/24/07 8:18:17 AM by I.OZGUR
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 3.134 | MM | 0.2039 | 560.63715 | 45.82258 | 23.4990 |
| 2 | 4.969 | MM | 0.2578 | 128.00258 | 8.27514 | 5.3652 |
| 3 | 5.556 | MM | 0.2863 | 175.21397 | 10.19917 | 7.3441 |
| 4 | 6.328 | MM | 0.2468 | 31.40647 | 2.12091 | 1.3164 |
| 5 | 7.694 | MM | 0.2585 | 25.87046 | 1.66774 | 1.0844 |
| 6 | 8.481 | MM | 0.3041 | 13.94236 | 7.64073e-1 | 0.5844 |
| 7 | 10.012 | MM | 0.3462 | 37.83840 | 1.82136 | 1.5860 |
| 8 | 11.018 | MM | 0.4726 | 792.19141 | 27.93852 | 33.2046 |
| 9 | 15.557 | MM | 0.5793 | 90.96442 | 2.61709 | 3.8128 |
| 10 | 16.764 | MM | 0.4745 | 32.17739 | 1.13034 | 1.3487 |
| 11 | 19.801 | MM | 0.3173 | 127.78981 | 6.71210 | 5.3563 |
| 12 | 20.951 | MM | 0.2417 | 47.85940 | 3.30085 | 2.0060 |
| 13 | 22.228 | MM | 0.2672 | 27.22202 | 1.69807 | 1.1410 |
| 14 | 23.721 | MM | 0.1981 | 126.38814 | 10.63129 | 5.2975 |

Instrument 1 5/24/07 6:09:54 PM I.OZGUR

Page 1 of 2

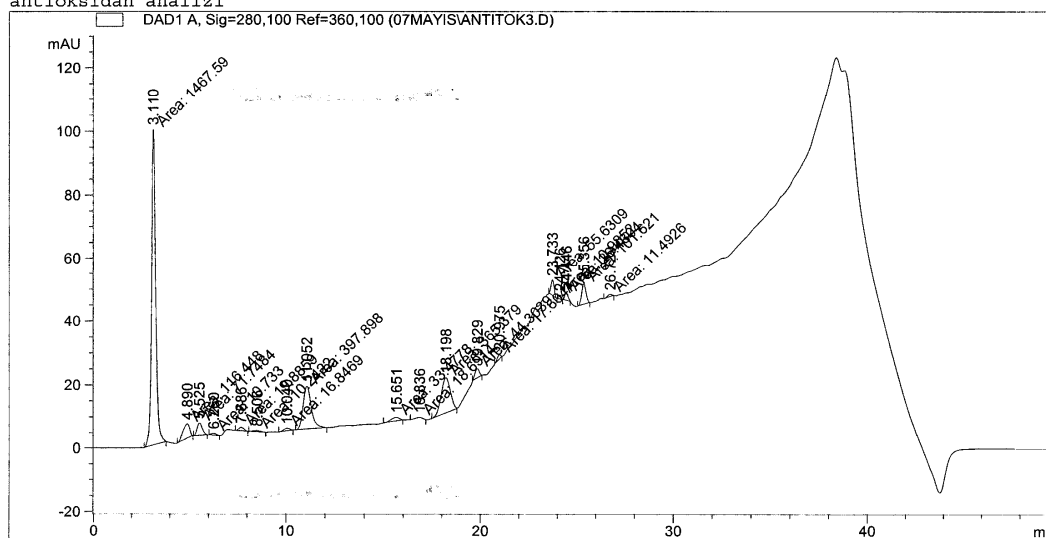
EK-5. 85 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\ANTITOK3.D

```

=====
Injection Date : 5/23/07 11:12:01 PM      Seq. Line :    6
Sample Name   :                          Vial :   55
Acq. Operator : I.OZGUR                   Inj :    1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/23/07 11:11:27 PM by I.OZGUR
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 8:18:17 AM by I.OZGUR
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 2.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|----------|
| 1 | 3.110 | MM | 0.2452 | 1467.58777 | 99.74568 | 104.9399 |
| 2 | 4.890 | MM | 0.4091 | 116.44761 | 4.74366 | 8.3266 |
| 3 | 5.525 | MM | 0.3033 | 71.74033 | 3.91736 | 5.1304 |
| 4 | 6.260 | MM | 0.3072 | 10.73302 | 5.82325e-1 | 0.7675 |
| 5 | 7.686 | MM | 0.2999 | 19.88590 | 1.10525 | 1.4219 |
| 6 | 8.506 | MM | 0.4455 | 10.24220 | 3.83166e-1 | 0.7324 |
| 7 | 10.040 | MM | 0.3508 | 16.84690 | 8.00298e-1 | 1.2046 |
| 8 | 11.052 | MM | 0.4914 | 397.89828 | 13.49662 | 28.4517 |
| 9 | 15.651 | MM | 0.3800 | 33.47778 | 1.10659 | 2.3938 |
| 10 | 16.836 | MM | 0.4495 | 18.69137 | 6.93079e-1 | 1.3365 |
| 11 | 18.198 | MM | 0.5538 | 365.37921 | 10.99710 | 26.1264 |
| 12 | 19.829 | MM | 0.2593 | 44.30390 | 2.84772 | 3.1680 |
| 13 | 20.975 | MM | 0.2115 | 17.60472 | 1.38708 | 1.2588 |
| 14 | 23.733 | MM | 0.1880 | 55.63089 | 4.93056 | 3.9779 |

Instrument 1 5/24/07 6:22:18 PM I.OZGUR

Page 1 of 2

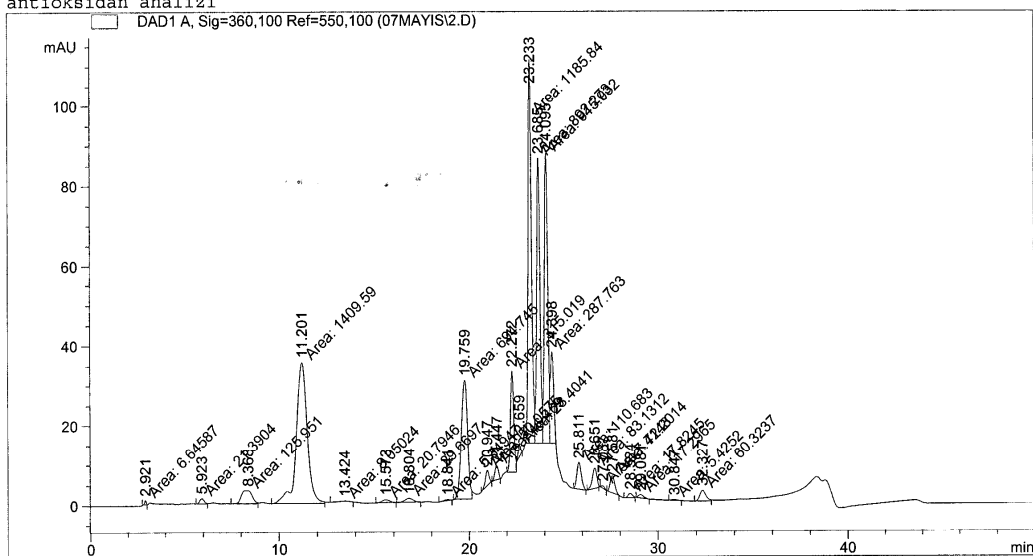
EK-6. 75 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\2.D

```

=====
Injection Date : 5/24/07 8:11:33 PM          Seq. Line : 3
Sample Name    :                               Vial : 43
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 8:12:05 PM by D.SENSOY
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 2.921 | MM | 0.1080 | 6.64587 | 1.02580 | 0.1035 |
| 2 | 5.923 | MM | 0.2775 | 21.39040 | 1.28481 | 0.3333 |
| 3 | 8.368 | MM | 0.6553 | 125.95093 | 3.20359 | 1.9624 |
| 4 | 11.201 | MM | 0.6642 | 1409.58765 | 35.37041 | 21.9622 |
| 5 | 13.424 | MM | 0.5667 | 8.05024 | 2.36760e-1 | 0.1254 |
| 6 | 15.573 | MM | 0.4814 | 20.79456 | 7.19866e-1 | 0.3240 |
| 7 | 16.804 | MM | 0.3201 | 20.60000 | 9.50729e-1 | 0.4623 |
| 8 | 18.841 | MM | 0.3798 | 5.34947 | 2.34760e-1 | 0.0833 |
| 9 | 19.759 | MM | 0.3867 | 694.74530 | 29.94473 | 10.8246 |
| 10 | 20.947 | MM | 0.2198 | 50.05746 | 3.79613 | 0.7799 |
| 11 | 21.447 | MM | 0.2190 | 46.46902 | 3.53567 | 0.7240 |
| 12 | 22.272 | MM | 0.2057 | 315.01855 | 25.51857 | 4.9082 |
| 13 | 22.659 | MM | 0.1574 | 28.40413 | 3.00681 | 0.4426 |
| 14 | 23.233 | MF | 0.2050 | 1185.83545 | 96.38918 | 18.4760 |

strument 1 5/29/07 9:56:14 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

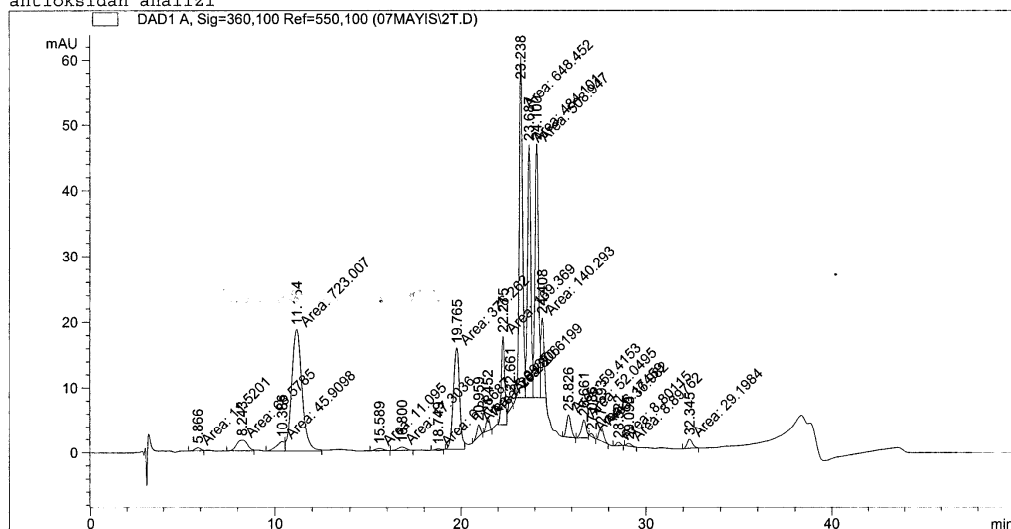
EK-7. 75 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\2T.D

```

=====
Injection Date : 5/24/07 9:02:51 PM          Seq. Line : 4
Sample Name   :                               Vial : 44
Acq. Operator : D.SENSOY                      Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 9:02:17 PM by D.SENSOY
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.866 | MM | 0.3738 | 11.52011 | 5.13687e-1 | 0.3304 |
| 2 | 8.243 | MM | 0.6933 | 68.57851 | 1.64861 | 1.9669 |
| 3 | 10.386 | MF | 0.5230 | 45.90985 | 1.46304 | 1.3167 |
| 4 | 11.164 | FM | 0.6459 | 723.00684 | 18.65776 | 20.7365 |
| 5 | 15.589 | MM | 0.4959 | 11.09497 | 3.72895e-1 | 0.3182 |
| 6 | 16.800 | MM | 0.5271 | 17.30357 | 5.47178e-1 | 0.4963 |
| 7 | 18.749 | MM | 0.4333 | 6.28687 | 2.41822e-1 | 0.1803 |
| 8 | 19.765 | MM | 0.4016 | 376.26196 | 15.61618 | 10.7915 |
| 9 | 20.959 | MM | 0.2173 | 25.09375 | 1.92493 | 0.7197 |
| 10 | 21.452 | MM | 0.2188 | 28.28064 | 2.15376 | 0.8111 |
| 11 | 22.275 | MM | 0.2100 | 169.36945 | 13.44479 | 4.8577 |
| 12 | 22.661 | MM | 0.1645 | 20.61989 | 2.08942 | 0.5914 |
| 13 | 23.238 | MF | 0.2075 | 648.45233 | 52.07331 | 18.5982 |
| 14 | 23.687 | MF | 0.2097 | 484.10144 | 38.46864 | 13.8845 |

Instrument 1 5/29/07 9:59:32 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

EK-8. 80 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

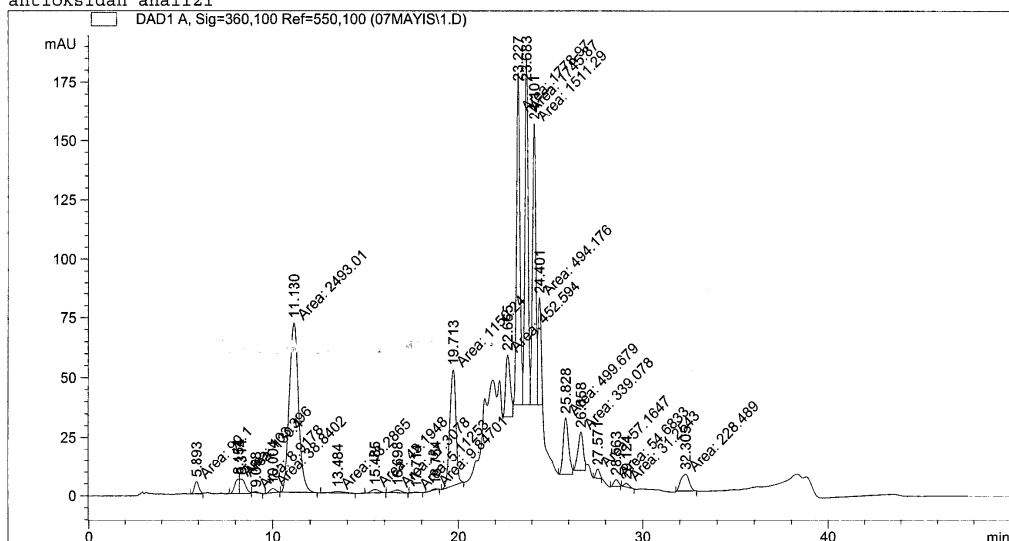
File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\1.D

```

=====
Injection Date : 5/24/07 6:29:01 PM          Seq. Line : 1
Sample Name    :                               Vial : 41
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 6:27:44 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```

80



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.893 | MM | 0.2876 | 90.09998 | 5.22153 | 0.7947 |
| 2 | 8.154 | MF | 0.2832 | 103.39582 | 6.08431 | 0.9120 |
| 3 | 8.314 | FM | 0.3586 | 130.40044 | 6.06023 | 1.1502 |
| 4 | 9.098 | MM | 0.2893 | 8.91780 | 5.13709e-1 | 0.0787 |
| 5 | 10.004 | MM | 0.3724 | 38.84023 | 1.73843 | 0.3426 |
| 6 | 11.130 | MM | 0.5815 | 2493.00513 | 71.45683 | 21.9902 |
| 7 | 13.484 | MM | 0.9403 | 33.28651 | 5.89995e-1 | 0.2936 |
| 8 | 15.485 | MM | 0.5083 | 43.19476 | 1.41629 | 0.3810 |
| 9 | 16.698 | MM | 0.5497 | 37.30780 | 1.13118 | 0.3291 |
| 10 | 17.714 | MM | 0.3875 | 5.11253 | 2.19912e-1 | 0.0451 |
| 11 | 18.754 | MM | 0.3478 | 9.84701 | 4.71872e-1 | 0.0869 |
| 12 | 19.713 | MM | 0.3903 | 1150.23657 | 49.12103 | 10.1460 |
| 13 | 22.665 | MM | 0.2920 | 452.59351 | 25.83016 | 3.9922 |
| 14 | 23.227 | MF | 0.2111 | 1778.97327 | 140.46875 | 15.6919 |
| 15 | 23.683 | MF | 0.1983 | 1745.86646 | 146.74623 | 15.3999 |

strument 1 5/29/07 9:46:13 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

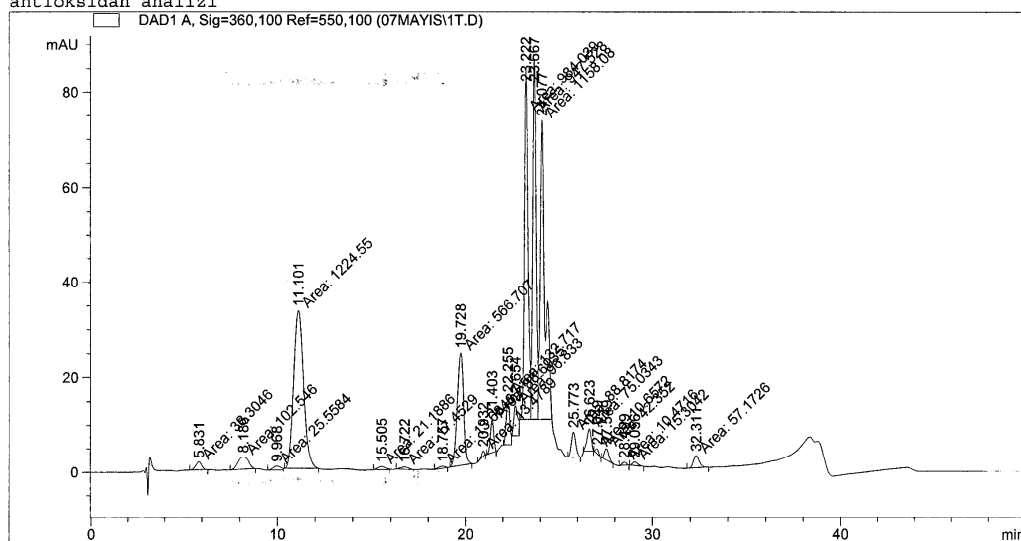
EK-9. 80 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\1T.D

```

=====
Injection Date : 5/24/07 7:20:16 PM      Seq. Line : 2
Sample Name    :                          Vial      : 42
Acq. Operator  : D.SENSOY                 Inj       : 1
                                           Inj Volume: 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 6:27:44 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.831 | MM | 0.3809 | 38.30459 | 1.67605 | 0.6684 |
| 2 | 8.186 | MM | 0.3525 | 132.54200 | 2.62027 | 1.7893 |
| 3 | 9.968 | MM | 0.4848 | 25.55842 | 8.78692e-1 | 0.4460 |
| 4 | 11.101 | MM | 0.6148 | 1224.55249 | 33.19518 | 21.3665 |
| 5 | 15.505 | MM | 0.5079 | 21.18858 | 6.95336e-1 | 0.3697 |
| 6 | 16.722 | MM | 0.5312 | 17.45290 | 5.47558e-1 | 0.3045 |
| 7 | 18.757 | MM | 0.4574 | 13.68462 | 4.98651e-1 | 0.2388 |
| 8 | 19.728 | MM | 0.3980 | 566.70691 | 23.73053 | 9.8882 |
| 9 | 20.932 | MM | 0.1886 | 13.47889 | 1.19126 | 0.2352 |
| 10 | 21.403 | MM | 0.2113 | 88.69348 | 6.99526 | 1.5476 |
| 11 | 22.255 | MM | 0.2157 | 132.71719 | 10.25509 | 2.3157 |
| 12 | 22.654 | MM | 0.2548 | 96.83301 | 6.33448 | 1.6896 |
| 13 | 23.222 | MF | 0.2220 | 984.03937 | 73.86053 | 17.1700 |
| 14 | 23.667 | MF | 0.2080 | 947.52844 | 75.92838 | 16.5329 |
| 15 | 24.077 | FM | 0.3074 | 1158.07812 | 62.79840 | 20.2067 |

Instrument 1 5/29/07 9:51:17 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

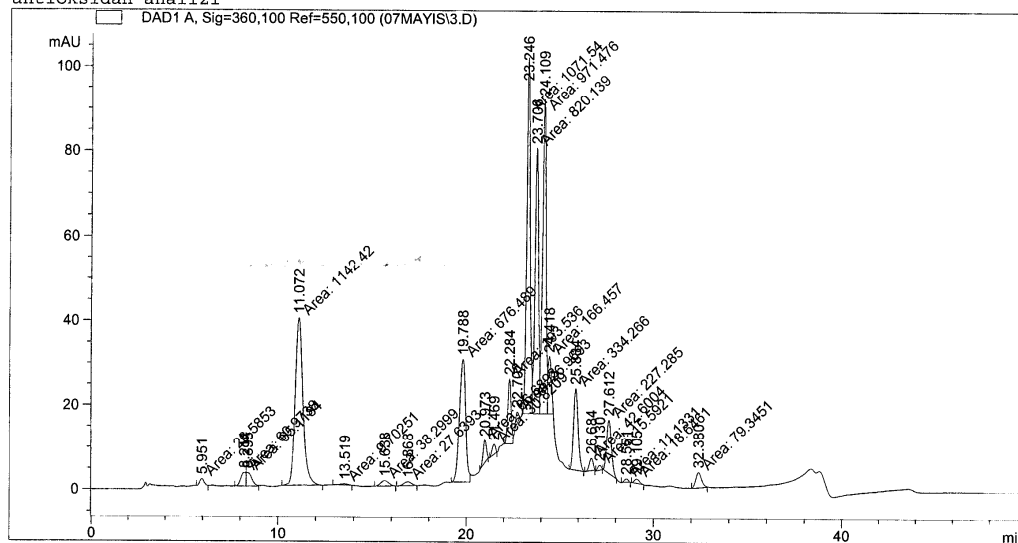
EK-10. 85 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\3.D

```

=====
Injection Date   : 5/24/07 9:54:10 PM           Seq. Line :    5
Sample Name     :                               Vial    :   45
Acq. Operator   : D.SENSOY                     Inj      :    1
                                           Inj Volume: 10 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed    : 5/24/07 9:53:35 PM by D.SENSOY
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed    : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.951 | MM | 0.2667 | 26.58533 | 1.66135 | 0.4341 |
| 2 | 8.214 | MF | 0.3132 | 60.97377 | 3.24479 | 0.9957 |
| 3 | 8.395 | FM | 0.3408 | 65.11841 | 3.18466 | 1.0634 |
| 4 | 11.072 | MM | 0.4795 | 1142.42346 | 39.71001 | 18.6557 |
| 5 | 13.519 | MM | 0.5191 | 9.70251 | 3.11496e-1 | 0.1584 |
| 6 | 15.638 | MM | 0.4987 | 38.29988 | 1.28001 | 0.6254 |
| 7 | 16.868 | MM | 0.4785 | 27.63928 | 9.62639e-1 | 0.4513 |
| 8 | 19.788 | MM | 0.3871 | 676.48901 | 29.12293 | 11.0470 |
| 9 | 20.973 | MM | 0.2047 | 66.68935 | 5.43002 | 1.0890 |
| 10 | 21.469 | MM | 0.2143 | 30.82090 | 2.39654 | 0.5033 |
| 11 | 22.284 | MM | 0.2095 | 193.53578 | 15.47004 | 3.1604 |
| 12 | 22.702 | MM | 0.1642 | 26.96926 | 2.73795 | 0.4404 |
| 13 | 23.246 | MF | 0.2124 | 1071.54224 | 84.06502 | 17.4982 |
| 14 | 23.706 | MF | 0.2183 | 820.13922 | 62.61212 | 13.3928 |

Instrument 1 5/29/07 10:16:10 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

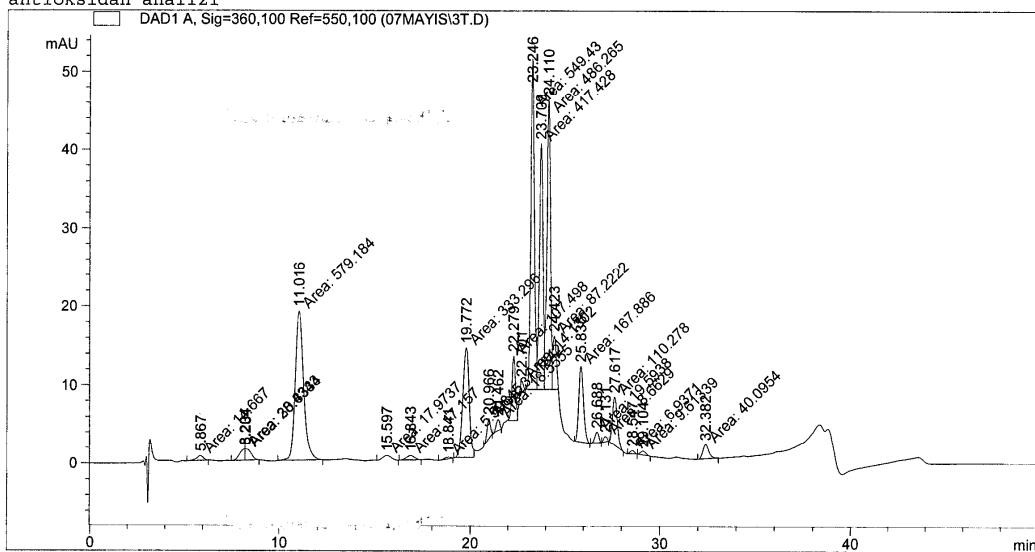
EK-11. 85 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\3T.D

```

=====
Injection Date : 5/24/07 10:45:27 PM          Seq. Line : 6
Sample Name   :                               Vial : 46
Acq. Operator : D.SENSOY                      Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 10:46:00 PM by D.SENSOY
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.867 | MM | 0.4129 | 14.66695 | 5.92066e-1 | 0.4728 |
| 2 | 8.204 | MF | 0.3298 | 28.43434 | 1.43694 | 0.9167 |
| 3 | 8.234 | FM | 0.3562 | 30.83338 | 1.44271 | 0.9940 |
| 4 | 11.016 | MM | 0.5004 | 18.98610 | 18.98610 | 18.6718 |
| 5 | 15.597 | MM | 0.5029 | 17.97366 | 5.95622e-1 | 0.5794 |
| 6 | 16.843 | MM | 0.5054 | 17.15701 | 5.65804e-1 | 0.5531 |
| 7 | 18.841 | MM | 0.3178 | 5.59845 | 2.15677e-1 | 0.1805 |
| 8 | 19.772 | MM | 0.3968 | 333.29642 | 14.00023 | 10.7448 |
| 9 | 20.966 | MM | 0.2025 | 31.18418 | 2.56613 | 1.0053 |
| 10 | 21.462 | MM | 0.2216 | 18.55546 | 1.39539 | 0.5982 |
| 11 | 22.279 | MM | 0.2192 | 107.49787 | 8.17480 | 3.4655 |
| 12 | 22.701 | MM | 0.1608 | 14.13024 | 1.46488 | 0.4555 |
| 13 | 23.246 | MF | 0.2170 | 549.42975 | 42.19851 | 17.7126 |
| 14 | 23.709 | MF | 0.2221 | 417.42789 | 31.31729 | 13.4571 |

Instrument 1 5/29/07 10:19:23 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

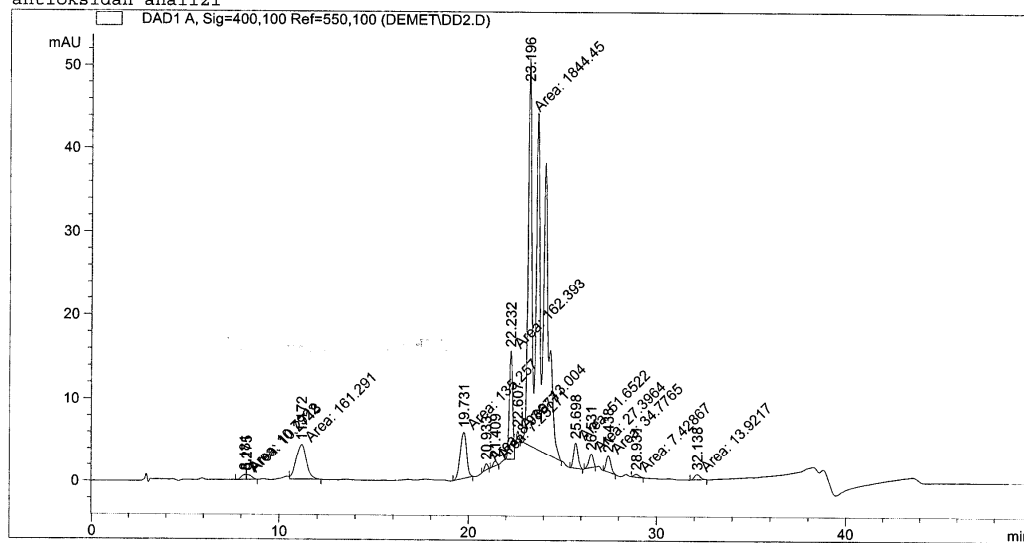
EK-12. 75 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

ca file C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DD2.D

```

=====
Injection Date : 5/30/07 7:03:15 PM          Seq. Line : 3
Sample Name    :                               Vial : 3
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 8:27:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 8.181 | MF | 0.3090 | 10.79219 | 5.82064e-1 | 0.4336 |
| 2 | 8.275 | FM | 0.3030 | 10.27178 | 5.64972e-1 | 0.4127 |
| 3 | 11.172 | MM | 0.6315 | 161.29062 | 4.25661 | 6.4806 |
| 4 | 19.731 | MM | 0.3977 | 135.25723 | 5.66893 | 5.4346 |
| 5 | 20.933 | MM | 0.1948 | 8.93677 | 7.64585e-1 | 0.3591 |
| 6 | 21.409 | MM | 0.2133 | 7.25271 | 5.66576e-1 | 0.2914 |
| 7 | 22.232 | MM | 0.2078 | 162.39301 | 13.02430 | 6.5249 |
| 8 | 22.607 | MM | 0.1454 | 13.00404 | 1.49033 | 0.5225 |
| 9 | 23.196 | MM | 0.6625 | 1844.45337 | 46.39803 | 74.1093 |
| 10 | 25.698 | MM | 0.2729 | 51.65223 | 3.15461 | 2.0754 |
| 11 | 26.531 | MM | 0.2661 | 27.39643 | 1.71596 | 1.1008 |
| 12 | 27.438 | MM | 0.2922 | 34.77647 | 1.98352 | 1.3973 |
| 13 | 28.931 | MM | 0.3462 | 7.42867 | 3.57632e-1 | 0.2985 |
| 14 | 32.138 | MM | 0.3608 | 13.92173 | 6.43157e-1 | 0.5594 |

trument 1 5/31/07 8:48:24 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

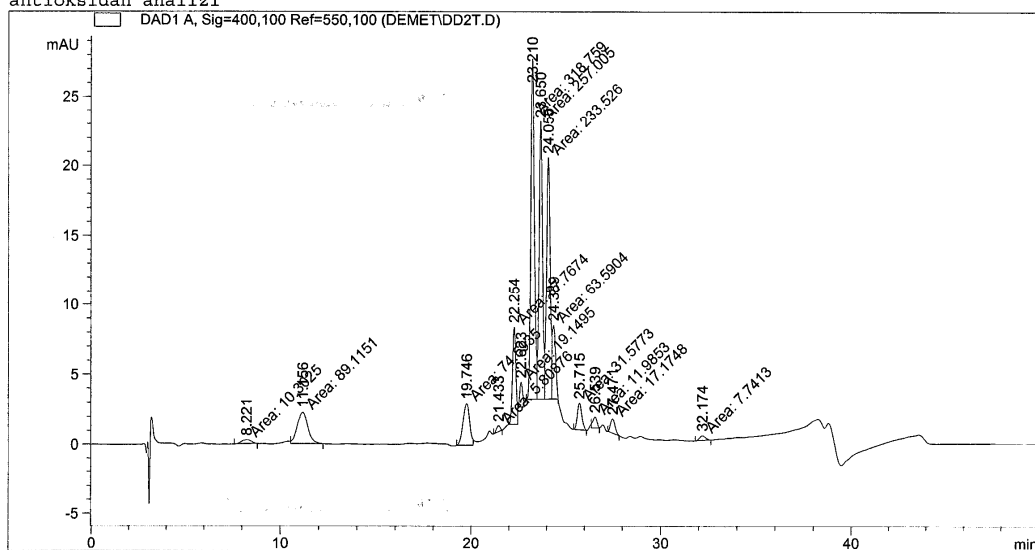
EK-13. 75 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

ta File C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DD2T.D

```

=====
Injection Date : 5/30/07 7:54:33 PM          Seq. Line : 4
Sample Name    :                               Vial : 4
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 8:27:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 8.221 | MM | 0.6130 | 10.30253 | 2.80123e-1 | 0.8389 |
| 2 | 11.156 | MM | 0.6517 | 89.11514 | 2.27907 | 7.2564 |
| 3 | 19.746 | MM | 0.1270 | 71.59351 | 2.98112 | 6.0739 |
| 4 | 21.433 | MM | 0.2323 | 5.80876 | 4.16726e-1 | 0.4730 |
| 5 | 22.254 | MM | 0.2105 | 87.76737 | 6.94758 | 7.1466 |
| 6 | 22.623 | MM | 0.1789 | 19.14952 | 1.78395 | 1.5593 |
| 7 | 23.210 | MF | 0.2169 | 318.75925 | 24.49189 | 25.9556 |
| 8 | 23.650 | MF | 0.2144 | 257.00473 | 19.97637 | 20.9271 |
| 9 | 24.055 | MF | 0.2243 | 233.52576 | 17.35009 | 19.0153 |
| 10 | 24.339 | FM | 0.2017 | 63.59042 | 5.25538 | 5.1780 |
| 11 | 25.715 | MM | 0.2769 | 31.57730 | 1.90048 | 2.5712 |
| 12 | 26.539 | MM | 0.2507 | 11.98527 | 7.96796e-1 | 0.9759 |
| 13 | 27.471 | MM | 0.2803 | 17.17478 | 1.02134 | 1.3985 |
| 14 | 32.174 | MM | 0.3528 | 7.74130 | 3.65695e-1 | 0.6303 |

strument 1 5/31/07 9:28:37 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

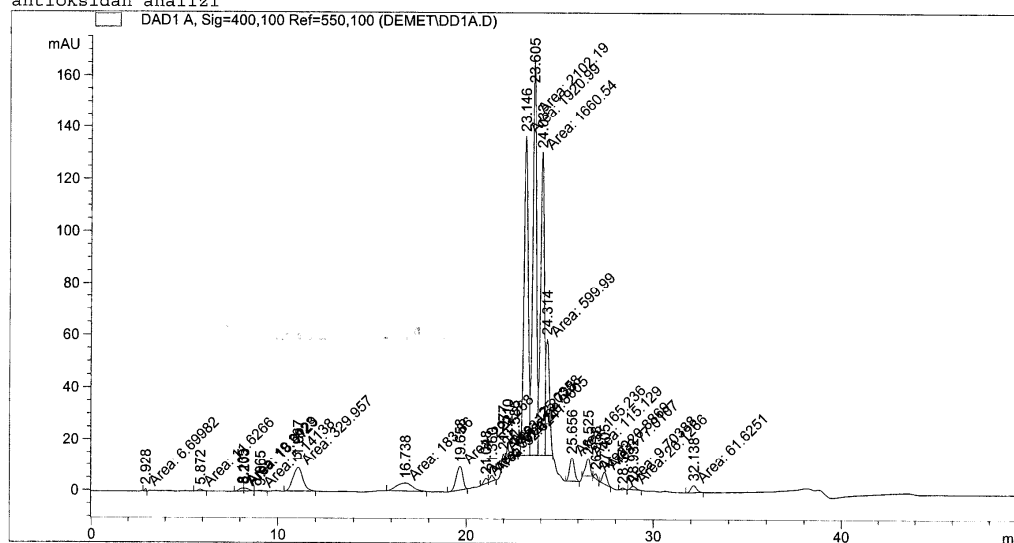
EK-14. 80 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DD1A.D

```

=====
Injection Date : 5/30/07 5:20:43 PM          Seq. Line : 1
Sample Name    :                               Vial : 1
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/30/07 8:27:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 2.928 | MM | 0.1228 | 6.69982 | 9.09424e-1 | 0.0872 |
| 2 | 5.872 | MM | 0.2782 | 11.62664 | 6.96476e-1 | 0.1513 |
| 3 | 8.135 | MF | 0.2936 | 19.30232 | 1.09558 | 0.2512 |
| 4 | 8.203 | FM | 0.2937 | 18.91294 | 1.07342 | 0.2462 |
| 5 | 9.065 | MM | 0.3306 | 5.14138 | 2.59233e-1 | 0.0669 |
| 6 | 11.067 | MM | 0.6046 | 329.95712 | 9.09542 | 4.2945 |
| 7 | 16.738 | MM | 1.0028 | 183.85953 | 3.05582 | 2.3930 |
| 8 | 19.658 | MM | 0.4073 | 222.26756 | 9.09516 | 2.8929 |
| 9 | 21.048 | MF | 0.2458 | 30.27234 | 2.05247 | 0.3940 |
| 10 | 21.360 | FM | 0.2298 | 32.62414 | 2.36585 | 0.4246 |
| 11 | 21.977 | MM | 0.1054 | 17.27277 | 2.73163 | 0.2248 |
| 12 | 22.210 | MM | 0.1262 | 25.03577 | 3.30726 | 0.3258 |
| 13 | 22.585 | MM | 0.1635 | 20.86055 | 2.12658 | 0.2715 |
| 14 | 23.146 | MF | 0.2611 | 1920.98828 | 122.61983 | 25.0023 |
| 15 | 23.605 | MF | 0.2500 | 152.33038 | 152.33038 | 27.3606 |

Printed: 5/31/07 8:33:12 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

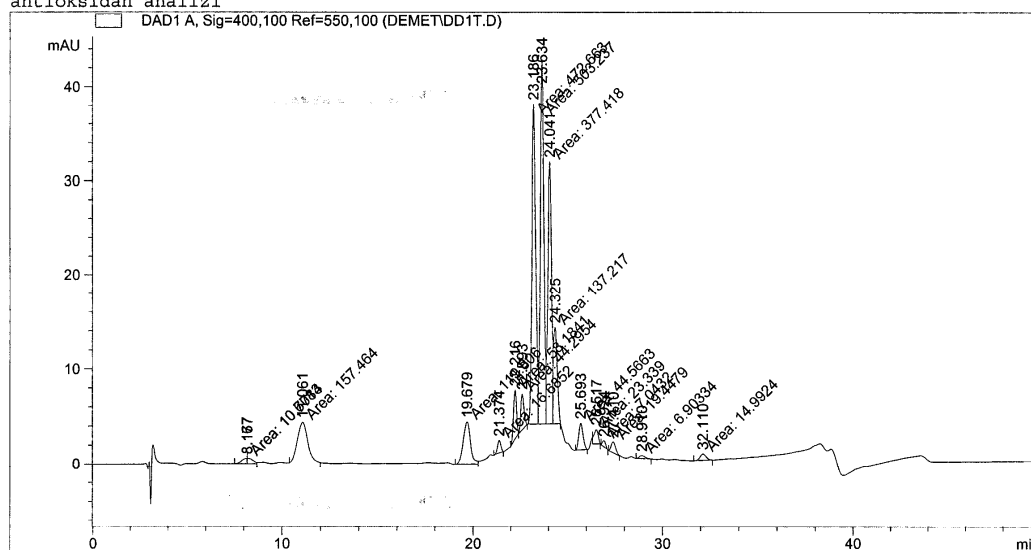
EK-15. 80 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DD1T.D

```

=====
Injection Date : 5/30/07 6:11:59 PM          Seq. Line : 2
Sample Name    :                               Vial : 2
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 8:27:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 8.167 | MF | 0.3290 | 10.60832 | 5.37331e-1 | 0.5240 |
| 2 | 8.177 | FM | 0.3338 | 10.77141 | 5.37768e-1 | 0.5320 |
| 3 | 11.061 | MM | 0.6169 | 157.46420 | 4.24022 | 7.7774 |
| 4 | 19.679 | MM | 0.4506 | 119.80598 | 4.43087 | 5.9174 |
| 5 | 21.374 | MM | 0.2093 | 16.68523 | 1.32839 | 0.8241 |
| 6 | 22.216 | MM | 0.1874 | 58.18414 | 5.17540 | 2.8738 |
| 7 | 22.593 | MM | 0.1950 | 44.29536 | 3.78542 | 2.1878 |
| 8 | 23.186 | MF | 0.2318 | 472.66327 | 33.97985 | 23.3455 |
| 9 | 23.634 | MF | 0.2169 | 503.23703 | 38.67595 | 24.8556 |
| 10 | 24.041 | MF | 0.2262 | 377.41797 | 27.80809 | 18.6412 |
| 11 | 24.325 | FM | 0.2253 | 137.21741 | 10.15252 | 6.7774 |
| 12 | 25.693 | MM | 0.2671 | 44.56625 | 2.78107 | 2.2012 |
| 13 | 26.517 | MM | 0.2556 | 23.33903 | 1.52165 | 1.1527 |
| 14 | 26.924 | MM | 0.1892 | 7.04320 | 6.20506e-1 | 0.3479 |
| 15 | 27.410 | MM | 0.2814 | 19.44786 | 1.15181 | 0.9606 |

Instrument 1 5/31/07 8:46:15 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

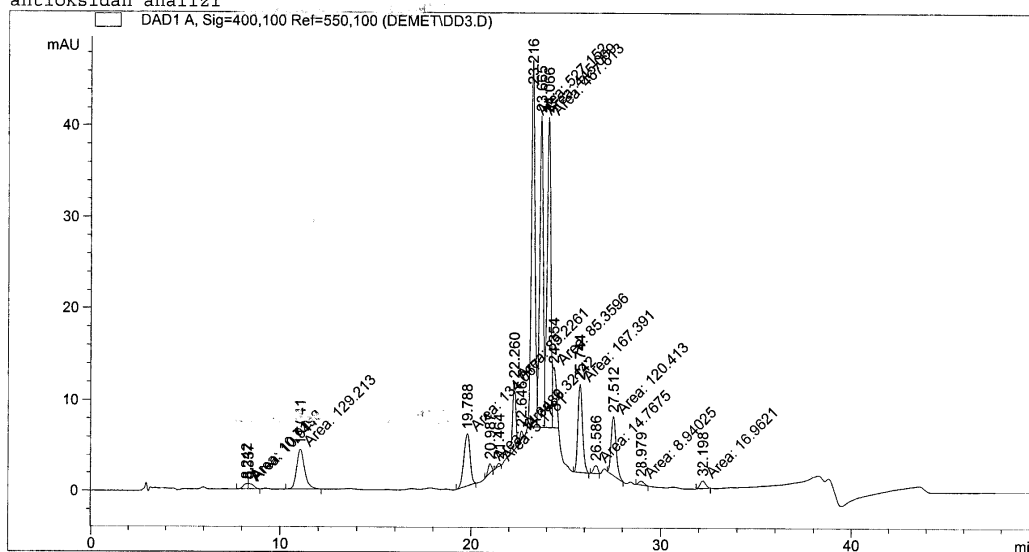
EK-16. 85 bar süperkritik CO₂ ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DD3.D

```

=====
Injection Date : 5/30/07 9:37:06 PM          Seq. Line : 6
Sample Name    :                               Vial : 6
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/30/07 8:27:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 8.242 | MF | 0.2988 | 10.71985 | 5.98031e-1 | 0.4759 |
| 2 | 8.337 | FM | 0.3137 | 10.94136 | 5.81361e-1 | 0.4857 |
| 3 | 11.041 | MM | 0.4827 | 129.21324 | 4.46105 | 5.7361 |
| 4 | 19.788 | MM | 0.3860 | 134.06702 | 5.78835 | 5.9516 |
| 5 | 20.987 | MM | 0.2022 | 14.34861 | 1.18284 | 0.6370 |
| 6 | 21.464 | MM | 0.2264 | 5.17810 | 3.81264e-1 | 0.2299 |
| 7 | 22.260 | MM | 0.1918 | 85.22606 | 7.40726 | 3.7834 |
| 8 | 22.646 | MM | 0.1517 | 9.32142 | 1.02384 | 0.4138 |
| 9 | 23.216 | MF | 0.2188 | 527.15167 | 40.15812 | 23.4017 |
| 10 | 23.665 | MF | 0.2172 | 445.00879 | 34.15376 | 19.7551 |
| 11 | 24.066 | MF | 0.2290 | 467.61288 | 34.02559 | 20.7586 |
| 12 | 24.354 | FM | 0.2171 | 85.35957 | 6.55389 | 3.7893 |
| 13 | 25.744 | MM | 0.2873 | 167.39090 | 9.71036 | 7.4309 |
| 14 | 26.586 | MM | 0.2400 | 14.76751 | 1.02552 | 0.6556 |
| 15 | 27.512 | MM | 0.3088 | 120.41277 | 6.49912 | 5.3454 |

Printed 1 5/31/07 9:38:45 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

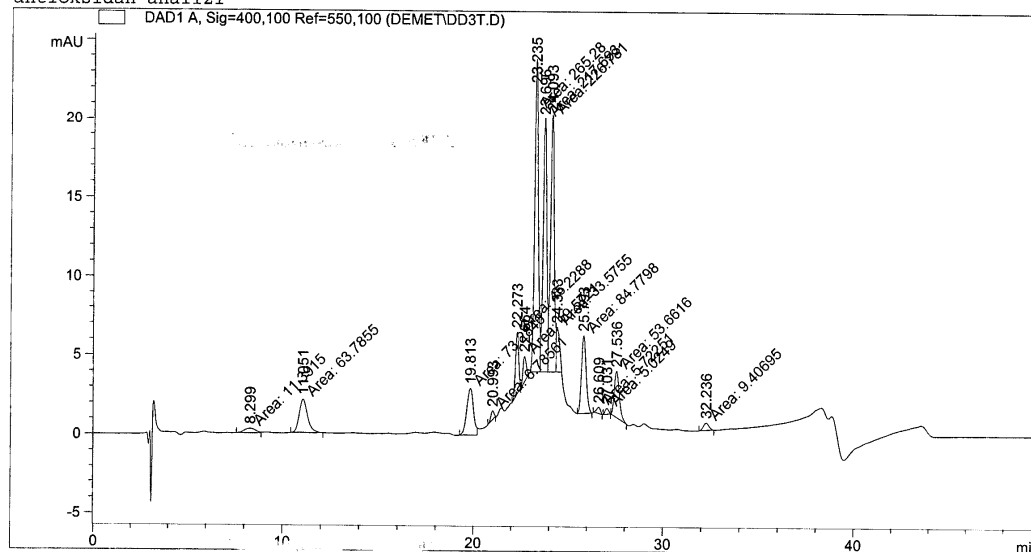
EK-17. 85 bar süperkritik CO₂ ekstraktının alfa tokoferollu 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

La file C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DD3T.D

```

=====
Injection Date : 5/30/07 10:28:22 PM          Seq. Line : 7
Sample Name    :                               Vial       : 7
Acq. Operator  : D.SENSOY                      Inj        : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/30/07 8:27:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 8.299 | MM | 0.6765 | 11.39150 | 2.80662e-1 | 1.0153 |
| 2 | 11.051 | MM | 0.5060 | 63.78551 | 2.10101 | 5.6851 |
| 3 | 19.813 | MM | 0.4157 | 73.28457 | 2.93838 | 6.5318 |
| 4 | 20.993 | MM | 0.2011 | 6.78561 | 5.62483e-1 | 0.6048 |
| 5 | 22.273 | MM | 0.1600 | 15.22876 | 3.92127 | 4.0312 |
| 6 | 22.664 | MM | 0.1997 | 19.57209 | 1.63325 | 1.7444 |
| 7 | 23.235 | MF | 0.2228 | 265.27982 | 19.84875 | 23.6440 |
| 8 | 23.696 | MF | 0.2256 | 217.69273 | 16.08423 | 19.4027 |
| 9 | 24.093 | MF | 0.2312 | 226.78148 | 16.34976 | 20.2127 |
| 10 | 24.383 | FM | 0.1991 | 33.57552 | 2.81003 | 2.9925 |
| 11 | 25.793 | MM | 0.2874 | 84.77977 | 4.91566 | 7.5563 |
| 12 | 26.609 | MM | 0.2353 | 5.72251 | 4.05329e-1 | 0.5100 |
| 13 | 27.031 | MM | 0.2209 | 5.02490 | 3.79111e-1 | 0.4479 |
| 14 | 27.536 | MM | 0.3065 | 53.66164 | 2.91806 | 4.7828 |
| 15 | 32.236 | MM | 0.3373 | 9.40695 | 4.64853e-1 | 0.8384 |

Instrument 1 5/31/07 9:50:22 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

EK-18. Soksile ekstraktının 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

a File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\SOXHILET.D

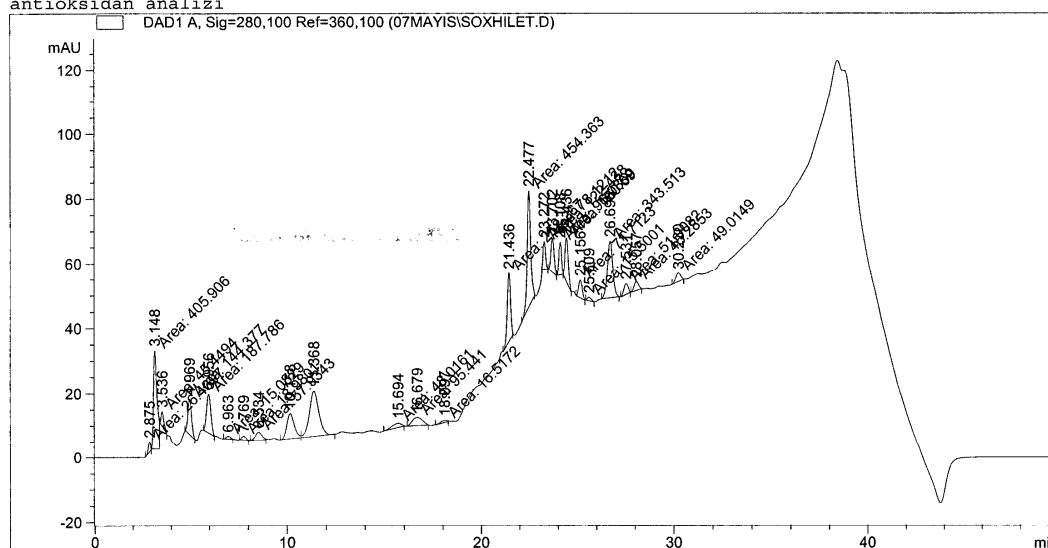
```

=====
Injection Date : 5/24/07 12:03:20 AM      Seq. Line : 7
Sample Name   :                          Vial : 56
Acq. Operator : I.OZGUR                   Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 12:02:45 AM by I.OZGUR
               (modified after loading)

Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/24/07 8:18:17 AM by I.OZGUR
antioksidan analizi

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 2.875 | MM | 0.1335 | 26.43966 | 3.30021 | 0.7574 |
| 2 | 3.148 | MM | 0.2211 | 405.90613 | 30.59929 | 11.6279 |
| 3 | 3.536 | MM | 0.1659 | 45.44936 | 4.56694 | 1.3020 |
| 4 | 4.969 | MM | 0.2188 | 144.37737 | 10.99577 | 4.1359 |
| 5 | 5.956 | MM | 0.2590 | 187.78641 | 12.08297 | 5.3795 |
| 6 | 6.963 | MM | 0.2773 | 15.08285 | 9.06498e-1 | 0.4321 |
| 7 | 7.769 | MM | 0.2573 | 18.98013 | 1.22936 | 0.5437 |
| 8 | 8.534 | MM | 0.3950 | 57.93426 | 2.44458 | 1.6596 |
| 9 | 10.158 | PV | 0.4116 | 210.72394 | 7.83992 | 6.0365 |
| 10 | 11.368 | VP | 0.5075 | 477.25452 | 14.07752 | 13.6717 |
| 11 | 15.694 | MM | 0.5772 | 48.01611 | 1.38636 | 1.3755 |
| 12 | 16.679 | MM | 0.6214 | 95.44097 | 2.55968 | 2.7341 |
| 13 | 18.097 | MM | 0.4357 | 16.51720 | 6.31816e-1 | 0.4732 |
| 14 | 21.436 | MM | 0.1977 | 252.26720 | 21.26428 | 7.2266 |

trument 1 5/24/07 6:44:04 PM I.OZGUR

Page 1 of 2

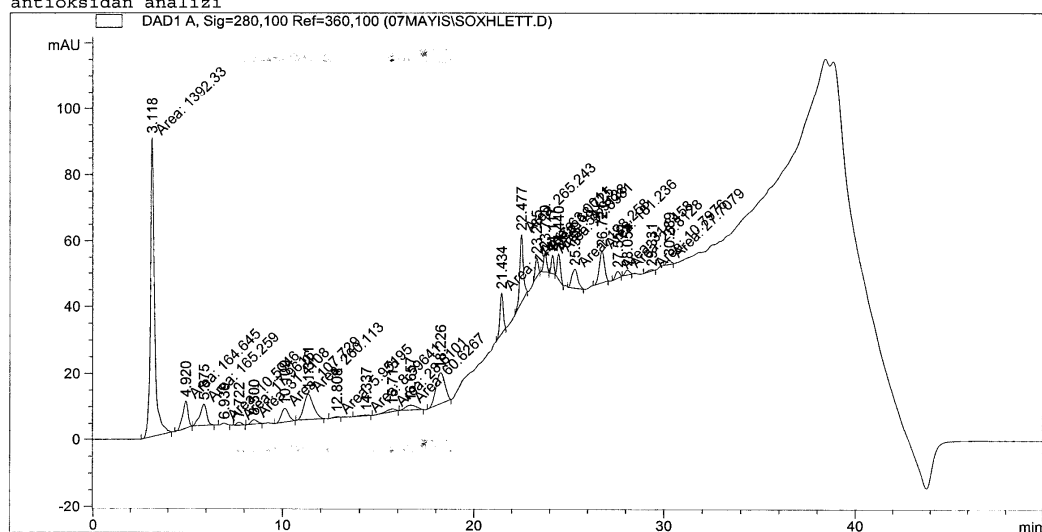
EK-19. Soksile ekstraktının alfa tokoferollu 280 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

a File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\SOXHLETT.D

```

=====
Injection Date : 5/24/07 12:54:38 AM          Seq. Line : 8
Sample Name    :                               Vial : 57
Acq. Operator  : I.OZGUR                      Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 12:54:04 AM by I.OZGUR
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/24/07 8:18:17 AM by I.OZGUR
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 2.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,100 Ref=360,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 3.118 | MM | 0.2568 | 1392.33154 | 90.37807 | 76.1614 |
| 2 | 4.920 | MM | 0.3344 | 164.64471 | 8.20618 | 9.0062 |
| 3 | 5.875 | MM | 0.4298 | 165.25949 | 6.40796 | 9.0398 |
| 4 | 6.939 | MM | 0.2905 | 10.50456 | 6.02591e-1 | 0.5746 |
| 5 | 7.722 | MM | 0.3178 | 17.96157 | 9.41956e-1 | 0.9825 |
| 6 | 8.500 | MM | 0.3789 | 31.41082 | 1.38169 | 1.7182 |
| 7 | 10.109 | MM | 0.4448 | 107.72861 | 4.03677 | 5.8928 |
| 8 | 11.321 | MM | 0.5756 | 260.11304 | 7.53108 | 14.2284 |
| 9 | 12.808 | MM | 0.2739 | 5.95195 | 2.65820e-1 | 0.3256 |
| 10 | 14.337 | MM | 0.4724 | 8.59641 | 2.23010e-1 | 0.4702 |
| 11 | 15.713 | MM | 0.4146 | 28.61010 | 8.35898e-1 | 1.5650 |
| 12 | 16.657 | MM | 0.6741 | 60.62665 | 1.49901 | 3.3163 |
| 13 | 18.226 | PP | 0.5147 | 307.91122 | 9.28931 | 16.8429 |
| 14 | 21.434 | MM | 0.1982 | 144.17569 | 12.12409 | 7.8865 |

Instrument 1 5/24/07 6:47:14 PM I.OZGUR

Page 1 of 2

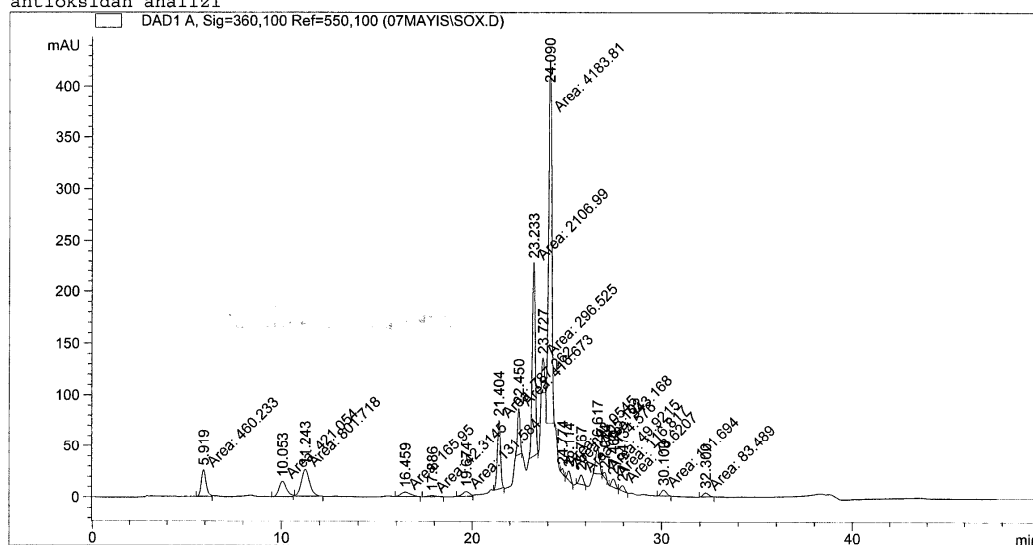
EK-20. Soksile ekstraktının 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

ita File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\SOX.D

```

=====
Injection Date : 5/25/07 1:19:21 AM          Seq. Line : 9
Sample Name   :                               Vial : 49
Acq. Operator : D.SENSOY                      Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/25/07 10:10:48 AM by D.SENSOY
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.919 | MM | 0.2976 | 460.23318 | 25.77280 | 4.2299 |
| 2 | 10.053 | MM | 0.4670 | 421.05362 | 15.02678 | 3.8698 |
| 3 | 11.243 | MM | 0.5102 | 801.71753 | 26.19063 | 7.3684 |
| 4 | 16.459 | MM | 0.6135 | 165.95007 | 4.50817 | 1.5252 |
| 5 | 17.886 | MM | 0.5921 | 42.31446 | 1.19116 | 0.3889 |
| 6 | 19.674 | MM | 0.4547 | 131.58351 | 4.82262 | 1.2093 |
| 7 | 21.404 | MM | 0.1951 | 787.26190 | 67.26720 | 7.2355 |
| 8 | 22.450 | MM | 0.1523 | 416.67343 | 45.59353 | 3.8295 |
| 9 | 23.233 | MM | 0.1857 | 2106.99438 | 189.06000 | 19.3648 |
| 10 | 23.727 | MM | 0.1484 | 296.52466 | 33.30470 | 2.7253 |
| 11 | 24.090 | MM | 0.1969 | 4183.80664 | 354.10110 | 38.4521 |
| 12 | 24.774 | MM | 0.1436 | 43.05450 | 4.99812 | 0.3957 |
| 13 | 25.114 | MM | 0.1935 | 105.10245 | 9.05315 | 0.9660 |
| 14 | 25.767 | MM | 0.2287 | 134.57559 | 9.39475 | 1.2368 |

strument 1 5/29/07 10:36:42 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

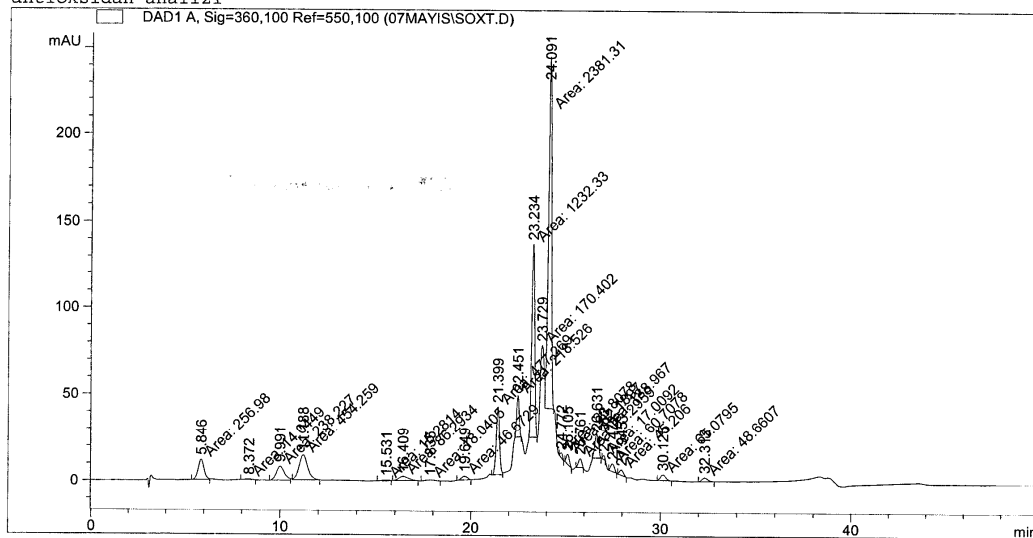
EK-21. Soksile ekstraktının alfa tokoferollu 360 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\07MAYIS\SOXT.D

```

=====
Injection Date : 5/25/07 2:10:38 AM          Seq. Line : 10
Sample Name    :                               Vial       : 50
Acq. Operator  : D.SENSOY                     Inj        : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/25/07 2:10:05 AM by D.SENSOY
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed   : 5/25/07 8:10:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=360,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.846 | MM | 0.3663 | 256.98016 | 11.69273 | 4.1552 |
| 2 | 8.372 | MM | 0.4093 | 14.04490 | 5.71930e-1 | 0.2271 |
| 3 | 9.991 | MM | 0.4972 | 238.22664 | 7.98482 | 3.8520 |
| 4 | 11.188 | MM | 0.5291 | 454.25864 | 14.30904 | 7.3450 |
| 5 | 15.531 | MM | 0.4888 | 15.28141 | 5.21089e-1 | 0.2471 |
| 6 | 16.409 | MM | 0.5958 | 86.29341 | 2.41411 | 1.3953 |
| 7 | 17.835 | MM | 0.5133 | 18.04048 | 5.85813e-1 | 0.2917 |
| 8 | 19.649 | MM | 0.3683 | 46.67292 | 2.11181 | 0.7547 |
| 9 | 21.399 | MM | 0.2027 | 477.26874 | 39.25153 | 7.7171 |
| 10 | 22.451 | MM | 0.1489 | 218.52612 | 24.46330 | 3.5334 |
| 11 | 23.234 | MM | 0.1829 | 1232.32922 | 112.32352 | 19.9259 |
| 12 | 23.729 | MM | 0.1480 | 170.40204 | 19.18815 | 2.7553 |
| 13 | 24.091 | MM | 0.1954 | 2381.31006 | 203.11641 | 38.5041 |
| 14 | 24.772 | MM | 0.1402 | 23.80784 | 2.83116 | 0.3850 |

Instrument 1 5/29/07 10:40:22 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

EK-22. Soksile ekstraktının 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

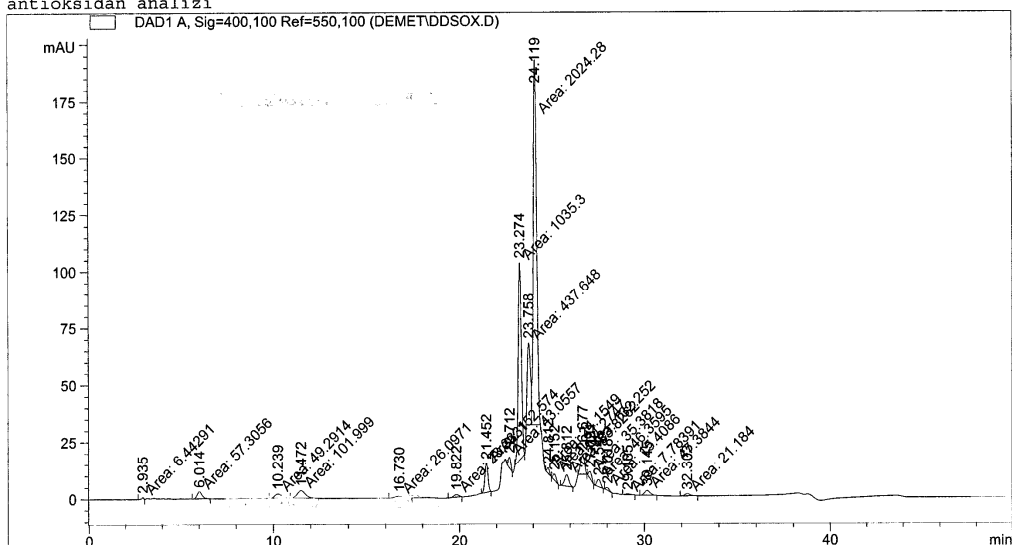
a File C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DDSOX.D

```

=====
Injection Date : 5/31/07 1:53:35 AM          Seq. Line : 11
Sample Name    :                               Vial : 11
Acq. Operator  : D.SENSOY                      Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 8:27:41 AM by D.SENSOY
antioksidan analizi

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 2.935 | MM | 0.1271 | 6.44291 | 8.44530e-1 | 0.1464 |
| 2 | 6.014 | MM | 0.3043 | 57.30558 | 3.13848 | 1.3017 |
| 3 | 10.239 | MM | 0.4323 | 40.29157 | 1.90147 | 1.1197 |
| 4 | 11.472 | MM | 0.5028 | 101.99897 | 3.38075 | 2.3169 |
| 5 | 16.730 | MM | 0.5534 | 26.09714 | 7.85981e-1 | 0.5928 |
| 6 | 19.822 | MM | 0.3327 | 23.33314 | 1.16894 | 0.5300 |
| 7 | 21.452 | MM | 0.1965 | 152.57368 | 12.94109 | 3.4657 |
| 8 | 22.712 | MM | 0.1496 | 43.05566 | 4.79558 | 0.9780 |
| 9 | 23.274 | MM | 0.1984 | 1035.30261 | 86.97611 | 23.5171 |
| 10 | 23.758 | MF | 0.2028 | 437.64816 | 35.96278 | 9.9413 |
| 11 | 24.119 | FM | 0.2097 | 2024.28381 | 160.88747 | 45.9820 |
| 12 | 24.812 | MM | 0.1560 | 24.15486 | 2.58117 | 0.5487 |
| 13 | 25.152 | MM | 0.1910 | 31.27471 | 2.72903 | 0.7104 |
| 14 | 25.812 | MM | 0.2776 | 83.82619 | 5.03290 | 1.9041 |
| 15 | 26.677 | MM | 0.2496 | 132.25230 | 8.83123 | 3.0041 |

Instrument 1 5/31/07 8:27:37 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

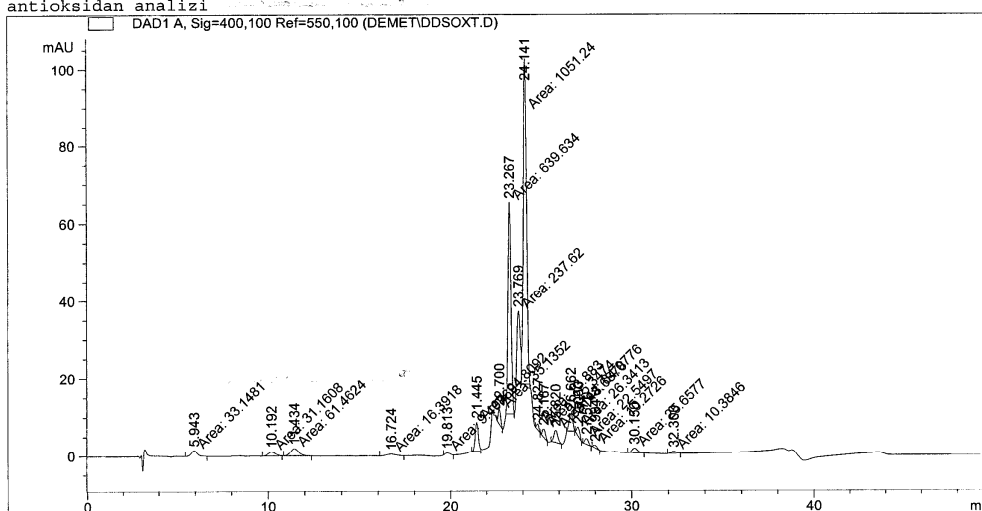
EK-23. Soksile ekstraktının alfa tokoferollu 400 nm dalga boyunda HPLC analiz sonucu

File C:\HPCHEM\1\DATA\DEMET\DDSOXT.D

```

=====
Injection Date : 5/31/07 2:44:51 AM      Seq. Line : 12
Sample Name   :                          Vial : 12
Acq. Operator : D.SENSOY                 Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\BURCU.S
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEMET.M
Last changed  : 5/30/07 5:20:03 PM by D.SENSOY
antioksidan analizi
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=400,100 Ref=550,100

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 5.943 | MM | 0.3811 | 33.14806 | 1.44969 | 1.3490 |
| 2 | 10.192 | MM | 0.4898 | 31.16077 | 1.06025 | 1.2681 |
| 3 | 11.434 | MM | 0.5394 | 61.46241 | 1.89893 | 2.5012 |
| 4 | 16.724 | MM | 0.6044 | 16.39182 | 4.52038e-1 | 0.6671 |
| 5 | 19.813 | MM | 0.2889 | 9.49769 | 5.47878e-1 | 0.3865 |
| 6 | 21.445 | MM | 0.2077 | 94.80915 | 7.60788 | 3.8583 |
| 7 | 22.700 | MM | 0.1562 | 35.13520 | 3.74955 | 1.4298 |
| 8 | 23.267 | MM | 0.1950 | 639.63379 | 54.67506 | 26.0299 |
| 9 | 23.769 | MF | 0.2092 | 237.61981 | 18.93049 | 9.6699 |
| 10 | 24.141 | FM | 0.2078 | 1051.24194 | 84.32413 | 42.7803 |
| 11 | 24.827 | MM | 0.1489 | 13.88301 | 1.55421 | 0.5650 |
| 12 | 25.167 | MM | 0.1984 | 25.34741 | 2.12901 | 1.0315 |
| 13 | 25.820 | MM | 0.2590 | 48.68778 | 3.13287 | 1.9814 |
| 14 | 26.662 | MM | 0.2346 | 64.07758 | 4.55305 | 2.6076 |
| 15 | 27.060 | MM | 0.1978 | 26.34131 | 2.21902 | 1.0720 |
| 16 | 27.520 | MM | 0.2380 | 22.54973 | 1.57911 | 0.9177 |

Instrument 1 5/31/07 8:23:55 AM D.SENSOY

Page 1 of 2

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞENSOY, Nuriye Demet
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 30.08.1981 Ordu
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 272 612 66 60
e-mail : ndsensoy@yahoo.com

Eğitim

| Derece | Eğitim Birimi | Mezuniyet Tarihi |
|--------|--------------------------------------|------------------|
| Lisans | Gazi Üniversitesi/Kimya Mühendisliği | 2004 |
| Lise | Ordu Anadolu Lisesi | 1999 |

İş Deneyimi

| Yıl | Yer | Görev |
|-------|-------------------------|-----------------|
| 2006- | Toprak Mahsulleri Ofisi | Kimya Mühendisi |