

***ONOSMA HALOPHILA*' NIN FARKLI
EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE
EKSTRAKSİYONU ve EKSTRAKSİYON
VERİMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ASLI DEMİR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
ŞUBAT - 2015**

***ONOSMA HALOPHILA*' NIN FARKLI
EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE
EKSTRAKSİYONU ve EKSTRAKSİYON
VERİMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ASLI DEMİR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. A. Murat GİZİR**

**MERSİN
ŞUBAT – 2015**

Aslı DEMİR tarafından Prof. Dr. A. Murat GİZİR danışmanlığında ve Doç. Dr. Rıza BİNZET eş danışmanlığında hazırlanan “*Onosma halophila*’nın Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Verimlerinin Karşılaştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Murat GİZİR

Doç. Dr. Recep ÖZEN

Doç. Dr. M. Kemal SANGÜN

İmza



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27./02/2015 tarih ve 2015.05/296. sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ONOSMA HALOPHILA' NIN FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ İLE EKSTRAKSİYONU ve EKSTRAKSİYON VERİMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ASLI DEMİR

ÖZ

Boraginaceae familyasındaki bazı cinslerin kökleri naftokinonlarca zengindir. *Alkanna*, *Onosma*, *Arnebia*, *Lithospermum*, ve *Echium* cinslerinin köklerinin naftokinonlarca zengin olduğu bilinmektedir. Naftokinonlar bu bitkilerde alkannin/shikonin ve/veya onların türevleri halinde bulunabilir. Shikonin (R-konfigürasyon), alkannin (S-konfigürasyon) bir enantiyomerdir. Alkanninin ve shikoninin antikanser, anti inflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik ve yara iyileşmesi gibi biyolojik ve medikal özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, naftokinon pigmentler genellikle pH değişiklikleriyle değişken renk göstermektedir. Bu nedenle, bunlar yaygın olarak gıda, ilaç, boyalar, vb. üretimi için kimya endüstrisinde kullanılmaktadır. Boraginaceae familyasına ait *Onosma halophila* Boiss. & Heldr, Türkiye' de yayılış gösteren tek endemik tuzcul türdür. Bu çalışma, *O.halophila* ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmadığından farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak shikonin miktarının hesaplanması ve ekstraktların toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi açısından önem kazanmıştır. Türkiye endemiği olan *O.halophila* süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu, subkritik su ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilmiş ve kullanılan metotlar kıyaslanmıştır. Soxhlet ekstraksiyonu metanol, hekzan, etil asetat çözücüleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve en yüksek shikonin miktarı, etil asetat çözücüsü kullanarak 9,445 mg/g kuru bitki olarak belirlenmiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, 100, 175, 250 bar basınç, 60, 70, 80 °C sıcaklıklarında, 0.5 ml/dk karbondioksit akış hızında gerçekleştirilmiş ve shikonin miktarı en iyi 100 bar basınç 80°C sıcaklıkta 0,153 mg/g kuru bitki olarak ekstrakte edilmiştir. Subkritik su ekstraksiyonu, 50 bar basınç 100, 110, 120 °C sıcaklıklarda yapılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak, gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Toplam fenolik içeriği en yüksek (7,11 mg GAE/g kuru bitki) soxhlet ekstraksiyon metoduyla metanol çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Boraginaceae, *Onosma halophila*, shikonin, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu.

Danışman: Prof. Dr. A. Murat GİZİR, Mersin Üniversitesi, Kimya Ana Bilim Dalı
Eş Danışman: Doç. Dr. Rıza BİNZET, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

EXTRACTION OF *ONOSMA HALOPHILA* USING VARIOUS EXTRACTION METHODS AND COMPARISON OF EXTRACTION YIELDS

Ash DEMİR

ABSTRACT

The roots of some genera which belongs to Boraginaceae family are plentiful with naphthoquinones. Furthermore, roots of *Alkanna*, *Onosma*, *Arnebia*, *Lithospermum* and *Echium* genera are known as plentiful with species contain naphthoquinones. Naphthoquinones are found as alkannin/Shikonin or derivatives of them in these plants. Shikonin (R-configuration) and Alkannin (S-configuration) are enantiomers. It was shown that Alkannin and shikonin have biologic and medical properties such as, antiinflamatur, antimicrobial, antioxidant, antithrombotic and sore improving properties. In addition, naphthoquinones pigments usually shows changeable colours via varying pH. For this reason, these pigments are widely used in chemistry industries for production of food, drug, dye, etc. *Onosma halophila* Boiss. & Heldr which belongs to Boraginaceae family is a single endemic species occurring halophytic and grow in Turkey. Best of our knowlodge there isn't any research related to extraction of *O. Halophila* in the literature. So, this work, which employed various extraction methods to determine amount of shikonin and total phenolic content of extracts, gain importance. *O. Halophila* which is the endemic plant of Turkey was extracted by supercritical carbondioxide, soxhlet, subcritical water extraction methods and these methods were compared. Soxhlet extraction experiments were carried out using methanol, hexane, ethyl acetate as solvents and maximum shikonin amount obtained by ethyl acetate as 9,445 mg/g dry plant. Supercritical carbondioxide extractions were carried out at 100, 175, 250 bar pressure and 60, 70, 80 °C temperature, respectively, at 0,5 mL/min flow rate and maximum shikonin amount was obtained at 100 bar pressure and 80 °C temperature as 0,123 mg/g dry plant. Subcritical water extractions were carried out at 50 bar pressure at 100, 110, 120 °C temperature respectively. Amount of total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent (FCR) and calculated as equivalence of gallic acid. Maximum total phenolic content was obtained by soxhlet extraction method using methanol as 7,11 mg GAE/g dry plant.

Key Words: Boraginaceae, *Onosma halophila*, shikonin, Supercritical carbondioxide extractions, subcritical water extraction, Soxhlet extraction.

Advisor: Prof. Dr. A. Murat GİZİR, Department of Chemistry, University of Mersin

Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Rıza BİNZET, Department of Biology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenen bir araştırma projesi olup, Prof. Dr. A. Murat GİZİR ve Doç. Dr. Rıza BİNZET yöneticiliğinde gerçekleşmiştir.

Kimya eğitimim ve akademik çalışmalarım boyunca her konuda benden desteğini esirgemeyen, tez çalışmam süresince yapmış olduğum araştırmalarda değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren tez danışmalarım sayın Prof. Dr. A. Murat GİZİR'e ve sayın Doç. Dr. Rıza BİNZET'e,

Desteklerini eksik etmeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Erdal YABALAK, Arş. Gör. Özkan GÖRMEZ, Arş. Gör. Doğan ÇİRMİ ve Arş. Gör. Özgür YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tüm yaşamımda beni maddi, manevi hep destekleyen, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve ilgilerini eksik etmeyen çok değerli aileme özellikle babam Süleyman DEMİR'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ÖZ..... | İ |
| ABSTRACT | İİ |
| TEŞEKKÜR..... | İİİ |
| İÇİNDEKİLER..... | İV |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | VI |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | VII |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | İX |
| | |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| | |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI..... | 3 |
| | |
| 2.1. BORAGINACEAE | 3 |
| | |
| 2.1.1. <i>Onosma holophila</i> Boiss. & Heldr | 7 |
| | |
| 2.2. SÜPERKRİTİK AKIŞKANLAR..... | 10 |
| | |
| 2.2.1. Süperkritik Akışkanın Tanımı | 11 |
| 2.2.2. Süperkritik Akışkanların özellikleri | 14 |
| 2.2.2.1. Yoğunluk | 14 |
| 2.2.2.2. Difüzyon Katsayısı | 14 |
| 2.2.2.3. Viskozite1 | 15 |
| 2.2.2.4. Isıl İletkenlik | 15 |
| 2.2.3. Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları | 20 |
| 2.2.4. Süperkritik Akışkanın Seçimi | 22 |
| 2.2.5. Süperkritik Akışkanların Çözme Gücü | 25 |
| | |
| 2.3. EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ | 27 |
| 2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu | 28 |
| 2.3.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu..... | 30 |
| 2.3.2.1. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Avantajları..... | 30 |
| 2.3.2.2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun Dezavantajları | 31 |
| 2.3.2.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Mekanizması | 32 |
| 2.3.2.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu Verimliliğini Etkileyen Değişkenler | 33 |
| 2.3.3. Subkritik Su Ekstraksiyonu | 34 |
| | |
| 2.4. ANTİOKSİDANLAR | 35 |
| 2.4.1. Fenolik Bileşikler | 37 |
| 2.4.2. Polifenoller | 38 |
| 2.4.2.1. Fenolik Asitler | 38 |
| | |
| 2.5. BENZER ÇALIŞMALAR..... | 39 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 42 |
| 3.1. MATERYAL | 42 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar | 42 |
| 3.2. YÖNTEM | 45 |
| 3.2.1. Onosma halophila' nın toplanması | 45 |
| 3.2.2. Ekstraksiyon Şartlarının Belirlenmesi | 46 |
| 3.2.3. Farklı Ekstraksiyon Metotlarının Kullanılması | 46 |
| 3.2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu | 46 |
| 3.2.3.2. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu | 48 |
| 3.2.3.3. Subkritik Su Ekstraksiyonu | 49 |
| 3.2.4. Alkali Hidrolizi | 49 |
| 3.2.5. Toplam Fenolik Madde Tayini (Folin Yöntemi) | 50 |
| 3.2.6. Ekstraksiyon Ürünlerinin Karakterizasyonu | 51 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 54 |
| 4.1. TEZİN AMACI | 54 |
| 4.2. SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT EKSTRAKSİYONU | 54 |
| 4.2.1. Sıcaklık ve Basıncın Etkisi | 54 |
| 4.2. SOXHLET EKSTRAKSİYONU | 60 |
| 4.3. SUBKRİTİK SU EKSTRAKSİYONU | 61 |
| 4.4. TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ (FOLİN YÖNTEMİ) | 62 |
| 4.4.1. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonuyla Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarları | 63 |
| 4.4.2. Subkritik Su Ekstraksiyonuyla Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarları | 64 |
| 4.4.3. Soxhlet Ekstraksiyonuyla Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarları | 65 |
| 4.5. ONOSMO HALOPHILA L. 'NİN EKSTRAKSİYONUNDA KULLANILAN EKSTRAKSİYON METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI | 66 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 68 |
| KAYNAKLAR | 70 |
| ÖZGEÇMİŞ | 78 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. Bazı çözücülerin kritik özellikleri | 13 |
| Çizelge 2.2. Sıvıların, gazların ve süperkritik akışkanların bazı fiziksel özellikleri .. | 14 |
| Çizelge 2.3. Bazı süperkritik akışkanların avantaj ve dezavantajları | 23 |
| Çizelge 2.4. Doğal maddelerin süperkritik CO ₂ 'deki çözünürlükleri | 26 |
| Çizelge 3.1. Süperkritik karbondioksit, soxhlet ekstraksiyonda kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri..... | 47 |
| Çizelge 4.1. Sıcaklık ve basınçla değişen karbondioksit yoğunluğu (g/cm ³) | 55 |
| Çizelge 4.2. Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen shikonin miktarları (mg shikonin/g kuru bitki)..... | 60 |
| Çizelge 4.3. 50 bar sabit basınçta değişen sıcaklıklarda subkritik su ekstraksiyonu sonucu | 61 |
| Çizelge 4.4. Gallik asit standartının konsantrasyon ve absorbanları..... | 62 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Shikonin/Alkannin yapısal formülü | 4 |
| Şekil 2.2. Naftazarin yapıları..... | 5 |
| Şekil 2.3. Alkanin (1) (sol) ve shikoninin (2) (sağ) bilgisayarda oluşturulan moleküler modelleri. Renk kodları; gri: karbon, beyaz: hidrojen, kırmızı: oksijen | 6 |
| Şekil 2.4. <i>O. halophila</i> 'nın çiçek görünümü. | 8 |
| Şekil 2.5. <i>O. halophila</i> 'nın genel görünüşü | 9 |
| Şekil 2.6. <i>Onosma halophila</i> yayılış alanı | 10 |
| Şekil 2.7. Süperkritik akışkanın oluşum süreci | 12 |
| Şekil 2.8. Su ve CO ₂ için sıcaklık-basınç diyagramı | 12 |
| Şekil 2.9. Süperkritik Akışkanların Özellikleri | 15 |
| Şekil 2.10. Karbondioksitin yoğunluğunun sıcaklık ve basınçla değişim diyagramı . | 16 |
| Şekil 2.11. Süperkritik karbondioksitin yayınlılığı | 17 |
| Şekil 2.12. Süperkritik karbondioksitin viskozite değişimi | 18 |
| Şekil 2.13. Kritik nokta yakınında CO ₂ ' in ısı iletkenliği | 19 |
| Şekil 2.14. Naftalinin CO ₂ 'deki çözünürlüğü | 24 |
| Şekil 2.15. Süperkritik CO ₂ içinde bileşiklerin çözünürlüğü | 26 |
| Şekil 2.16. CO ₂ için Hildebrandt çözünürlük parametresi..... | 27 |
| Şekil 2.17. Soxhlet düzeneği | 29 |
| Şekil 2.18. Süperkritik akışkanların katılardan transfer mekanizması | 32 |
| Şekil 2.19. Antioksidanların sınıflandırılması..... | 36 |
| Şekil 2.20. Şekil bazı fenolik asitler | 39 |
| Şekil 3.1. Soxhlet Ekstraksiyon Düzneği | 47 |
| Şekil 3.2. Süperkritik karbondioksit ve subkritik su ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi | 48 |
| Şekil 3.3. (a) Örnek numunenin alkali hidrolizi sırasındaki görünümü, (b) Alkali hidrolizi sonrası numunenin asitle muamele edildikten sonraki görünümü | 50 |
| Şekil 3.4. Kalibrasyon grafiği (1,2,3,4,5 mg/L) | 52 |
| Şekil 3.5. Kalibrasyon grafiği (10,20,30,40,50 mg/L)..... | 52 |
| Şekil 3.6. Kalibrasyon grafiği (50, 100, 150, 200 mg/L)..... | 53 |
| Şekil 4.1 60 °C sabit sıcaklıkta değişen ekstraksiyon basıncına bağlı olarak mg/g shikonin verimleri | 56 |
| Şekil 4.2. 70 °C sabit sıcaklıkta değişen ekstraksiyon basıncına bağlı olarak mg/g shikonin verimleri..... | 56 |
| Şekil 4.3. 80 °C sabit sıcaklıkta değişen ekstraksiyon basıncına bağlı olarak mg/g shikonin verimleri | 57 |
| Şekil 4.4. 100 bar sabit basınçta değişen ekstraksiyon sıcaklığına bağlı olarak mg shikonin/g kuru bitki verimleri | 58 |
| Şekil 4.5. 175 bar sabit basınçta değişen ekstraksiyon sıcaklığına bağlı olarak mg shikonin/g kuru bitki verimleri i..... | 58 |
| Şekil 4.6. 250 bar sabit basınçta değişen ekstraksiyon sıcaklığına bağlı olarak mg shikonin/g kuru bitki verimleri | 59 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.7. Soxhlet ekstraksiyon sonuçları | 61 |
| Şekil 4.8. Gallik asit kalibrasyon grafiği..... | 63 |
| Şekil 4.9. Değişen sıcaklık-basınçlar da süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları | 64 |
| Şekil 4.10. Subkritik su ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları. | 65 |
| Şekil 4.11. Soxhlet ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları. | 66 |
| Şekil 4.12. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu metodu ile elde edilen shikonin miktarları..... | 66 |
| Şekil 4.13. Soxhlet ekstraksiyon metoduyla elde edilen shikonin miktarları | 67 |



SİMGELER VE KISALTLAMALAR

EPA: Amerikan Çevre Koruma Ajansı

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Cas No: Katolog Numarası

SC-CO₂: Süperkritik Karbondioksit

Tc: Kritik sıcaklık

Pc: Kritik basınç



1. GİRİŞ

Dünyada bitkiler ve diğer doğal kaynaklarla tedavi antik çağlara kadar uzanmaktadır. İnsanoğlu binlerce yıldır doğadan gelen ilaçlar hakkında bilgi sahibi olmakla birlikte bu ilaçlar antik çağlarda bitki ve hayvan ürünlerinin ekstrakte edilip inorganik tuzlarla karıştırılması sonucu kullanılmaktaydı. Bitkilerin tıbbi amaç için oldukça yaygın olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir. MÖ. 1000 yılından beri bitkilerin tıbbi alanda kullanıldıkları kaynaklarca belirtilmiştir. Bitkiler, geleneksel, destekleyici ve alternatif tıp kapsamında doğrudan ilaç, yahut ticari ilaç yapımında hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Günümüzde kullandığımız çok önemli ilaçların keşfi 1800'lü yıllardan itibaren halk arasında kullanılan bitkilerden biyoaktif organik bileşiklerin izolasyonu ile mümkün olmuştur. Bitkilerden izole edilen ilk aktif bileşikler striknin, morfin, atropin ve kolşisin gibi alkaloidlerdir, söğüt ağacının kabuklarından elde edilen aspirin ise 1897'de sentezlenerek ilaç dünyasına sunulmuştur [1].

Günümüzde dünyanın gelişmiş ülkeleri saf, sentetik veya yarı sentetik hammaddelerle üretilmiş ilaçların istenmeyen yan etkilere sahip olması nedeni ile hastalıkların tedavisinde bitkisel kaynaklara yönelmiş durumdadırlar. Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı araştırmalar sonucunda; dünya nüfusunun % 60'ının sentetik ilaçları hiç kullanmadığı, 3/4'ünün ise kendi geleneksel kültürlerindeki bitkisel kaynaklı olan ilaçlara güvendiği ve bunları kullandığı saptanmıştır. Amerika'da reçetelenmemiş ilaçların % 25'i doğal ürünlerden, % 25'i de doğal ürünlerden hareketle türevlenen maddelerden oluşmaktadır. Rusya'da kullanılan ilaçlardan 1/3'ünden fazlası bitkisel kökenli olup sentetik birçok ilacın elde edilmesine karşılık bu oran değişmemektedir [2].

Bitkiler insan sağlığının sürdürülmesinde ve insan yaşamının kalitesinin artırılmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır [2]. Ülkemiz coğrafi konumu itibarı ile zengin bir bitki örtüsüne sahiptir. Akdeniz, Asya, Avrupa gibi 3 farklı coğrafik alanda ve önemli iklimsel kuşağın ortasında yer alışı, Türkiye'yi bitki çeşitliliği ve endemik bitkiler açısından zengin bir ülke haline getirmiştir [3].

Türkiye'deki en çok tür içeren familyalar arasında dokuzuncu sırada yer alan Boraginaceae familyası 34 cins, 325 tür, 16 alt tür ve 16 varyete olmak üzere 357 takson içermektedir. Boraginaceae familyasının en büyük cinsi olan *Onosma* L. bütün dünyada toplam 150 tür ile temsil edilmektedir [4]. *Onosma*, ülkemizde 97 tür, 4 varyete ve 1 melez tür

ile temsil edilmekte olup bunlardan 50 tür ve 1 varyete endemiktir. Toplam endemizm oranı % 50 civarındadır [6,7].

Boraginaceae familyasındaki bazı cinslerin kökleri naftokinonlarca zengindir. Naftokinonlar bu bitkilerde alkannin/shikonin ve/veya onların türevleri halinde bulunabilir [8]. Alkannin ve shikonin antikanser, anti inflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik ve yara iyileşmesi gibi biyolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [9].

Bu tez çalışmasında bir endemik *Onosma* L. cinsine ait *O. halophila* türü kullanılmıştır. *O. halophila* ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *O. halophila*'nın Soxhlet, süperkritik karbondioksit ve subkritik su ekstraksiyonu ile bir naftokinon olan shikonin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve ekstraksiyon verimleri karşılaştırılmış, daha sonra bu üç ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. BORAGINACEAE

Bir, iki veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Nadiren küçük çalı veya ağaçlardır. Yapraklar alternat, stipulasız, basit, genellikle yoğun kaba, batıcı (setos) tüylüdür. Uçtaki dallar simoz çiçek durumludur, simoz akrep kuyruğu gibi kıvrık veya \pm zembereksidir, çiçek durumu nadiren tirsusa benzer. Kaliks sepalleri birleşik, 5-lobludur (nadiren 9-loblu veya düzensiz olarak dişli), çoğu kez çiçek açma devresinden sonra genişler. Korolla 5-loblu, aktinomorf (ışınsal) veya nadiren zigomorfiktir (tek eksenli), genellikle bariz tüp ve \pm derin lobludur, korolla boğazı 5 parçalı boğaz pulları veya boğaz tüyleri barındırır veya pürüzsüz ve çıplaktır. Stamen 5 adet, epipetalus, korolla lobları ile almaşık konumludur. Ovaryum üst durumlu, 4 (nadiren 2) gözlü; stilus ginobazik, nadir olarak terminal, genellikle parçalanmamış, stigma tam veya 2(-4)-lobludur. Meyve genellikle 4 nutletli (findıksı), gelişemediğinden nadiren daha az sayıda, 2 adet mantarimsı merikarp veya bir drupa; nutletler piramit şeklinde torus üzerinden çıkar, bağlanma izi dardan-genişe değişik boyutlardadır, nutlet tabanı saplı veya sapsızdır, hafifçe horizontal olarak içe doğru kıvrık gaga benzeri bir uzantı vardır veya gagasızdır, karinalı veya karinasızdır, çoğu kez tabla ve kenara doğru farklılaşmıştır; kenar bazen yayılan veya kıvrılan kanat içerir, veya dikenli-gloşitlidir; yüzey pürüzsüz veya çeşitli süslerle donatılmıştır, tüsüz, tüylü veya gloşitli küçük yumrular ve/veya dikenler vardır [4].

Boraginaceae familyası dünyanın tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerinde 100 cins ve 2000 farklı tür ile yayılış göstermektedir. En yoğun olarak İran-Turan ve Akdeniz bölgelerinin ılıman alanlarında, ayrıca Orta Amerika, Kuzey ve Güney Amerika'nın orta kesimlerinde yayılış göstermektedir. Türkiye'deki en çok tür içeren familyalar arasında dokuzuncu sırada yer alan Boraginaceae familyası 34 cins, 325 tür, 16 alt tür ve 16 varyete olmak üzere 357 takson içermektedir. Boraginaceae familyasının en büyük cinsi olan *Onosma* L. bütün dünyada toplam 150 tür ile temsil edilmektedir [4]. *Onosma*, ülkemizde 97 tür, 4 varyete, ve 1 melez tür ile temsil edilmekte olup bunlardan 50 tür ve 1 varyete endemiktir. Toplam endemizm oranı % 50 civarındadır [6,7].

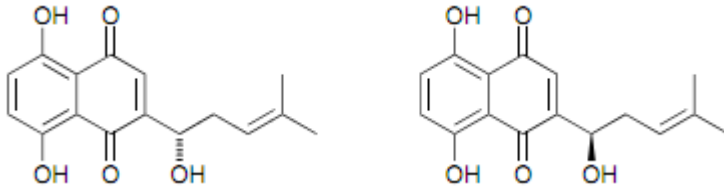
Onosma kelimesi Yunanca 'onos' ve 'osmé', Latince 'osma' kelimelerinden türemiştir. Koku, parfüm, mis kokulu, hoş koku saçmak anlamına gelmektedir. İngiltere'de

'Golden Drop' olarak bilinen bitkiye ülkemizde şincar, emzik otu, yalancı havaciva ve altın damla gibi isimler verilmiştir [8,11].

Ülkemizdeki ve dünyadaki *Onosma* türlerinin büyük kısmı Avusturyalı Botanikçi Riedl tarafından teşhis edilmiştir. Türkiye'de yayılış gösteren *Onosma* taksonlarını *Protonosma*, *Podonosma* ve *Onosma* olmak üzere 3 seksiyona ayırmış ve *Onosma* seksiyonu ise *Haplotricha* ve *Asterotricha* olmak üzere 2 alt seksiyon altında toplamıştır [7,103].

Boraginaceae familyasındaki bazı cinslerin kökleri naftokinonlarca zengindir. *Alkanna*, *Onosma*, *Arnebia*, *Lithospermum*, ve *Echium* cinslerinin köklerinde naftokinon taşıyan türler açısından zengin olduğu bilinmektedir. Naftokinonlar bu bitkilerde alkannin/shikonin ve/veya onların türevleri halinde bulunabilir. Shikonin (R-konfigürasyon), alkannin (S-konfigürasyon) bir enantiyomerdir [8].

İki doğal enantiyomerik Naftokinon türevleri olan alkannin ve shikonin, Boraginaceae familyasındaki çeşitli bitkilerin metabolik ürünlerdir. Alkannin ve shikonin antikanser, anti inflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik ve yara iyileşmesi gibi biyolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [9].

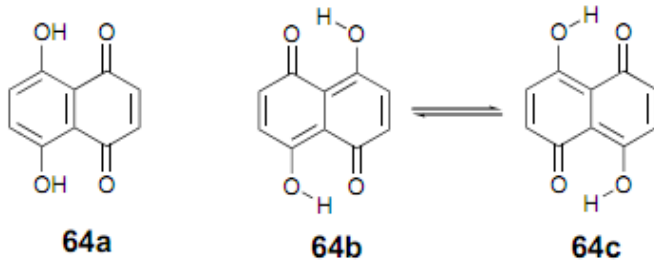


Şekil 2.1. Shikonin/Alkannin yapısal formülü

Shikonin (R-enantiyomer), Doğu'da özellikle Çin'de bilinmektedir. Bu molekül, *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. Et Zucc. bitkisinin köklerinden ekstrakte edilen kırmızı pigmentin ana ögesidir ve Çince'de çeşitli isimleri vardır; "tzu ts'ao", "tzu-ken" (mor kök) ve "hung-tzu ken" (kırmızımsı-mor kök). Shikoninin, ipek boyası olarak kullanımı, tıptaki kullanımı kadar eskidir. *Lithospermum erythrorhizon* kökleri için iddia edilen tedavi edici özellikler şunlardır; yanıklar, hemoroid, yatak yarası, harici yaralar ve dermatitler. Bu özellikler, birçok eski metinde *Alkanna tinctoria* L. Tausch için iddia edilen tıbbi özelliklere (birbirlerinden bağımsız olarak) dikkat çekici bir şekilde benzemektedir. Shikonin ve onun türevlerini içeren çeşitli preparatlar, Çin, Japonya ve Kore'de hala tıbbi amaçlar için

kullanılmaktadır. Ayrıca Japonya'da boya maddesi ve kozmetikte de kullanılmaktadır. Alkannin kadar, shikonin için de iddia edilen tıbbi özellikler, son zamanlarda bilimsel olarak test edilmiştir [10-12].

Enantiyomerik naftokinonlar olan alkanin ve shikonin kadar, zengin tarihe sahip çok az doğal ürün vardır. Alkannin ve shikoninin ana parçası, bir naftokinon olan naftazarindir (5,8-dihidroksi-1,4-naftokinon, 64a; Şekil 2.2). Tarihte çoğunlukla mor boya olarak kullanılmıştır. *Lomatia obliqua*'nın ağaç kabuğunda ve *Juglans mandschurica Maxim* var. *sieboldianna* Makino'nun ceviz kabuklarında doğal olarak bulunur [13].

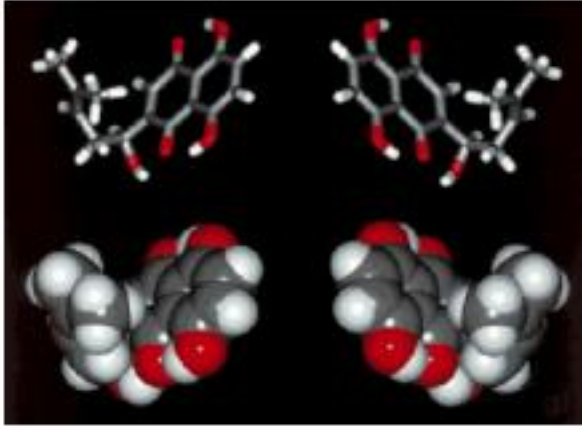


Şekil 2.2. Naftazarin yapıları [12].

Naftokinonlar, doğada geniş dağılım gösterirler ve yüzyıllardır kozmetikte ve çeşitli hastalıklara karşı ilaç olarak kullanılmaktadırlar. Deri ve saç boyası olarak kullanılan lavson (2-hidroksi-1,4-naftokinon) içeren, *Lawsonia alba* bitkisinin toz haline getirilmiş yapraklarından hazırlanan bir tür macun olan “Henna” önemli bir örnektir. Menadion (2metil-1,4-naftokinon), plumbacin (2-metil-5-hidroksi-1,4-naftokinon) ve lapakol (2-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftokinon) gibi bazı naftokinon ilaçları, Afrika uyku hastalığı (*Trypanosoma brucei rhodesiense* ve *Trypanosoma brucei gambiense*), Kala-azar (*Leishmania donovani*) ve Chagas hastalığı (*Trypanosoma cruzi*) gibi bazı insan hastalıklarından sorumlu farklı tripanozomlar ve *Leishmania* üzerinde tripanosidal (triplanozomları öldürücü) aktivitelere sahiptirler. 1,4-Naftokinon türevleri ilgi çekici ve çeşitli biyolojik yanıtlara da yol açmaktadırlar (antibakteriyel, antifungal, anti-enflamatuvar, antitrombotik, antiplatelet, antiviral, antikanser, antiallerjik, apoptoziz). 1,4-Naftokinon türevlerinin insan DNA topoizomeras I inhibitörü oldukları da kanıtlanmıştır. Enzimatik reaksiyon yoluyla semikinon ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini de üretmektedirler [14-29].

1,4-Naftokinonun biyolojik aktivitesi, bir ve/veya iki elektron alarak radikal anyon veya dianyon türleri oluşturan, iki karbonil grubunun varlığından kaynaklanmaktadır. 1,4-

Naftokinonun yapısındaki 5,8-dihidroksi gruplarının varlığı naftokinon halkasına elektrofilik özellik kazandırır. Bu nedenle, naftazarin (5,8-dihidroksi-1,4-naftokinon) türevlerinin biyolojik aktivitesi, kinon parçasının elektrofilik özelliğine bağlıdır. Ayrıca, 5,8-dimetoksi-1,4-naftokinon (DMNQ) oluşturan naftazarin metilasyonu, kinon parçasının C-2 ve C-3 karbonlarının göreceli elektrofilik özelliğini artırabilir. Bu, naftazarin ile karşılaştırılarak, DMNQ ve glutatyon tepkimesiyle kanıtlanmıştır [29,30].



Şekil .2.3. Alkanin (1) (sol) ve shikoninin (2) (sağ) bilgisayarda oluşturulan moleküler modelleri. Renk kodları; gri: karbon, beyaz: hidrojen, kırmızı: oksijen [11].

Wall. ve G. Don *O. hispida*'nın köklerinden elde edilen drogların bazı Asya ülkelerinde solucan düşürücü, bronşit ve hummayı tedavi edici, karın ağrısı ve kaşıntı giderici, yara ve yanıkların daha hızlı iyileştirici olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Aynı tür üzerinde yapılan mikrobiyal çalışmada köklerden elde edilen özütün bazı gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisi araştırılmış ve elde edilen verilere göre özellikle yiyeceklerin korunmasında kullanışlı olduğu öne sürülmüştür. Yapılan diğer bir çalışmada ise *O. hispida*'nın öksürüğü kesici olduğu vurgulanmıştır. Türün antidiyabetik etkisi Kumar tarafından araştırılmıştır. Diyabetli ratlar üzerinde yapılan çalışmada köklerden elde edilen ekstraktın kan glukoz değerlerini düşürmesinin yanı sıra normal bireylerde şeker toleransını arttırdığı tespit edilmiştir. Diyabet hastalığının tedavisinde kullanılacak ilaçların eldesin de türün kullanılabilirliği belirtilmiştir [8].

Farmakolojik araştırmalar, naftokinon etkinliğinin anti-enflamatuvar, anti-bakteriyel, anti-mantar, anti-viral (örn. grip virüsü ve HIV) ve anti-tümöral maddelere etkisini

kanıtlamıştır. Ayrıca, naftokinon pigmentler genellikle pH değişiklikleri bir sonucu olarak değişken renk göstermektedir. Bu nedenle, bunlar yaygın olarak gıda, ilaç, boyalar, vb. üretimi için kimya endüstrisinde kullanılmaktadır. Naftokinon pigment ile yapılan allık, pudra, ruj vs. gibi kozmetikler antiflojistik, antibakteriyel ve antiviral özelliklerin yanı sıra güçlü, kararlı boyama özelliklerine sahiptir [10].

Son zamanlarda önemli ve kapsamlı bilimsel araştırmalar, çeşitli tümörlere ve antikanser etki mekanizmalarına alkannin/shikonin etkinliğinin üzerinde yoğunlaşmış bulunmaktadır. *Alkanna*, *Macrotomia*, *Onosma* ve *Lithospermum* cinslerine ait çeşitli türlerin köklerinin yağlı özlerindeki alkanninler ve shikoninler yara iyileştirici özelliğe sahiptir [11].

Onosma cinsinin, geleneksel ilaç olarak dünya çapında çeşitli kullanımları vardır. *Onosma* türünün kökleri, Türkiye'de halk hekimliğinde ağrıları hafifletmenin yanı sıra bronşit, bademcik iltihabı, hemoroid gibi, çeşitli bozuklukların tedavisi için kullanıldığı belirtilmektedir. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde ise *O. fruticosa* Sibth. türünün kurutulmuş yaprakları kaynatılarak solunum yolları rahatsızlıklarının giderilmesinde kullanılmaktadır [31].

2.1.1. *Onosma halophila* Boiss. & Heldr

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classis : Magnoliopsida
Subclassis : Asteridae
Order : Lamiales
Family : Boraginaceae
Genus : *Onosma*
Species : *Onosma halophila* Boiss. & Heldr.

Çok yıllık, gövde yükselici, 15-20 (-25) cm, basit, yukarıya yönelik yatık tüylerle kaplıdır. Yapraklar 20-60 x 3-8 mm, lanseolat ile linear lanseolat, akut, kenarlar alta doğru kıvrık, her iki yüzeyde kısa yatık tüylü, üst yüzeyde yatık setos tüylü, setalar tuberküllerden yükselmekte; tuberküller alt yüzeyde belirsiz yada yok; taban yapraklar petiollü, gövde

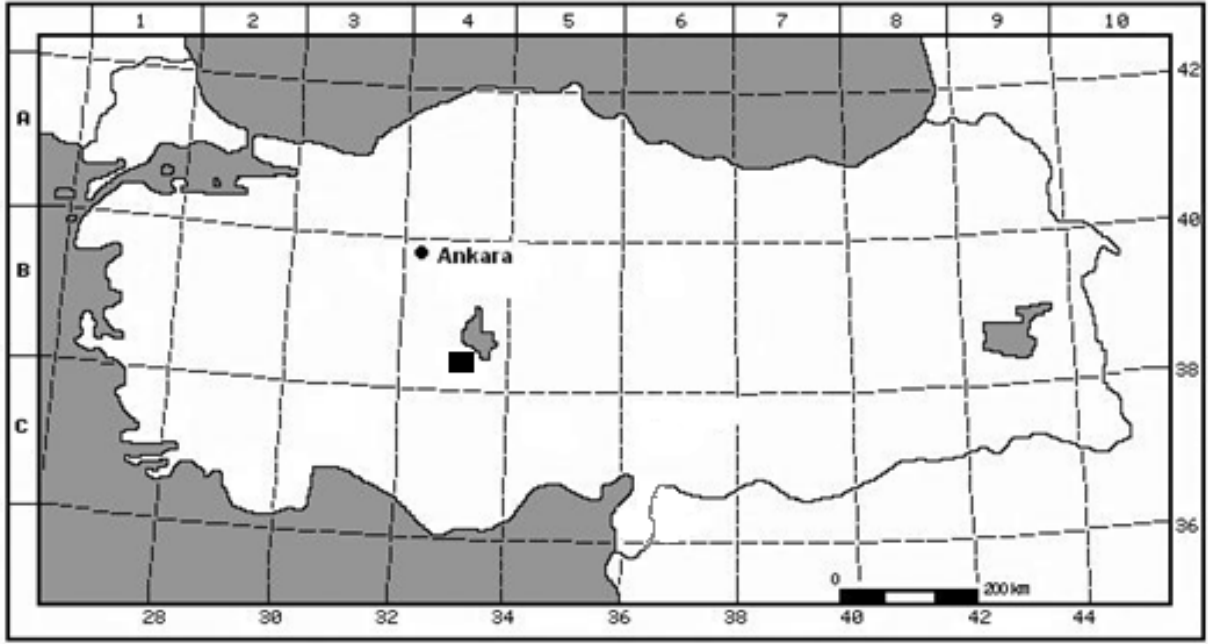
yapraklar sesildir. Inflorescence 1-2 kimöz. Brakteler gövde üst yaprakları gibidir. Kaliks 8-10 mm çiçekte, 10-12 mm meyvede, loblar linear-lanseolat, akut, yatık tüylüdür. Korolla krem, 17-20 mm, \pm kampanulat, glabros-küçük papillidir. Anterler korolladan taşmıyor, \pm filamentlere eşit. Nutletler 3 mm, ovoid, subakut, sırt kaburgası yok, grimsidir [103].



Şekil 2.4. *O. halophila*'nın çiçek görünümü



Şekil 2.5. *O. halophila*'nın genel görünüşü



Şekil 2.6. *O. halophila* yayılış alanı (■) [103].

Type: [Turkey C4 Konya] in planitie interiori Lycaoniae inter Koniah et montem Karadagh, vi 1845, *Heldreich* (holo. G! iso. E!).

Çiçeklenme Dönemi: Haziran

Habitat: Tuzcul stepler, 900-1050 m.

Endemik, Iran-Turan Elementi

Lokalite: B4 Aksaray, Eskil-Chanbeyli 2-4 km, tuzcul alanlar, 950 m, 07.07.2013 [103].

2.2. SÜPERKRİTİK AKIŞKANLAR

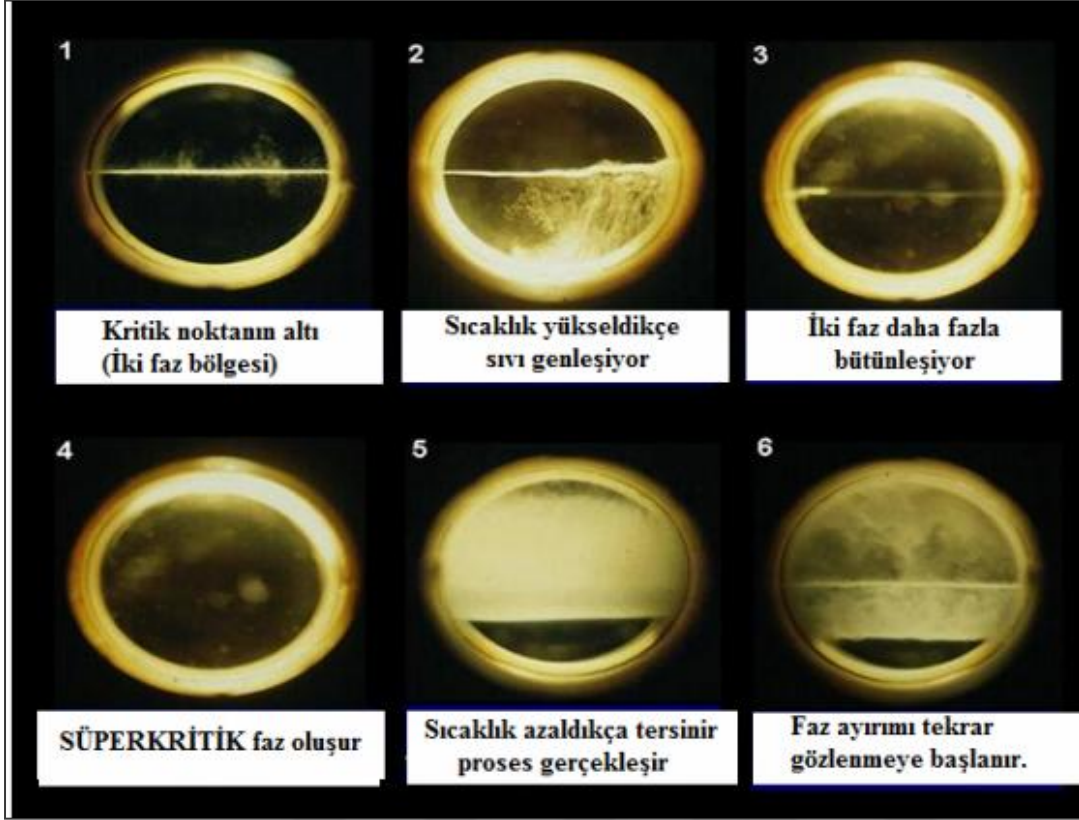
Son yirmi yılda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu artan bir ilgi ile bilinen ekstraksiyon metotlarına karşı ilginç alternatif bir metot olarak dikkat çekmektedir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, destilasyon, Soxhlet, sıvı ekstraksiyon ve sıvı kromatografisi gibi diğer metotlarla başarılabilen üstünlükleri sağlayan yeni bir metottur. Bu metot da çözgen tüketimi ve basamak sayısı azalmakta, analiz süresi kısalmaktadır. Çözgen tüketimi hacminin azaltılması sadece yüksek fiyatlardan kaçınmak açısından değil, çevresel faktörler bakımından da önemlidir. Süperkritik akışkanların önemli özelliği çözme gücünün

yoğunluktaki değişimler yolu ile kontrol edilebilmesidir. Farklı polarite ve molekül boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanımı ile ekstrakte edilebilmektedir. Ayrıca süperkritik akışkan hızı, süperkritik akışkanda moleküllerin difüzyon katsayıları bir sıvı ortamındakinden daha fazla olması nedeni ile yüksektir. Bu metot kolaylıkla otomatikleştirilebilmekte ve kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle birleştirilebilmektedir.

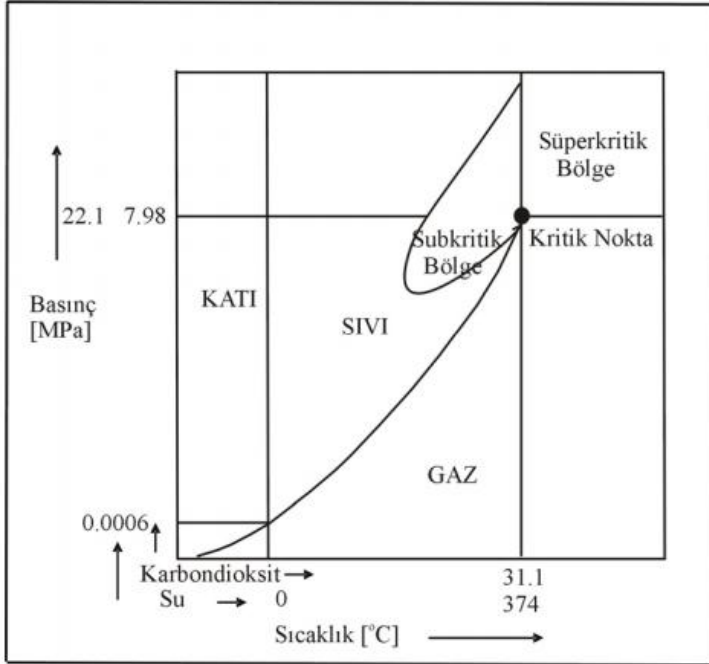
Bir maddenin kritik noktası ilk kez Baron Cagniardde'la Tour tarafından 1822'de gözlenmiştir. 1879'da Hannay ve Hogart metal halojenürler gibi katı maddelerin süperkritik metanol ve karbon tetraklorür de çözüldüğünü rapor etmişlerdir. Francis 1954'de yayımladığı bir makalede 261 tane farklı bileşenin süperkritik CO₂'de çözüldüğünü belirtmiştir. 1980'lerden sonra süperkritik sıvıların analitik kimyada uygulamalarda büyük gelişme göstererek hızla pek çok endüstriyel alanda yer almaya başlamıştır. Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) süperkritik akışkan ekstraksiyon metotlarının gelişimi için çaba göstermektedir [32,33].

2.2.1. Süperkritik Akışkanın Tanımı

Bir madde için kritik sıcaklık (T_c), basınç değeri ne olursa olsun, o sıcaklığın üstünde maddenin sıvı faz olarak bulunamayacağı değerdir. Maddenin kritik sıcaklığındaki buhar basıncına kritik basınç (P_c) denilmektedir. Böylece maddenin, hem sıcaklığı hem de basıncı kritik noktanın üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı yeni bir bölge ortaya çıkmaktadır ve bu bölgedeki akışkan "süperkritik akışkan" olarak tanımlanmaktadır. Süperkritik akışkanların oluşum süreci Şekil 2.7'de ve saf bir madde için sıcaklık-basınç diyagramı Şekil 2.8'de belirtilmiştir. Kritik nokta bütün maddeler için karakteristik özellik göstermektedir. Süperkritik akışkanların yoğunlukları, viskoziteleri ve diğer özellikleri, maddenin gaz ve sıvı fazındaki özellikleri arasında yer almaktadır. Süperkritik akışkanların çözücü etkisi göstermesi gibi pek çok avantajları vardır. Süperkritik bölgede bazı bileşikler çok iyi çözünebilmekte ve çözünürlüğü düşük olan bileşiklerin bu bölgede çözünürlüğü arttırılabilmektedir. Çizelge 2.1'de bazı bileşiklerin kritik özellikleri belirtilmiştir [34].



Şekil 2.7. Süperkritik akışkanın oluşum süreci [93].



Şekil 2.8. Su ve CO₂ için sıcaklık-basınç diyagramı [35].

Çizelge 2.1. Bazı çözücülerin kritik özellikleri [34].

| Çözücü | T_c (°C) | P_c (bar) | P_c (g/mL) |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Karbondiyoksit | 31.1 | 72 | 0.47 |
| Azotdioksit | 158 | 98.7 | 0.27 |
| Amonyak | 132.5 | 109.8 | 0.23 |
| Su | 374.2 | 214.8 | 0.32 |
| Helyum | -268 | 2.2 | 0.07 |
| Hidrojen | -240 | 12.6 | 0.03 |
| Ksenon | 17 | 56.9 | 1.11 |
| Metan | -82 | 46.0 | 0.169 |
| Etan | 32.3 | 47.6 | 0.2 |
| n-Hekzan | 234.2 | 28.9 | 0.23 |
| Benzen | 288.9 | 98.7 | 0.302 |
| Toluen | 319 | 41.1 | 0.292 |
| Metanol | 239 | 78.9 | 0.27 |
| Etanol | 243.4 | 72 | 0.276 |
| İzopropil Alkol | 235.3 | 47.6 | 0.273 |
| Dietileter | 193.6 | 63.8 | 0.267 |
| Aseton | 235 | 47.0 | 0.279 |
| Asetonitril | 275 | 47 | 0.25 |

2.2.2. Süperkritik Akışkanların Özellikleri

Kritik noktada maddelerin birçok özelliği değişim göstermektedir. Bu özelliklerin değişmesiyle süperkritik akışkanların çözücü etkisi artmakta, kromatografi ve ekstraksiyon metodlarının uygulamalarında büyük bir önem kazanmaktadır [34-36]. Sıvıların, gazların ve süperkritik akışkanların bazı fiziksel özellikleri Çizelge 2.2'de belirtilmiştir. Süperkritik akışkanların genel özellikleri Şekil 2.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Sıvıların, gazların ve süperkritik akışkanların bazı fiziksel özellikleri.

| Fiziksel Özellik | Gaz | Süperkritik Akışkan | Sıvı |
|-----------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| Yoğunluk (g/cm ³) | (0.6-2)x10 ⁻³ | 0.2-0.5 | 0.6-2 |
| Difüzyon Katsayısı (cm ² /s) | (1-4)x10 ⁻¹ | 10 ⁻³ -10 ⁻⁴ | (0.2-2)x10 ⁻⁵ |
| Viskozite (g/cm.s) | (1-3)x10 ⁻⁴ | (1-3)x10 ⁻⁴ | (0.2-3)x10 ⁻² |

2.2.2.1. Yoğunluk

Süperkritik akışkanların yoğunlukları, sıcaklığa ve basınca bağlı olarak, sıvı ve gaz akışkanların yoğunluklarına yakın değerdedir. Süperkritik bölgede yoğunluk, sabit sıcaklıkta, basıncın azalmasıyla ani düşüş gösterirken, sabit basınçta, sıcaklığın azalmasıyla artış göstermektedir [34-36]. Süperkritik akışkanların sıcaklık ve basınçla değişen yoğunluk eğrisi Şekil 2.10'da gösterilmektedir.

2.2.2.2. Difüzyon Katsayısı

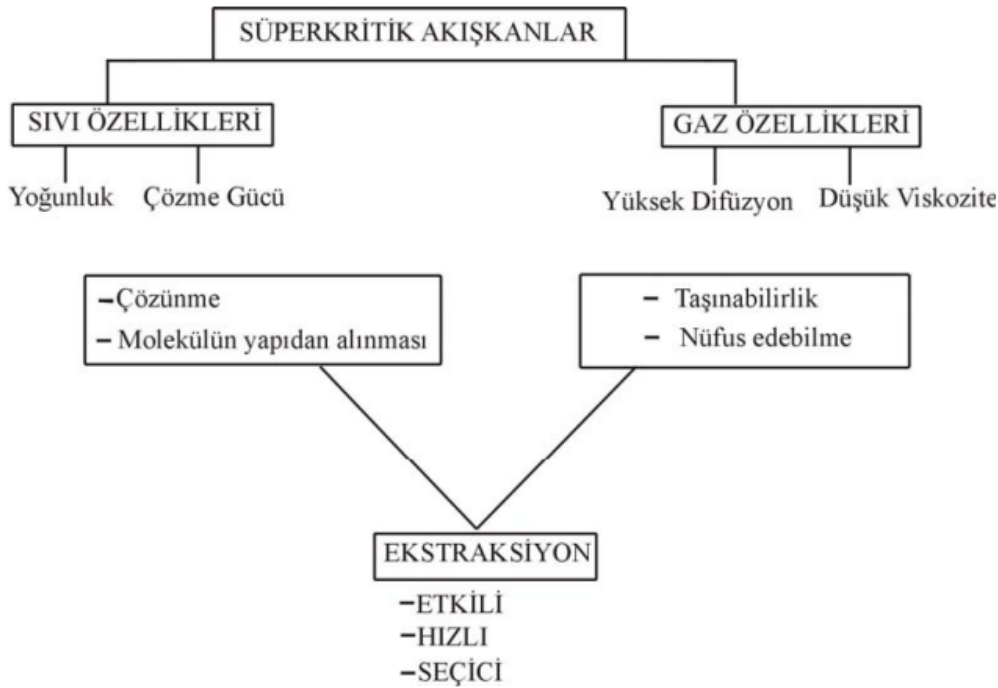
Süperkritik akışkanların difüzyon katsayısı, normal koşullar altındaki akışkanların difüzyon katsayısından daha büyüktür. Difüzyon katsayısı basıncın azalmasıyla veya sıcaklığın artmasıyla artmaktadır. Yüksek difüzyon katsayısı akışkanlarda hızlı kütle transferi sağlamak ve bileşiklerin ekstraksiyonu ve kromatografik uygulamalarına olanak vermektedir [34-36]. Süperkritik akışkanların sıcaklık ve basınçla değişen difüzyon eğrisi Şekil 2.11'de gösterilmektedir.

2.2.2.3. Viskozite

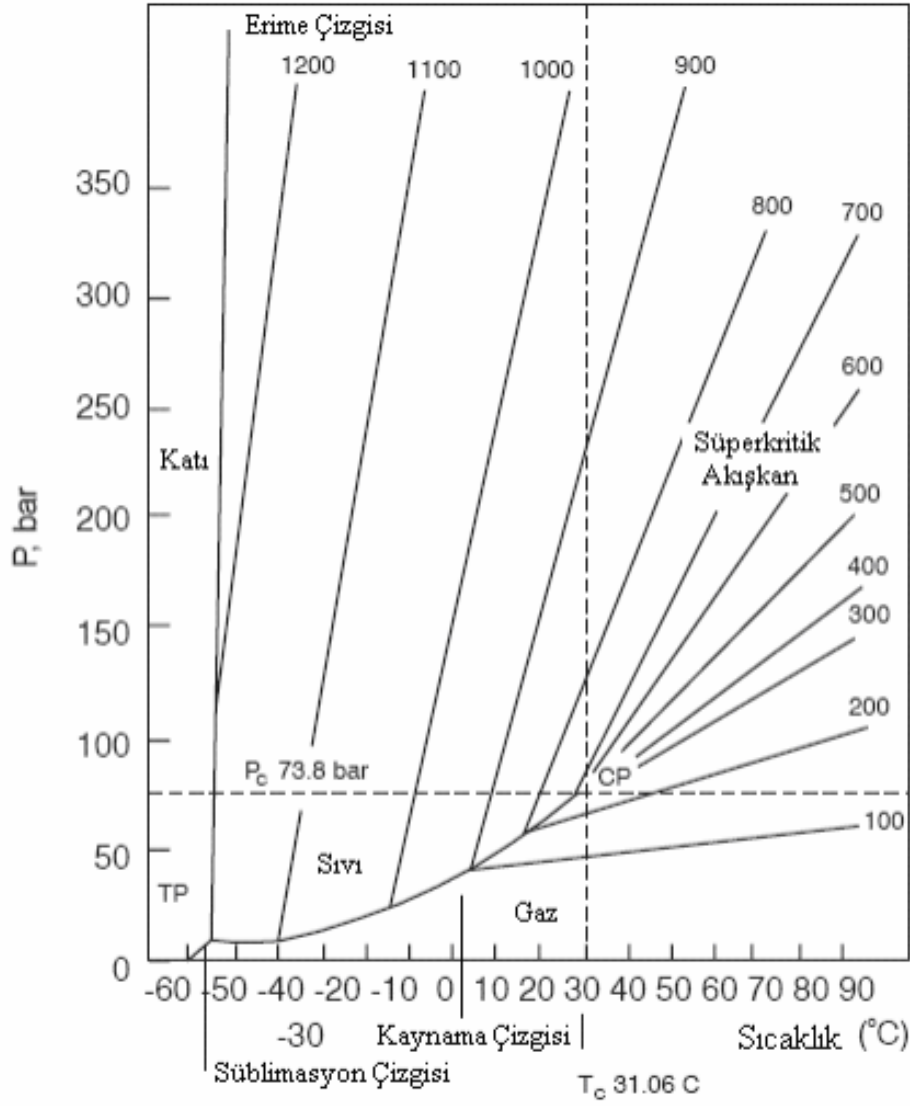
Süperkritik akışkanların viskozitesi, sıvı ve gazların viskoziteleri arasında yer almaktadır. Gaz veya akışkanlarda olduğu gibi süperkritik akışkanlarda da viskozite, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak davranmakta fakat basınç değişimlerinde akışkanlarla benzer özellik göstermemektedir [34-36]. Süperkritik akışkanların sıcaklık ve basınçla değişen viskozite katsayısı eğrisi Şekil 2.12'de gösterilmektedir.

2.2.2.4. Isıl İletkenlik

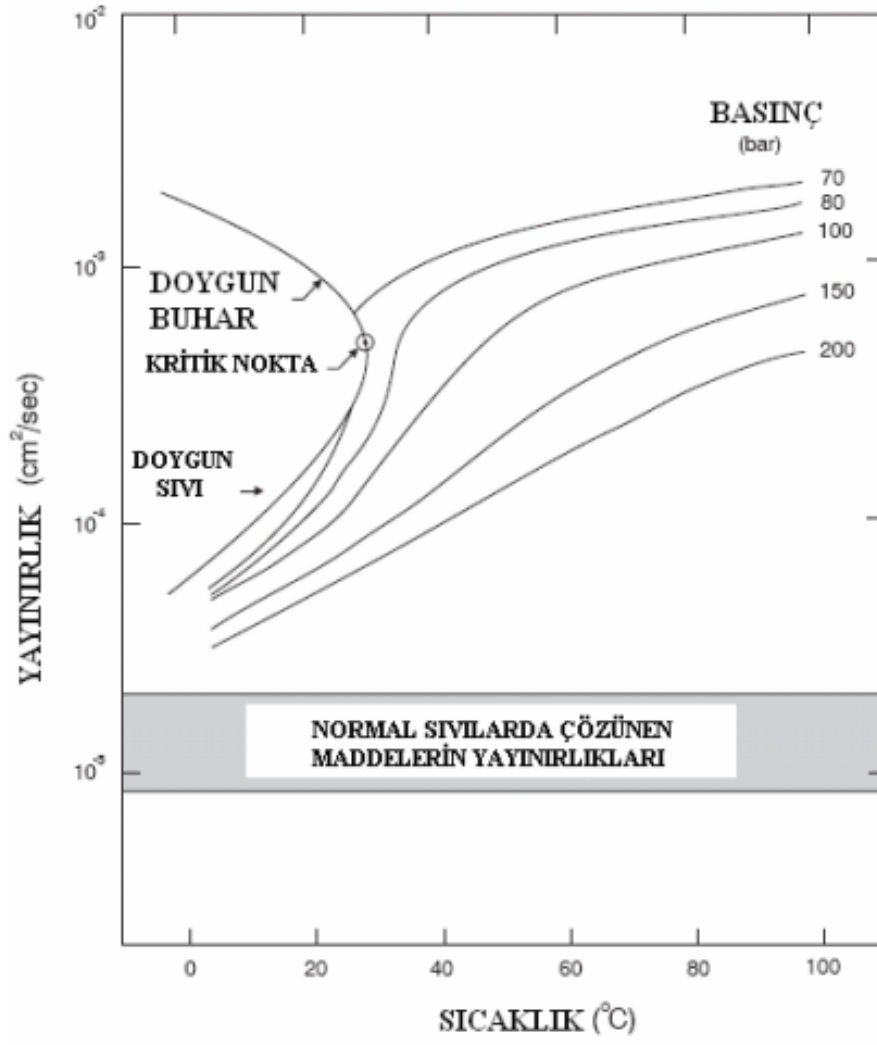
Isıl iletkenlik (λ), sıcaklık, basınç ya da sıvının yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Süperkritik şartlarda ısıl iletkenlik sıcaklığın artması ile azalmaktadır. Çoğu süperkritik akışkan için herhangi bir basınçta en düşük değerden geçer ve sonra artan sıcaklık ve yoğunlukla artış gösterir [37]. Süperkritik akışkanların ısıl iletkenliğinin yoğunlukla değişimi Şekil 2.13'de gösterilmiştir.



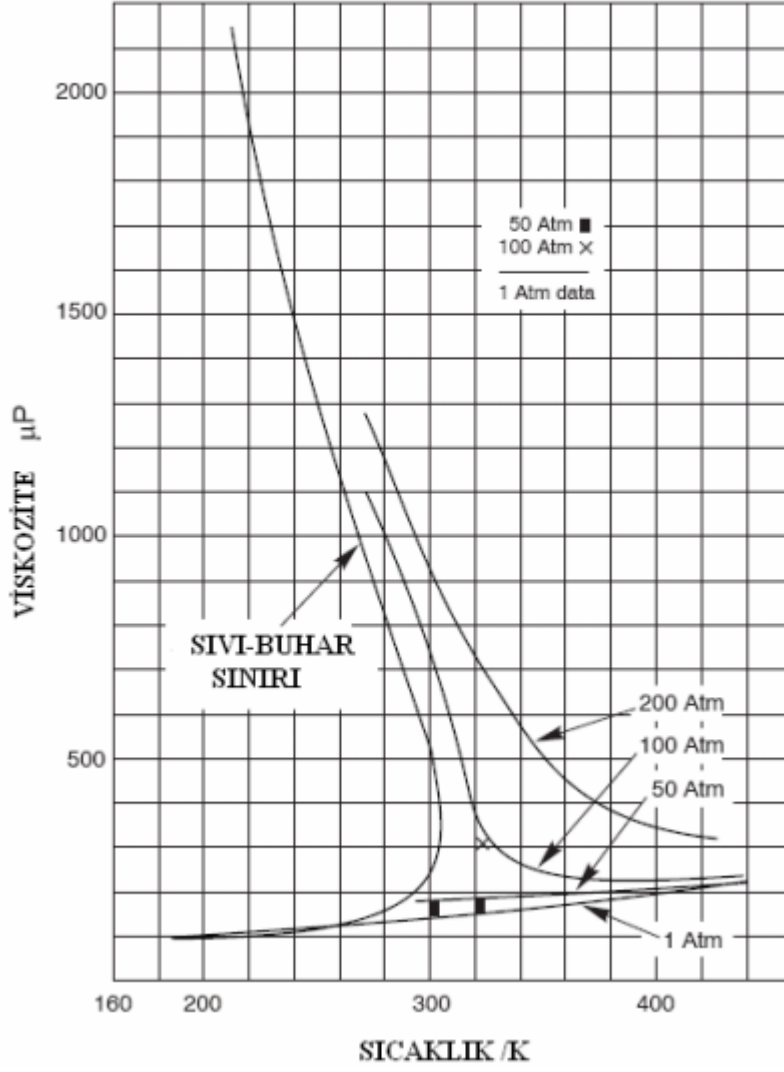
Şekil 2.9. Süperkritik Akışkanların Özellikleri [38].



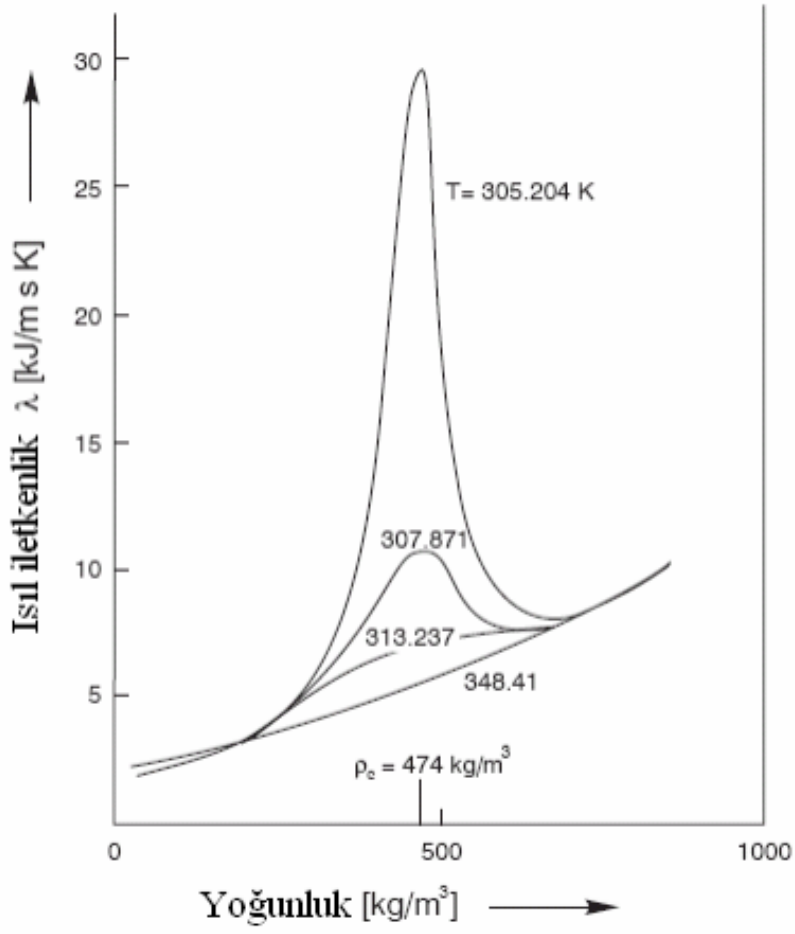
Şekil 2.10. Karbondioksitin yoğunluğunun sıcaklık ve basınçla değişim diyagramı [37].



Şekil 2.11. Süperkritik karbondioksitin yayımlığı [37].



Şekil 2.12. Süperkritik karbondioksitin viskozite değişimi [37].



Şekil 2.13. Kritik nokta yakınında CO_2 'in ısı iletkenliği [37].

2.2.3. Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları

Süperkritik akışkan süreçleri, bilimsel ve teknolojik açıdan hızla gelişen bir alan haline gelmiştir [39]. Son yıllarda Almanya başta olmak üzere ABD ve Japonya'da bu konuyla ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Çözünürlüğünün ayarlanabilir olmasından dolayı, süperkritik akışkanlar (başta süperkritik karbondioksit olmak üzere) ayırma ve saflaştırma, kromatografi, polimerizasyon ve fraksiyonlama, tanecik tasarımı, biyoteknoloji, yağların modifikasyonu, suların arıtılması gibi çok değişik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Özellikle, doğal ürünlerin süperkritik akışkan kullanılarak ekstrakte edilmesine, fraksiyonlanmasına veya saflaştırılmasına dayalı olarak son 20 yıl içerisinde gerçekleştirilmiş araştırmalardan ve süreç geliştirme çalışmalarından elde edilen ümit verici sonuçlar araştırmacıları ekstraktif olmayan uygulama alanlarında da yoğun araştırmalara yöneltmiştir [40]. Süperkritik akışkan uygulamaları endüstride daha çok geçmişte doğal maddelerin ekstraksiyonu, kahveden kafeinin giderilmesi, bitki tohumlarından yağ ekstraksiyonu, kömür ve petrolden kimyasal maddelerin ekstraksiyonu gibi süreçlere yoğunlaşmıştır [41-44]. Genel olarak süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen uygulamalara bakılacak olursa [45];

Gıda

- Çay ve kahveden tein ve kafeinin giderilmesi
- Tütünden nikotin ve katranın uzaklaştırılması
- Yağlı çekirdeklerden yağ ekstraksiyonu
- Aroma ekstraktlarının hazırlanması
- Kolesterolün uzaklaştırılması
- Narenciye sularının acılığının giderilmesi
- Yağ ve aromaların fraksiyonlanması
- Şerbetçi otu ekstraktı eldesi
- Tütün hücresi genişmesi
- Reçel sterilizasyonu

Eczacılık

- Doğal ürünlerden aktif bileşenlerin ekstraksiyonu
- Biyokimyasal karışımların ayrılması

- Tanecik tasarımı, yüksek basınç mikronizasyonu ve püskürtmeli kurutma (toz halinde aktif madde üretimi) : * RESS *SAS *GAS *SEDS
- Kristalizasyon (kaplama)
- Yüksek basınç sterilizasyonu

Polimer

- Polimerizasyon, polimerik köpüklerin üretimi, polimer aşılama
- Polimerlerin fraksiyonlanması
- Kaplama
- Polimer işleme

Malzeme

- İmplant malzemelerin tasarımı
- Mikro- ve nanotaneciklerin tasarımı
- Aerojel eldesi
- Otofretaj
- Su jetiyle kesme/temizleme

Kimyasal İşlemler

- Düşük buhar basınçlı yağların fraksiyonlanması veya saflaştırılması
 - Seramik işleme
 - Aktif karbon rejenerasyonu
 - Polar ve polar olmayan bileşenlerin ayrılması

Çevre

- Sulu çözeltilerden organik atıkların uzaklaştırılması
 - Süreç akımlarından toksik malzemelerin uzaklaştırılması
 - Topraktan ağır metallerin uzaklaştırılması

Hidrokarbon İşlemleri

- Kömür sıvılaştırma
- Kömürden gazlaşabilir maddeler ve yağların ekstraksiyonu
- Yağlardan asfaltın uzaklaştırılması

- Kalıntı ekstraksiyonu
- Jeolojik oluşumlardan yağ ve gaz kazanımı

Yüzey İşlemleri

- Tekstil boyama (polietilen elyafları)
- Tekstil temizleme ve kuru temizleme

Reaksiyon

- Fischer-Tropsch sentezi
- Diels-Alder Reaksiyonu
- Hidrojenasyon
- Alkilleme
- Oksidasyon (sc-H₂O oksidasyonu)
- Transesterifikasyon (biyodizel)
- Biyoreaksiyonlar
- Hidroformülasyon

Analitik

- Süperkritik Akışkan Kromatografisi

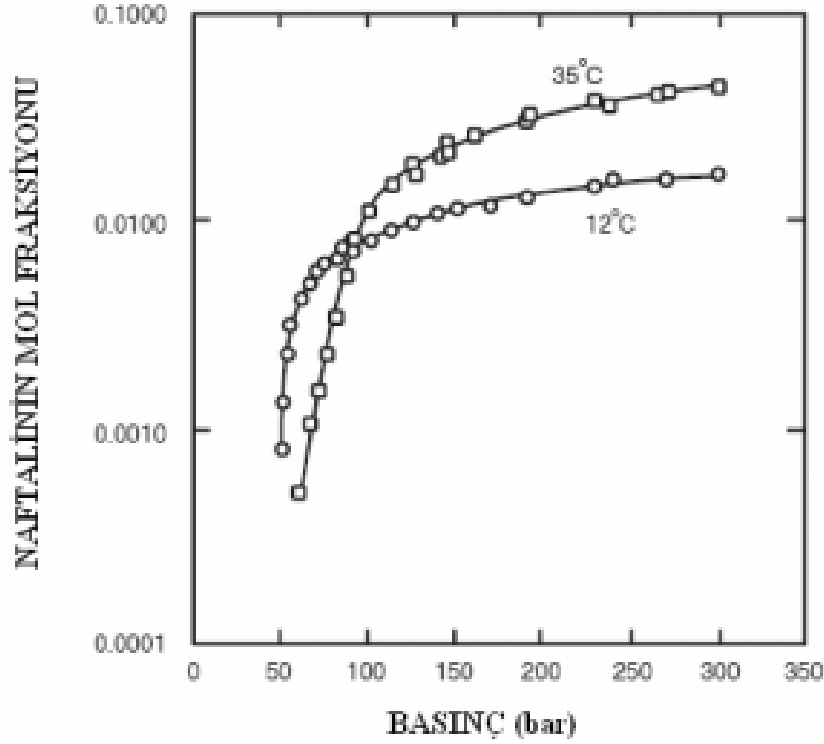
2.2.4. Süperkritik Akışkanın Seçimi

Süperkritik akışkanın seçimi kullanılacağı uygulama alanına göre değişkenlik göstermektedir. Bu seçimde analit maddenin süperkritik akışkan içindeki çözünürlüğü, akışkanın kolay ve ekonomik olması ile birlikte çevre ve insan sağlığı bakımından güvenilir olması gibi etkenler ilk sıralarda yer almaktadır. Bazı inorganik ve organik süperkritik akışkanlar ile bu akışkanların sahip olması gereken özellikler Çizelge 2.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Bazı süperkritik akışkanların avantaj ve dezavantajları [38].

| Özellik | İnorganik | | | Organik | | |
|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|---------|----|------|
| | CO ₂ | H ₂ O | N ₂ O | CFCs | HK | MeOH |
| Toksosite | + | + | | + | + | - |
| Tutuşabilirlik | + | + | | + | - | - |
| Maliyet | + | + | | + | + | - |
| Reaktiflik | + | - | - | + | + | - |
| SCF koşullara ulaşabilme | + | - | + | + | + | - |
| kolaylığı | | | | | | |
| Çevreye zararlılık | + | + | | | | |
| NŞA'da gaz olabilme | + | - | + | | - | |
| Dedektöre uygunluk | + | | | | - | |
| Polarite | - | + | + | + | - | + |

Çizelge 2.3'e bakıldığında zaman süperkritik akışkanların sahip olması gereken özellikler bakımından en uygun çözücü tespit edilebilmektedir. Süperkritik akışkanlar içerisinde zehirli olmaması ve alev almaması ayrıca süperkritik şartlara kolay ulaşması (74 atm ve 31 °C üstü) nedeniyle karbondioksit çok yaygın olarak saflaştırma, kristallendirme ekstraksiyon ve sentez işlemlerinde sıkça kullanılmaktadır. Diğer süperkritik akışkanlarda olduğu gibi karbondioksitinde çözme gücü basınç ve sıcaklığın kritik nokta üzerinde artırılmasıyla artırılabilir. Bunun en güzel örneği naftalinin çözünürlüğüdür. 75 atm ve 45 °C de naftalinin çözünürlüğü % 0 iken basınç 100 atm'e çıkarıldığında naftalinin çözünürlüğü % 10 civarına yaklaşmaktadır (Şekil 2.14). Çözme gücünün basınç ve sıcaklıkla bu derece değişmesi CO₂'i ekstraksiyonda çözücü olarak kullanılması için önemli bir avantaj sağlamaktadır [48].



Şekil 2.14. Naftalinin CO₂'deki çözünürlüğü [37].

Süperkritik akışkanların yayıncılık özelliği katılara kolaylıkla difüzenmeyi sağlamakta, yüksek yoğunluk akışkanın çözücü gücünü arttırmaktadır. Bu açıdan şifalı bitkilerden aktif bileşiklerin ayrılması için etkili bir ekstraksiyon tekniğidir [47].

Birçok sıvı ve gazın sıcaklığı ve basıncı düzenlenerek süperkritik akışkan haline getirilebilse de, özellikle karbondioksit bir takım üstünlükleri nedeniyle daha sıklıkla kullanılmaktadır. Süperkritik koşullarda karbondioksitin difüzyon katsayısı ve çözünürlüğünün yüksek, buharlaşma entalpisi, viskozitenin ve maliyetinin düşük olması, toksik olmaması ve oksidatif reaksiyonları önlemesi gibi özellikleri dikkate alındığında süperkritik akışkanlar içinde en uygun çözücü olduğu görülmektedir [48]. Karbondioksit, endüstriyel işlemler sonucunda yan ürün olarak oldukça fazla üretilmektedir, bununla birlikte süperkritik akışkan olarak kullanılacak bir diğer madde olan su da doğada bulunan saf ve ucuz bir akışkan olması gibi avantajların yanında kritik sıcaklığının oldukça yüksek olması (374.2 °C) kullanım alanına birtakım sınırlandırmalar getirmektedir.

2.2.5. Süperkritik Akışkanların Çözme Gücü

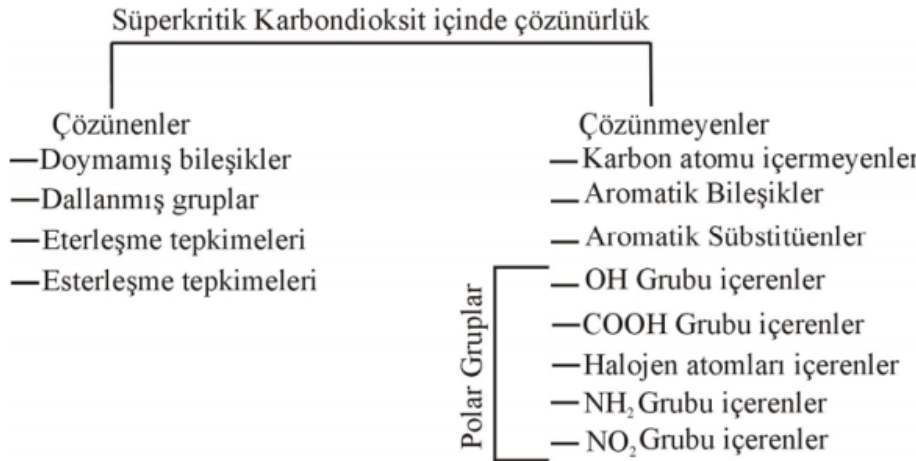
Akışkanların çözme gücü yoğunluğa bağlı olarak değişmektedir. Klasik organik çözücülerde çözme gücü temel olarak çözücünün basıncına bağımlı olmakla birlikte çözücünün yoğunluğundan bağımsız bir davranış sergilemektedir. Süperkritik akışkanların çözme gücü, o akışkanın yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Süperkritik bölgede yoğunluk sabit sıcaklıkta basıncın artırılması ile keskin bir şekilde artmakta bununla birlikte sabit basınçta sıcaklığın artırılması ile azalmaktadır. Bu veriler doğrultusunda sabit sıcaklıkta ve düşük basınçlarda apolar ve kısmen polar olan bileşiklerin, bununla birlikte yüksek basınçlarda ise polar ve yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerin çözünürlüğünde artış olmaktadır [38].

Akışkanların çözme gücünü etkileyen bir diğer faktör de polariteleridir. Karbondioksit zayıf polariteye sahip polar çözücülere benzediğinden dolayı apolar çözücüler grubunda sınıflandırılmaktadır, bununla birlikte moleküldeki karbon atomunun dört kutuplu bir düzene sahip olması karbondioksitin sınırlı olsa alkolleri, esterleri ve aldehytleri çözmesine olanak sağlamaktadır. Karbondioksitin polaritesinin artırılması ve polar maddelerin ekstraksiyonuna olanak sağlamak amacıyla polaritesi yüksek bir takım organik çözücüler eklenebilmektedir, bu maddeler yardımcı çözücü (modifier, entrainer) olarak adlandırılmaktadırlar [48]. Bununla birlikte süperkritik karbondioksit içinde çözünen maddelerin kısmi molar entalpileri ve kısmi molar hacimleri çözünürlük gücünü etkileyen parametreler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ortamda çözünen maddenin yapısına bağlı olarak, düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonlar ve lipofilik organik bileşikler kolaylıkla çözünürken, yüksek molekül ağırlığına sahip hidrokarbonlar ve bunların polimerleri kolaylıkla ekstrakte edilemezler. Karbondioksit, hidroksil, karboksil gruplarını içeren moleküller ile aminoasitler ve şekerler için uygun çözücü değildirler. Doğal maddelerin süperkritik karbondioksitteki çözünürlükleri Çizelge 2.4'de gösterilmiştir [48,49].

Çizelge 2.4. Doğal maddelerin süperkritik CO₂'deki çözünürlükleri [48,49].

| Çok çözünenler | Zayıf çözünenler | Kısmen çözünenler |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Molekül ağırlığı 250'den düşük olan kısmen polar ve apolar bileşikler (mono ve seskiterpenler, tioller, parazinler, asetik asit, benzaldehit,hekzanol, gliserol, asetatlar) | Molekül ağırlığı 250 ile 400 arasında değişen organik bileşikler (Oleik asit, dekanol, C ₁₂ 'nin üzerindeki doymuş yağlar) | Molekül ağırlığı 400'den büyük olan organik bileşikler (Şeker,proteinler, vakslar,inorganik tuzlar,pestisitler,klorofiller, karotenoidler. |

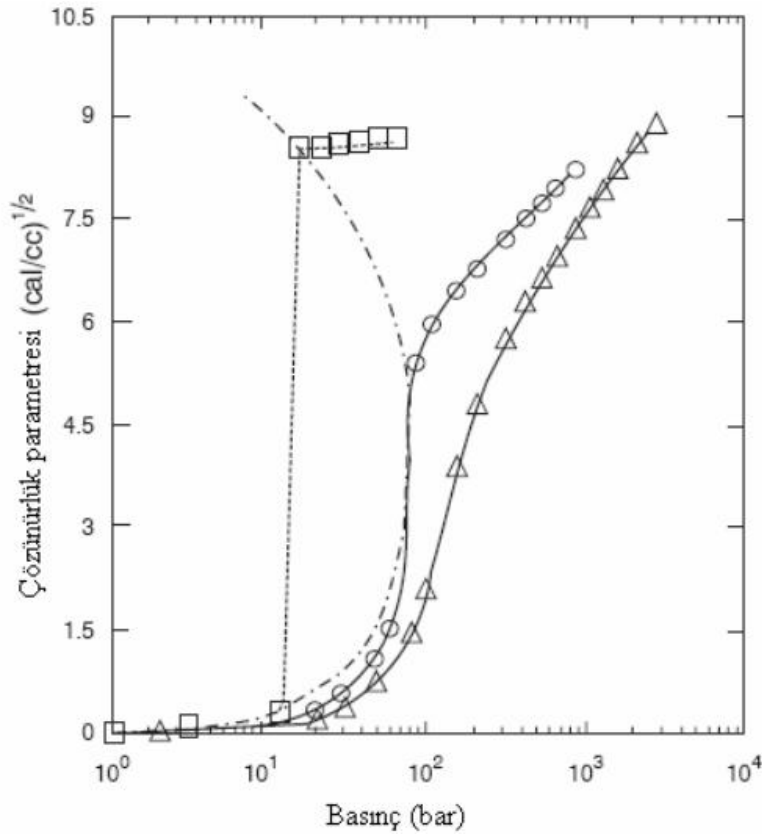
Süperkritik karbondioksit içinde çözünürlük sınıflandırması Şekil 2.15'de belirtilmiştir.



Şekil 2.15. Süperkritik CO₂ içinde bileşiklerin çözünürlüğü [38].

Gibbs serbest enerjisi değişimi negatif olduğunda çözünme gerçekleşir. Gibbs serbest enerji değişiminin negatif olup olamayacağını karışma entalpi ve entropisinin işareti ve büyüklüğü belirler. Polar olmayan moleküller için entalpi değişimi pozitifdir. Bu durumda birim hacim başına karışma ısı Hildebrandt tarafından; $\Delta H = v_1v_2(\delta_1 - \delta_2)^2$ eşitliği ile verilmiştir. ΔH moleküller arasındaki bağların parçalanma ve birleşmesi sonucu ortaya çıkan

enerji değişimini, v_1 ve v_2 ise sırasıyla çözücü ve çözünenin kısmi hacimlerini δ_1 - δ_2 ise sırasıyla çözücü ve çözünenin çözünürlük parametrelerini göstermektedir. δ_1 - δ_2 arasındaki fark 1.7-2.0'den daha küçükse karışımın olacağı varsayılır. Fark 2'nin üzerindeyse karışma mümkün değildir. (Hidrojen bağı söz konusu değilse geçerlidir) [38]. Basınca bağlı olarak değişen çözünürlük parametresi değerleri Şekil 2.16'da belirtilmiştir.



Şekil 2.16. CO₂ için Hildebrandt çözünürlük parametresi, (□) 30 °C, (o) 31 °C, (Δ)70 °C [50].

2.3. EKSTRAKSİYON TEKNİKLER

Bitkiler belirli oranlarda bioaktif bileşikler içermektedirler. Bitki ekstraktları gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde geniş çapta kullanılmaktadır. Bununla bağlantılı olarak elde edilen doğal bileşiklerin ticarileştirilmesi amacıyla ekstraksiyon metotları geniş çapta araştırılmaktadır. İdeal bir ekstraksiyon süreci hızlı, basit ve ucuz olmalıdır. Ekstrakte edilen maddeler kayıp ve bozunmaya uğramadan elde edilmeli, ilaveten bir saflaştırma

gerektirmemeli ve atık çözücü içermemelidir. Genelde çözücü ekstraksiyonu bu koşulları sağlamakta yetersiz kalmaktadır. Çözücü ekstraksiyonu basit, ucuz ve kuramsal olarak yerleşmiş bir yöntemdir fakat birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bunların en başında yüksek ısı ve çözücü tüketimi gelmektedir. Genelde çevre, sağlık ve güvenlik açısından zararlı çözücüler kullanılır. Kullanılan ısı ve çözücüler ürün kalitesini etkiler, dolayısıyla ısı bozunmaya uğrayan hassas maddelerin ekstraksiyonu için geleneksel çözücü ekstraksiyonu uygun bir yöntem değildir. Ayrıca ekstraksiyon işleminden elde edilen alt akım seyreltiktir. Hedef ürünün çözücülerden ayrılıp derişiklendirilmesi için ek bir ayırma işlemine gerek duyulur. İşlem süresi uzun ve işletme maliyeti yüksektir. Tüm bunlardan dolayı alternatif ekstraksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur [51,52]. Soxhlet ekstraksiyonu ile birlikte bu yeni ekstraksiyon teknikleri;

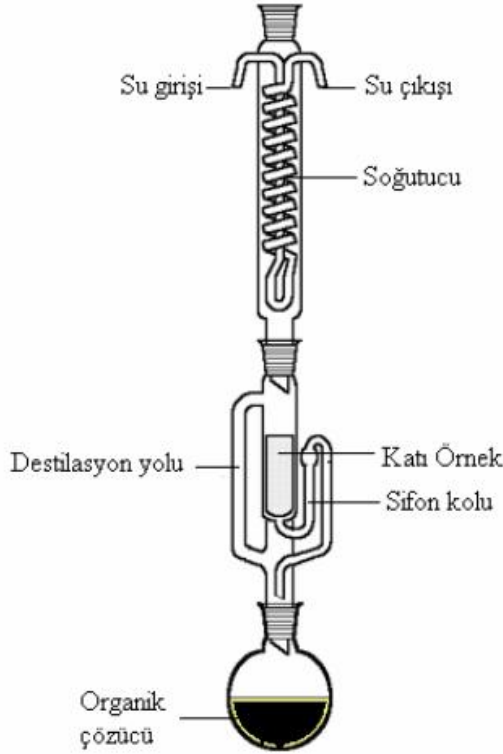
- Soxhlet Ekstraksiyonu
- Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu
- Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
- Subkritik Akışkan Ekstraksiyonu

olarak belirtilebilir. Bu teknikler ile yüksek sıcaklık ve basınçta çalışmak mümkün olmakta ve ekstraksiyon zamanı dikkat çekici bir şekilde azaltılmaktadır.

2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraktörü; 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından katı bir deney numunesinden yağ ekstrakte edilmesi amacıyla icat edilen bir laboratuvar cihazıdır. Yağ ekstrakte etmek için tasarlanmış olmasına rağmen bir bileşigi bir katıdan ekstrakte etmek zor olduğu her şartta kullanılabilir. Genellikle, kuru deney numunesi Soxhlet ekstraktörüne yerleştirilen, filtre kağıdından yapılmış yüksük şeklinde bir ekstraksiyon tüpüne konur (Şekil 2.17). Ekstraktöre, çözücüye 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, bypass kolunun seviyesine ulaşır ve sifon oluşarak çözücü tekrar cam balona boşalır. Bu yoğunlaşma, yükselme ve sifon döngüsü, 'reflux' olarak adlandırılır ve sürekli tekrar edilir. Her döngü sırasında, katımın içerdiği bir miktar yağ çözücüde çözünür. Ama çözücünün ısıtılan cam balonuna ulaştığında orada kalır, döngüye tekrar katılmaz. Bu durum, bu ekstraksiyon metodunun en önemli avantajıdır, sadece saf

çözücü, katıyı ekstrakte etmek için buharlaşır ve yoğunlaşır, döngüye katılır. Bu nedenle, bir cam balonda katıyı çözücü içerisinde ısıtarak ekstarkte etme yöntemiyle karşılaştırıldığında Soxhlet ekstraktörü ile uygulanan bu yöntemin verimi daha yüksektir. Bir ekstraksiyonun sonunda arta kalan çözücü, ekstrakte edilen yağı bırakarak rotary buharlaştırıcısı ile uzaklaştırılabilir [53].



Şekil 2.17. Soxhlet düzeneği [53].

Soxhlet ekstraksiyonu matriksin karakterine ve tanecik boyutuna (iç difüzyonun sınırlandırılması ile ilgili) önemli ölçüde bağlıdır. Bu ekstraksiyon tekniğinin avantajları arasında, çözücünün transfer dengesinin katı matriksle tekrarlanan bir şekilde etkileşmesinden dolayı sürekli değişmesi, ekstraksiyondan sonra filtreleme işlemine gerek duyulmaması, metodun basit ve ucuz olması gösterilebilir. Bununla birlikte ekstraksiyon zamanının çok uzun olması, çok miktarda çözücü kullanılması, prosesi hızlandırmak için balonun çalkalanmaması ve termal olarak bozulmaya duyarlı bileşiklerin yüksek sıcaklıkta ekstrakte edilememesi bu metodun dezavantajları olarak gösterilebilir. Genel olarak bakıldığında, iyi uygulanan bir metottur ve endüstriyel prosesler de daha etkili ve iyi tekrarlanabilirlik

göstermesi, ekstrakta daha az manipulasyon olması diğer metotlara kıyasla üstün özellikleridir [54].

2.3.2 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, bileşenlerin ana yapıdan ayrılması esnasında çözücü olarak süperkritik akışkanın kullanıldığı metottur. Son yıllarda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu gitgide artan ilgi ile bilinen ekstraksiyon metotlarına karşı ilginç alternatif bir metot olarak dikkat çekmektedir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, su buharı destilasyonu, Soxhlet, sıvı ekstraksiyon ve sıvı kromatografisi gibi diğer ekstraksiyon yöntemleri ile gerçekleştirilemeyen pek çok uygulamayı sağlayan yeni bir yöntem olarak sunulmaktadır.

2.3.2.1 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Avantajları

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, sahip olduğu birtakım avantajlar nedeniyle klasik çözücü ekstraksiyon metotlarının yerini almaktadır, bu avantajlar sıralayacak olursak;

1. Süperkritik akışkanlar difüzyon katsayılarının yüksek ve viskozitelerinin düşük olmasından dolayı normal akışkanlara göre katılara daha hızlı nüfuz edebilmektedir. Yüksek difüzyon katsayısı gözeneklerdeki kütle aktarım dirençlerinin azalmasına neden olmaktadır. Bunun yanında süperkritik karbondioksit düşük yüzey gerilimine sahip olduğundan gözenekli katılara daha iyi nüfuz etmekte ve kütle aktarım hızındaki artış ekstraksiyon süresinin kısılmasına ve diğer ekstraksiyon metotlarına göre işlemin daha kısa sürede gerçekleşmesine olanak vermektedir.
2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, ekstraksiyon kolonunun akışkan tarafından sürekli beslenmesi, ekstraksiyon işlemi esnasında sürükleyici kuvvetin gitgide artmasına ve bunun sonucu kütle aktarım hızının artmasına sebep olur.
3. Süperkritik akışkanların çözme güçleri basınç ve sıcaklık üzerinde yapılan bir takım değişiklikler ile değişmektedir. Başta yoğunluk olmak üzere diğer değişkenlerin değişmesi ile ürün seçiciliği ve verimliliği etkilenmektedir. Çözme gücündeki bu değişikliğin kontrol edilebilir olması süperkritik akışkan kromatografisi ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu uygulamaları için önemli avantajlar oluşturmaktadır.

4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerin inert olması, bu şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde hidroliz, oksidasyon veya degradasyon tepkimelerinin önüne geçmektedir.
5. Klasik çözücü ekstraksiyonu uygulamalarında harcanan çözücü miktarına göre süperkritik şartlarda minimum düzeyde çözücü harcanması ve ana çözücü olarak karbondioksit kullanılması çevreye duyarlılık açısından çok daha iyi proses oluşturmaktadır.
6. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile prosesler sonunda, basıncın düşürülmesi akışkan ve çözünen madde birbirinden ayrılmasına olanak vermekte ve bunun sonucunda üründe çözücü kalıntısı kalmamakta ve yeni bir saflaştırma işlemine gereksinim duyulmamaktadır.
7. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile termal yönden hassas olan bileşikler ekstrakte edilebilir ve saflaştırılabilir.
8. Ticari olarak değerli olan ve düşük miktarlarda bulunan doğal bileşiklerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında süperkritik akışkan ekstraksiyonu etkili bir proses olmaktadır.
9. Süperkritik akışkan sistemi, kromatografik analiz cihazlarına doğrudan bağlanabilir ve elde edilen ekstraktın analizi aynı proses içinde gerçekleştirilebilir.
10. Klasik çözücü ekstraksiyon uygulamalarında çalışılacak numune miktarı 20-100 g arasında değişirken, süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminde 0,1-1,5 g aralığında numune miktarları ile bile çalışılabilmektedir.
11. Süperkritik akışkan ekstraksiyon uygulama sistemi farklı ölçeklere göre değişiklik gösterebilmektedir. Analitik ölçeklere (gram mertebesinde madde miktarı), pilot fabrika ölçeklere (kilogram mertebesinde) ve endüstriyel ölçeklere (ton mertebesinde madde miktarı) uygulanabilmektedir [48,56].

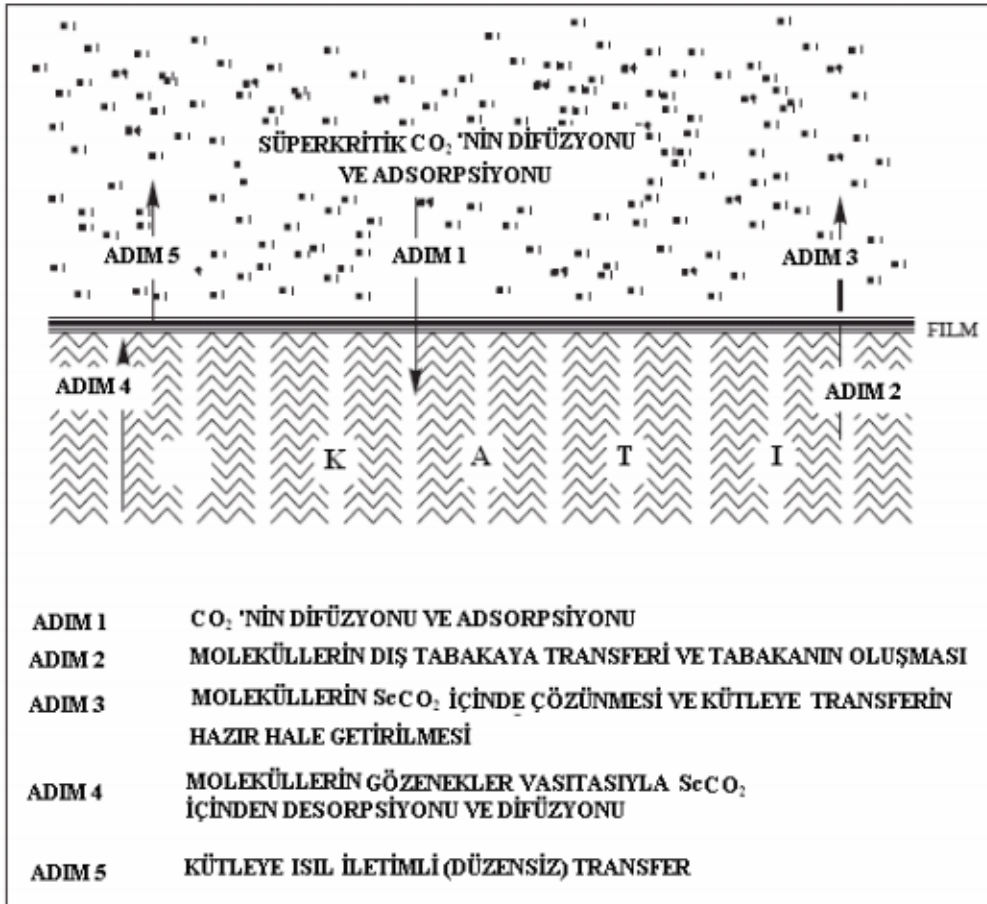
2.3.2.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Dezavantajları

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılacak çözücü seçimi uygulama alanına göre ve ekstrakte edilecek bileşenin yapısına göre değişiklik göstermektedir. Birçok polar maddenin ekstraksiyonunda su ve N₂O tercih edilmesi gereken çözücü olması gerekirken suyun kritik sıcaklığının yüksek olması ve N₂O'nun toksik özellik göstermesi bu çözücülerin süperkritik akışkan olarak kullanılmasında dezavantaj oluşturmaktadır. Süperkritik akışkan

ekstraksiyonu prosesinin yüksek basınçlarda gerçekleşmesinden dolayı yatırım maliyeti ve enerji gereksinimleri yüksek olmakta ve dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Karbondioksit tüplerinde mevcut olan % 1-2 oranındaki oksijen içeriğinin antioksidantlar gibi oksijene hassas bileşikler ile reaksiyona girip onların yapısını bozması bir diğer dezavantaj olarak nitelendirilebilir [48].

2.3.2.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonun Mekanizması

Akışkan CO₂ ile katı matriks seçilen süperkritik şartlarda etkileşime girdiği zaman, kütle transferi çözünenin desorpsiyonu ile süperkritik akışkanın adsorpsiyon ve difüzyonunu içermektedir [37]. Ekstraksiyon prosesi bu belirtilen bir takım mekanizmalar üzerinden yürümektedir. Bu mekanizma Şekil 2.18'de gösterilmiştir.



Şekil 2.18. Süperkritik akışkanların katılardan transfer mekanizması [37].

Ekstraksiyon başlangıcından itibaren ardı ardına ve birbirine paralel olarak meydana gelen olaylar irdenelirse;

1. CO₂'nin gözenek içine difüzyonu ve katı yüzey üzerinde adsorpsiyonu
2. Moleküllerin dış tabakaya taşınımı ve katı parçacıklar etrafında ince sıvı film oluşumu
3. Moleküllerin sc-CO₂ içinde çözünmesi
4. Akışkanın kütlesine ısı iletimli transfer
5. Çözünenin katıdan veya gözenekli yüzeyden desorpsiyonu
6. Çözünenin sc-CO₂ içinde çözünmesi
7. Çözünenin gözenekler içinde difüzyonu
8. Akışkanın kütlesine düzensiz durumda ısı iletimli transfer şeklinde belirtilebilir.

2.3.2.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu Verimliliğini Etkileyen Değişkenler

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu verimliliğini bir takım deneysel değişkenler etkilemektedir. Bu deneysel değişkenler akışkanın özellikleri, çözünenin özellikleri, katının özellikleri, dinamik faktörler ve örnek hazırlanması şeklinde sıralanabilir. Bu değişkenler alt başlıklar halinde sıralayacak olursak [38];

Akışkanın Özellikleri

- Akışkanın doğası (Polarite)
- Basınç (Yoğunluk)
- Sıcaklık
- Modifierin varlığı ve derişimi
- Akışkanın toplam hacmi

Çözünenin özellikleri

- Analitin tipi (buhar basıncı, polarite, molekül ağırlığı)
- Konsantrasyon

Katının Özellikleri

- Numune boyutu
- Partikül boyutu
- Matriksin doğası (Polarite-yardımcı çözücü ile matriks arasındaki bağ)
- Ortamda hazır bulunan diğer ekstrakte edilebilecek maddeler
- Numune şartları (nem-yağ oranı- pH)
- Kapsüllenme oranı

Dinamik faktörler

- Ekstraksiyon zamanı
- Akış hızı
- Ekstraksiyon hücresi (boyut-geometri-boşluk hacmi-karışım)

Örnek Hazırlanması

- Reaktifin, çözücülerin, sıvıların eklenmesi
- Katıların eklenmesi şeklinde belirtilebilir.

2.3.3. Subkritik Su Ekstraksiyonu

Su yapısal özellikleri, yüksek hidrojen bağlı yapısı, molekül ağırlığından beklenmeyecek düzeyde yüksek kaynama noktasına sahip oluşu, yüksek dielektrik sabiti ve polaritesi ile çok özel bir solventtir.

Subkritik su ekstraksiyonu, yeni bir teknik olup basınç altında 100–374 °C sıcaklık değerleri arasındaki şartlarda çalışır. Sub kritik su, 100–374 °C arasındaki sıcaklık aralığında, basınç altındaki sıvı su demektir. Ekstraksiyonu yapılacak maddenin maksimum verim ile elde edilmesi için basınç ve sıcaklıklar değiştirilerek optimum şartlar belirlenir. Kritik sıcaklık noktasına ulaşılmadan dahi ekstraksiyon verimi süperkritik akışkan veya çözücü ekstraksiyonu verimine eşdeğer bulunmuştur. Dolayısıyla sub kritik su ile ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonuna ve çözücü ekstraksiyonuna alternatif olarak gelişmeye başlamıştır. Subkritik su kullanmanın birçok avantajlı yönleri vardır. Bunlardan; çevre dostu, çok ucuz, kolay bulunur olması, toksik olmaması ve organik atık bırakmaması gibi özellikler sayılabilir.

Yüksek basınç ve sıcaklık altında suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerinde özellikle de dielektrik sabitinde (ϵ) çarpıcı değişiklikler meydana gelmektedir. Oda sıcaklığı ve atmosfer basıncı koşullarında suyun dielektrik sabiti $\epsilon=78$ dir. 300 °C ve 23 Mpa basınçta bu değer $\epsilon= 21$ olur. Dielektrik sabiti 25 °C ve atmosfer basıncında etanol için $\epsilon=24$, aseton için $\epsilon=20.7$ ve metanol için $\epsilon=23$ dür. Bunun anlamı, yüksek basınç ve sıcaklık koşullarında suyun polaritesi ciddi şekilde düşmektedir ve ekstraksiyon işleminde etanol, aseton, metanol gibi davranabilmektedir. Bu sayede su orta polar-düşük polar bileşenlerin ekstraksiyonu işleminde organik solventler yerine kullanılabilir.

Sonuç olarak süper ısıtılmış su, özellikle aromatik bileşikler gibi polarizlenebilen ya da bazı polar gruplara sahip büyük organik bileşikler için iyi bir çözücüdür. Son yıllarda

yapılan çalışmalarda poliaromatik hidrokarbon, poliklorlu bifeniller ile bitki ve gıda örneklerinden pek çok kimyasal bileşimin ekstraksiyonları mümkündür. Bunun yanında fraksiyonlama ve kromatografik uygulamaları da yapılmaktadır. Naphthalene ve benz(e)pyrene gibi poliaromatik hidrokarbonların ve bazı pestisitlerin süper ısıtılmış sudaki çözünürlükleri incelenmiş ve 100 °C 'den 374 °C 'ye kadar bir artışta, çözünürlüklerinde 10⁶ kat civarında bir artış gözlenmiştir ve bu mükemmel bir sonuçtur.

Süper ısıtılmış suyun, bugün kullanılmakta olan organik solventlere bir alternatif olarak, organik bileşik proseslerin de kullanılması gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Elde edilen üründe organik atık yoktur, kirlilik çalışmalarında avantajları gözlenmiştir ve çevrecidir [92,94].

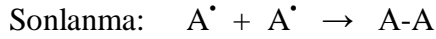
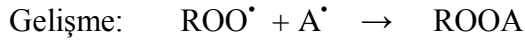
2.4.ANTİOKSİDANLAR

Geleneksel tanım olarak antioksidan oksidasyona karşı koruyan, oksijen ya da peroksitlerle ilerleyen reaksiyonları engelleyen maddelerdir. Bu maddelerin çoğu çeşitli ürünlere koruyucu olarak kullanılmaktadır. Daha biyolojik olarak ise antioksidan madde, havanın oksijeni ile bozulan ürünlere ilave edilerek bu bozulmayı engelleyen veya geciktiren sentetik veya doğal madde olarak tanımlanmaktadır. Gıda endüstrisinde antioksidanlar geniş bir alana sahiptir. Oksijen ve nitrojen gibi reaktif türlerin insanlardaki normal fizyolojik fonksiyonları üzerindeki ters etkilerini oldukça önemli bir şekilde azaltan diyetel antioksidanlardan, yağların bozunmasını engelleyen maddeler içeren antioksidanlara kadar geniş bir kullanıma sahiptirler [75].

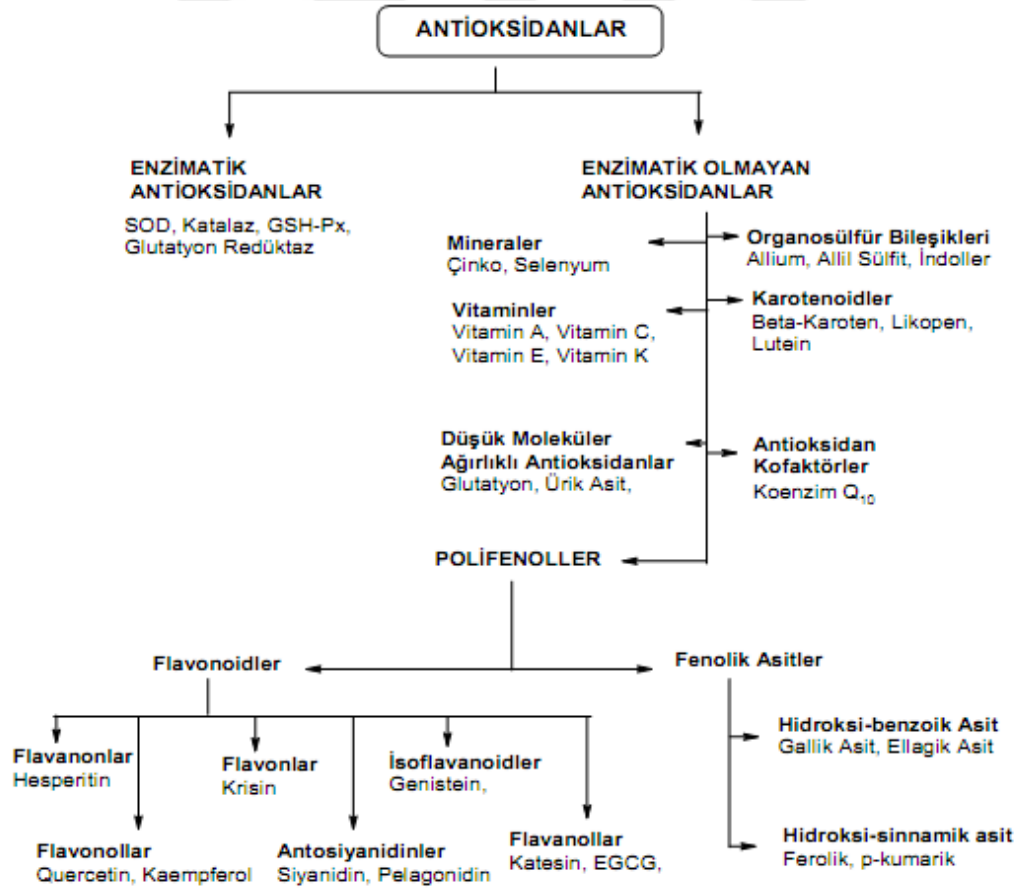
Antioksidanların öyküsü serbest radikallerle başlamaktadır. Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler “oksidan” veya “prooksidan” olarak tanımlanmaktadır [76]. Serbest radikaller ve oksidanlar ise şöyle tanımlanmaktadır; dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan, kısa ömürlü, reaktif atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar [77]. Hücre içi ortamda oluşan serbest radikaller, önemli hücresel yapı ve bileşiklere etki ederler. Proteinler ve DNA, hücrede zarar gören önemli hedeflerden bazılarıdır. Biyolojik sistemlerde, serbest radikalın saldıracağı diğer bir hedef de hücre membranındaki lipitlerdir [78].

Antioksidanlar etkilerini; serbest radikal oluşumunu engellemesi (başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki, oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyon azaltıcı etki, katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki) ve oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi (toplayıcı etki, bastırıcı etki, onarıcı etki, zincir kırıcı etki) olmak üzere iki şekilde göstermektedirler [79].

Antioksidanların etki mekanizması basitçe aşağıdaki gibidir.



Antioksidanlar hidrojen atomu verme kabiliyetine sahip kimyasal bileşenlerdir. Antioksidanların molekül yapısı sadece hidrojen atomu verme açısından değil, aynı zamanda radikalleri düşük reaktiviteli hale getirip lipitler ile reaksiyona girmesini engellemesi açısından oldukça uygundur [80].



Şekil 2.19. Antioksidanların sınıflandırılması [81].

Antioksidanlar mekanizmalarına göre genel olarak 2 sınıfa ayrılırlar. Bunlardan birinci sınıf olan “Birincil Antioksidanlar”; radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmesini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir (katalaz, peroksidaz, transferin v.b). ikinci grup olan “ikincil Antioksidanlar” ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran bileşiklerdir (askorbik asit, E vitamini, polifenoller) [79].

2.4.1.Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde bulunan en geniş ve en yaygın gruplardan biridir. Fenolik bileşikler kimyasal yapısı olarak en az bir hidroksil grubu (OH) ile bir benzen halkası veya bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkadan oluşmuşlardır. Buna göre fenolik bileşiklerin en basit şekli bir tane hidroksil grubu içeren benzen (hidroksibenzen) yani ‘fenol’dür. Başka bir deyişle fenolik maddeler; genellikle bir veya birden fazla hidroksil grup içeren bir aromatik halkaya sahip, farklı yapı ve fonksiyonlardaki metabolitlerdir [78].

Fenolik maddeler, bitkilerde homojen olarak dağılmamaktadır. Suda çözünmeyen fenolik maddeler hücre duvarının bileşeni iken, suda çözünenler bitki hücresinin içinde yer alırlar. Bitkisel dokuda bitkinin dış tabakası iç tabakadan daha fazla fenolik madde içermektedir. Lignin ve hidroksi sinnamik asitler gibi hücre duvarında bulunanlar, çeşitli hücrel bileşenlerle bağlantılıdır. Bu maddeler; hücre duvarının mekanik gücüne katkıda bulunur ve bitki gelişiminde düzenleyici rol oynarlar [78]. Besinsel fonksiyonu olmamasına rağmen gıdalardaki fenoliklerin sağlık üzerine olumlu etkileri vardır. Flavonoidler ve diğer bitki fenolikleri yüksek redoks potansiyelleri ile önemli antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri serbest radikalleri bağlamaları, metallere şelat oluşturmaları, bazı enzimleri inaktive etmeleriyle açıklanmaktadır [82].

En basit fenolik bileşik olan ‘fenol’den diğer tüm fenolik bileşikler türemiştir. Fenolik bileşiklerin molekülündeki yer değişiklikleri sonucu bu bileşiklerin farklı türevleri oluşmaktadır. Sonuç olarak tüm fenolik bileşikler, bir hidroksil kökü ve bir benzen halkasına farklı organik grupların eklenmesi ile oluşmaktadır. Fenolik bileşiklerin sayılarının çok fazla ve yapılarının karmaşık olması, bunlardan bazılarının tanımlanamamasına neden olmuştur. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları gibi birçok açıdan önem taşırlar [81].

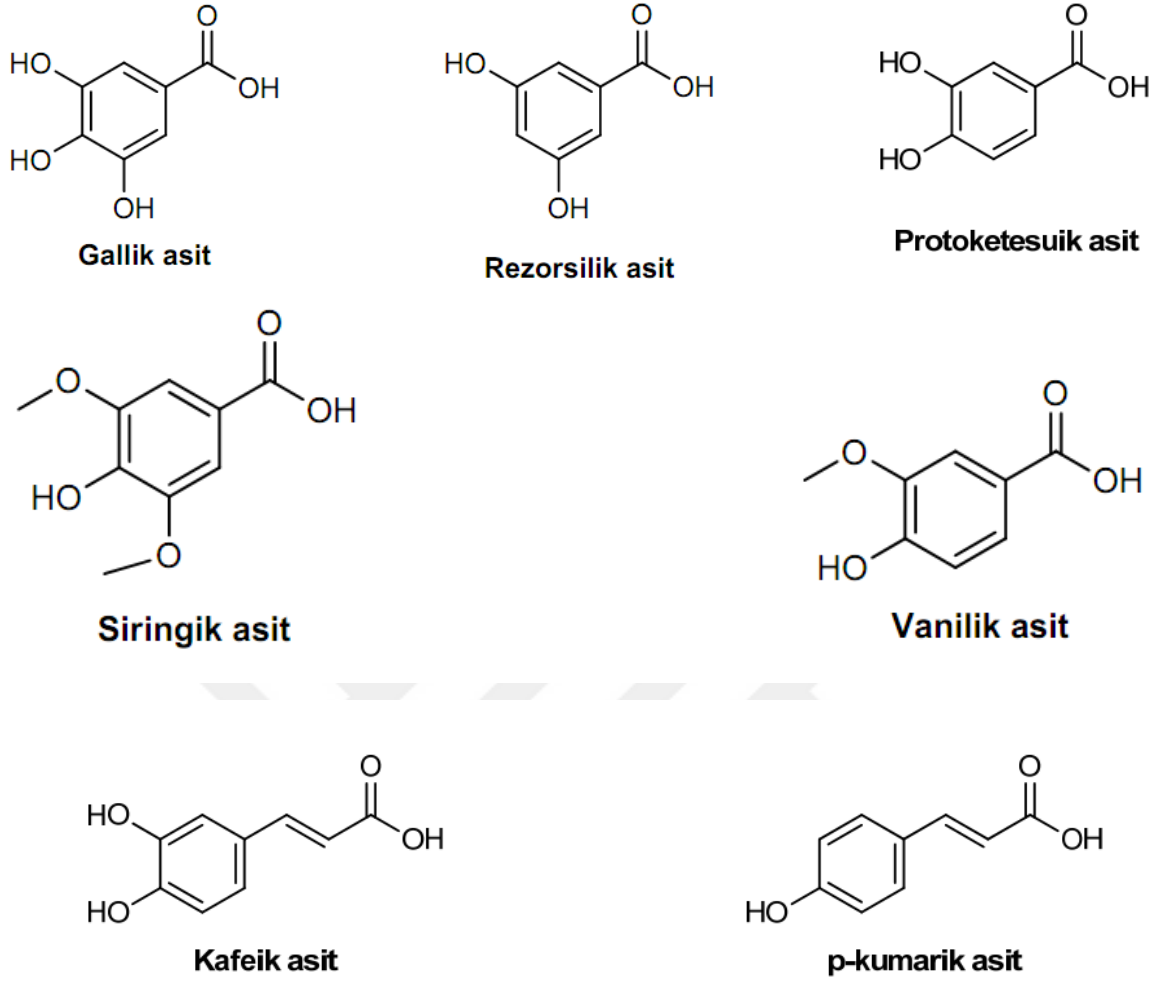
2.4.2. Polifenoller

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş flavonoitleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir. Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenolleri multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu şelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar [83]. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [84].
- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [85].

2.4.2.1. Fenolik Asitler

Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asitler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinnamik asitler oluşturur [86]. L-fenil alanin veya L-tirosinden ferulik, *p*-kumarik, kafeik, sinapik ve klorojenik asit meydana gelir. Yapılarındaki -CH=CH-COOH gruplarının varlığı, hidrojen verebilme yeteneklerini arttırmakla birlikte benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Benzoatlardan daha etkilidirler. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik, protokateşuik asittir. Mono hidroksi benzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasında metilen grubu girmesiyle oluşan fenil asetik asitlerde orto ve meta hidroksi türevleri 1 mM'a yakın antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, o-p pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, *meta* ve *para* pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer [83].



Şekil 2.20. Bazı fenolik asitler

2.5. BENZER ÇALIŞMALAR

Gianni ve ark. *Onosma echioides* L.'nin köklerindeki alkannin/shikonin karışım miktarlarını araştırmışlardır. Mayıs 2006'da İtalya'nın Marche, Umbria, ve Abruzzo bölgesinden topladıkları *O. echioides*'in köklerini Soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon ve hızlandırılmış katı sıvı dinamik ekstraksiyon yöntemleriyle, hekzan, petrol eteri, kloroform, etil asetat ve metanol çözücülerini kullanarak ekstrakte etmişlerdir. En etkili ekstraksiyon tekniğinin 6 saat süresince çözücü olarak etil asetat kullanıldığı Soxhlet ekstraksiyonu olduğunu belirtmişlerdir. *O. echioides* örneklerinin 0,02-0,24 mg/kg oranında alkannin/shikonin içerdiğini tespit etmişlerdir [95].

I. H. Akgun ve ark. Antalya, Türkiye'den topladıkları *Alkanna tinctoria*'nın köklerini süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metoduyla ekstrakte etmişlerdir. *A. tinctoria* bitkisinden ilk olarak alkannin türevlerini süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile ekstrakte etmişler daha sonra alkannin türevlerini alkali hidrolizi yapmışlardır. Optimum koşulları 80 °C, 175 bar, 5g/min CO₂ olarak belirleyerek, en yüksek toplam alkannin verimini % 1,47 olarak tespit etmişlerdir [96].

Müge Pilavtepe I. H. Akgun ve ark. 2006, 2007 yıllarında Antalya, Denizli, Aydın ve Malatya'dan topladıkları *Alkanna* türlerini (*A. tinctoria*, *A. tubulosa*, *A. anatolica*, *A. hirsutissima*) n-hekzan ile ultrasonik ekstraksiyon metodu ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyon (80 °C, 175 bar, 5g/min CO₂ koşullarında) metoduyla ekstrakte etmişler ve daha sonra ekstrakte edilen alkannin türevlerini alkali hidrolizi yapmışlardır. *A. tubulosa*, *A. anatolica*, *A. hirsutissima* türlerinin toplam alkannin verimlerini süperkritik karbondioksit ile % 0,01, hekzan ekstraksiyonu ile % 0,02, *A. tinctoria* türü için süperkritik karbondioksit ile % 1,47, hekzan ekstraksiyonu ile % 1,24 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, solvent ekstraksiyonu (n-hekzan) ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu sonucu alkali hidrolizi yapılan ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerini belirlemişlerdir. Sonuçları aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi tespit etmişlerdir [97].

| Samples | Total phenol values (mgGAE/g extract) ± SEM | | | |
|-----------------|---------------------------------------------|--------------------|------------------------|---------------------|
| | <i>A. tinctoria</i> | <i>A. tubulosa</i> | <i>A. hirsutissima</i> | <i>A. anatolica</i> |
| SFE | 204.5 ± 27.5 | 5.8 ± 1.1 | 12.2 ± 0.5 | 10.0 ± 0.5 |
| Alkannin-SFE | 686.3 ± 15.8 | 39.3 ± 3.0 | 56.6 ± 7.6 | 58.1 ± 5.3 |
| Alkannin-hexane | 520.1 ± 8.4 | 37.9 ± 12.3 | 73.2 ± 6.7 | 38.3 ± 6.6 |

Khaled Tawaha ve ark. Ürdün bölgesinden topladıkları Boraginaceae ailesine ait *Onosma gigantea* Lam, *Anchusa italica* Retz. türlerini 80 °C'de ultra saf su ve 37 °C'de % 80'lik metanol ile ekstrakte etmişler ve Folin-Ciocalteu kolorometrik metot ile toplam fenolik madde miktarlarını belirlemişlerdir. *Anchusa italica* türünün toplam fenolik madde miktarlarını ultra saf su ekstraktı için 6.8±1.9 mg GAE/g kuru ağırlık, metanol ekstraktı için 6.1±0.3 mg GAE/g kuru ağırlık; *O. gigantea* türünün toplam fenolik madde miktarlarını ultra saf su ekstraktı için 4.3±2.0 mg GAE/g kuru ağırlık, metanol ekstraktı için 4.6 ± 0.2 mg GAE/g kuru ağırlık olarak bulmuşlardır [98].

Slawomir Dresler ve ark. *Echium vulgare* L. ve *Echium russicum* J.F. Gmel. türü bitkilerinin köklerinden shikonini kapiler alan elektroforez (An Agilent 7100- UV-VIS, DAD

dedektör) yöntemiyle tayin etmişlerdir. Toplam shikonin içeriği *E. vulgare* türü için 4.8 mg/kg kuru metaryal ve *E. russicum* türü için 4 mg/kg kuru metaryal olarak tespit etmişlerdir [99].

Yani Hu, Zhihong Jiang ve ark. Çin'in Mainland bölgesinden topladıkları Boraginaceae ailesine ait *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston., *A. guttata* Bunge, *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc., *Onosma paniculata* Bur. et Franch., *O. exsertum* Hemsl., *O. conferta* W.W. Smith, *O. hookerii* Clarke var. *longiflorum* Duthie, *O. hookerii* Clarke and *O. waltonii* Duthic türlerinin köklerini metanol içerisinde 60 dakika süresince ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanarak ekstrakte etmişler ve HPLC- DAD ile toplam shikonin miktarlarını belirlemişlerdir.

| Boraginaceae türleri | Shikonin (mg/g) |
|----------------------------------------------------------|-------------------|
| <i>Arnebia euchroma</i> | 1.52 ± 0.004 |
| <i>A. guttata</i> | 0.078 ± 0.002 |
| <i>O. waltonii</i> | 0.322 ± 0.003 |
| <i>O. hookerii</i> | 0.0393 ± 0.01 |
| <i>O. hookerii</i> Clarke var. <i>longiflorum</i> Duthie | 0.0109 ± 0.001 |
| <i>Onosma paniculata</i> | 0.0567 ± 0.004 |
| <i>O. exserta</i> | 0.00718 ± 0.001 |
| <i>O. conferta</i> | 0.000551 ± 0.0004 |
| <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | 0.472 ± 0.0002 |

Bu türlerden ekstrakte ettikleri shikonin miktarları yukarıdaki grafiktedir [100].

Cengiz Sarıkürkcü *Alkanna tinctoria* L türünü Muğla Üniversitesi yerleşkesi ormanlık alan içerisinde toplayarak toprak üstü kısmını n-hekzan, etil asetat, metanol, su ile ekstrakte etmiş ve ekstraktların toplam fenolik içeriklerini sırasıyla 26.16±0.94, 63.54±1.68, 58.56±0.46, 110.46±0.31 µg GAE/mg özüt olarak tespit etmiştir [101].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Onosma halophila 'dan Soxhlet ekstraksiyonu, subkritik su ekstraksiyonu ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile shikonin elde edilmesinde kullanılan kimyasal maddelerin ne amaçla kullanıldığı, nereden temin edildiği ve saflık dereceleri aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1.Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Metanol (CH₃OH): Kromatografik analizler için HPLC'de mobil faz olarak, Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu sonucunda ekstraktların toplanmasında kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 67-56-1) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Kloroform: Alkali hidrolizi sonrası shikoninin organik faza alınmasında kullanılmıştır. Merck® firmasından (Cas-No)temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Etil Asetat (C₄H₈O₂): Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 141-78-6) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

n-Hekzan (C₆H₁₄): Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 110-54-3) temin edilmiştir. % 99 saflıktadır.

Karbondioksit (CO₂): Süperkritik karbondioksit ortamını sağlamak amacıyla ekstraksiyon hücresinde kullanılmıştır. BOS (Linde Gaz) firmasından temin edilmiş olup % 99 saflıktadır.

Susuz Sodyum sülfat (Na₂SO₄):Alkali hidrolizi sonrası organik faza alınan numunelerden suyun uzaklaştırılması için kullanılmıştır. J.T.Baker firmasından (Cas-No:7757-8206) temin edilmiştir.

Sodyum Hidroksit (NaOH): Ekstraktların alkali hidrolizi için kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 1310-73-2) temin edilmiştir

Sülfürik Asit (H₂SO₄): Alkali hidrolizi sonrası örnek numunelerin asitlendirilmesi için kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 7664-93-9) temin edilmiş olup % 95-97 saflıktadır.

Shikonin (C₁₆H₁₆O₅):

Ekstrakte edilen shikonin için standart madde olarak kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS-No: 517-89-5) temin edilmiştir.

Gallik asit:

Toplam fenolik madde miktarı tayini için standart madde olarak kullanılmıştır. Sigma-Aldrich firmasından (CAS-NO: 149-91-7) temin edilmiştir.

Folin reaktifi (Folin-Ciocalteu's phenol reagent):

Toplam fenolik madde miktarı tayini için kullanılmıştır. Merck® firmasından temin edilmiştir.

Sodyum karbonat (Na₂CO₃):

Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılmıştır. Merck® firmasından (CAS No: 497-19-8) temin edilmiştir.

Naylon Membran Filtre:

Numunelerin HPLC analizinden önce filtrelenmesi işleminde kullanılmıştır. Whatman firmasından temin edilmiştir ve 0.45 µm gözenek boyutundadır.

Deniz kumu:

Ekstraksiyon hücresinde bitki ile frit arasına tampon olarak kullanılmıştır. Partikül boyutu 0.1-0.3 mm arasında değişmektedir, Merck® firmasından temin edilmiştir.

Rotary Evaporatörü:

Soxhlet ekstraksiyonu sonucu, çözücünün uzaklaştırılması işleminde kullanılmıştır. Heidolph marka döner buharlaştırıcı kullanılmıştır.

Terazi:

Bitkinin tartım işlemleri Metler-Toledo analitik terazi ile yapılmıştır.

Soxhlet Aparatı:

Soxhlet ekstraksiyonu için 45/40 boyutunda SH labware marka aparat kullanılmıştır.

Selülozik Yüksük:

Soxhlet ekstraksiyonunda 28x80 mm boyutunda selülozik kağıt kullanılmıştır. Macherey-Nagel firmasından temin edilmiştir.

Havan:

Bitkinin toz haline getirilmesi işleminde kullanılmıştır. Doğa Lmt. Şti.'den temin edilmiştir.

Moleküler elek:

Bitkinin 1 mm partikül boyutlarına getirilmesi için RETSCH marka elek kullanılmıştır.

Ultra Saf Su:

Subkritik su ekstraksiyon deneyleri ve toplam fenolik madde miktarı deneylerinde 18 MΩ'luk ultra saf su kullanılmıştır. 18 MΩ'luk ultra saf su Merck® marka millipore model cihazdan temin edilmiştir.

Yüksek Basınç Şırınga Pompa Sistemi:

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon ve subkritik su ekstraksiyon deneyleri Teledyne ISCO 260 D yüksek basınç şırınga pompa sistemi kullanılarak yapılmıştır. Sistem yüksek basınç sağlayabilme özelliğine sahip iki şırınga pompa ve kontrol ünitesinden meydana gelmektedir. Her bir pompa 266 mL iç hacme sahip olup, pompalar ayrı ayrı kullanıldığında 0.001–107 ml/dk, aynı anda iki pompa kullanıldığında ise (dual mode) 0.001–80 ml/dk, aralığında akış sağlayabilmektedirler. Pompa sistemi ile 0–517 bar basınç uygulanabilmektedir. Pompa sisteminde A pompasına CO₂ girişi B pompasına da H₂O girişi bulunmaktadır. Sistem Teknosem TF R400 fırın ile birleştirilmiştir.

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC):

Çalışmalar esnasında kullanılan HPLC cihazı, diode array dedektörlü Agilent Technologies 1200 Series model bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazıdır.

Analizler ACE marka 25 cm'lik C18 (boyutlar 250x4,6 mm id) model kolon ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kullanılan HPLC sistemi bir pompa, bir enjeksiyon, bir kolon, bir dedektör ve bir kaydediciden oluşmaktadır

UV-VİS Spektrofotometre:

Toplam fenolik madde miktarı tayini için Shimodzu 1700 model spektrofotometre kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

Onosma halophila bitkisinin kökleri, Soxhlet ekstraksiyonu, subkritik su ekstraksiyonu ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu metodu ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen shikonin ekstraksiyon verimleri karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarını altı başlık altında belirtilebilir.

- i. *Onosma halophila* 'nın toplanması ve ekstraksiyona hazır hale getirilmesi
- ii. Ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi
- iii. Farklı ekstraksiyon metotlarının uygulanması
 - a. Soxhlet Ekstraksiyonu
 - b. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu
 - c. Subkritik su ekstraksiyonu
- iv. Alkali hidrolizi
- v. Toplam fenolik madde tayini (Folin Yöntemi)
- vi. Ekstraksiyon Ürünlerinin Karakterizasyonu

3.2.1. *Onosma halophila* 'nın Toplanması

Onosma halophila'nın kökleri Haziran-Temmuz 2013 tarihlerinde Aksaray, İskil-Cihanbeyli 2 km tuzcul alanlarda Tezin eş danışmanı olan Doç. Dr. Rıza Binzet tarafından toplanmıştır. Toplanan kökler gün ışığı almayacak şekilde tamamen kuruyuncaya kadar açık alanda yaklaşık 1 ay bekletilmiştir. Kuruyan kökler havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler 1 mm tanecik boyutlu moleküler elekten geçirilerek ekstraksiyon işlemlerine hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Ekstraksiyon Şartlarının Belirlenmesi

O. halophila'nın köklerinden süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile shikonin ekstrakte edilmesi için optimum ekstraksiyon şartları belirlenmiştir. Ekstraksiyon verimi üzerine etki eden parametreler araştırılmıştır. Sıcaklık, basınç, statik ve dinamik ekstraksiyon süresi, dinamik ekstraksiyon esnasında karbondioksit akış hızı, numunenin partikül boyutu, yöntemleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilecek deneylerde ekstraksiyon sıcaklığının 60, 70 ve 80 °C, basıncının 100, 175 ve 250 bar, 30 dakika statik ve 30 dakika dinamik ekstraksiyon sürelerinde, 0.5 ml/dk karbondioksit akış hızında, 1 mm partikül boyutunda örnekler kullanılmasına karar verilmiştir.

Klasik çözücü ekstraksiyonu (Soxhlet) ile yapılacak deneylerde metanol, hekzan ve etil asetatın çözücü olarak kullanılmasına, ekstraksiyon süresinin 6 saat olmasına, 1 mm partikül boyutunda örnekler kullanılmasına karar verilmiştir.

Subkritik su ekstraksiyon deneylerinde ekstraksiyon sıcaklıklarının 110, 120 ve 130 °C, basıncın da 50 bar, 30 dakika statik ve 30 dakika dinamik ekstraksiyon sürelerinde, 0.5 ml/dk karbondioksit akış hızında, 1 mm partikül boyutunda örnekler kullanılmasına karar verilmiştir.

3.2.3. Farklı Ekstraksiyon Metotlarının Kullanılması

3.2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

O. halophila'nın kökleri Soxhlet cihazı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. 1 mm tanecik boyutundaki örnekten 5 gr alınmış daha sonra bu örnek Şekil 3.1'de görüldüğü gibi Soxhlet aparatına yerleştirilen selülozik yapı (yüksük) içine konularak 6 saat boyunca metanol, etil asetat ve n-hekzan çözücüleri ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi her çözücü için üçer kez tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon sonrası çözücüler rotary evaporatör ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra ekstraktlar alkali hidrolizi için metanol ile çözülmüştür. Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Soxhlet Ekstraksiyon Düzenegi

Çizelge 3.1. Süperkritik karbondioksit, Soxhlet ekstraksiyonda kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri

| Çözücü | Dielektirik sabiti | Kaynama noktası/ °C | Molekül formülü | Molekül ağırlığı (g/mol) | Yoğunluk (g/cm ³) |
|-------------|--------------------|---------------------|----------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Metanol | 32.6 | 65 | CH ₃ OH | 32.04 | 0.791 |
| Etıl asetat | 6.02 | 77 | C ₄ H ₈ O ₂ | 88.10 | 0.89 |
| Hekzan | 1.9 | 68.9 | C ₆ H ₁₄ | 86.18 | 0.658 |

3.2.3 Subkritik Su Ekstraksiyonu

Subkritik su ekstraksiyonu 250 mm × 4.6 mm (Agilent) ekstraksiyon hücresinde ISCO 260 D yüksek basınç pompası kullanılarak 110, 120 ve 130 °C sıcaklıklarda 50 bar basınçta, gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilecek bitkinin kök kısımları çözücü madde etkileşimini arttırmak amacıyla havan kullanılarak belirli boyutlara getirildikten sonra 1 mm'lik elekten geçirilmiştir. Ekstraksiyona hazır hale getirilen bitkiden 1 gram tartılarak deniz kumu ile karıştırıldıktan sonra ekstraksiyon kolonu içerisine sabit bir yatak oluşturacak şekilde yerleştirilmiştir. Kolon subkritik su ile basınçlandırılmış ve 30 dakika beklenmiştir (statik ekstraksiyon). Daha sonra kolondan belli basınçta ve akış hızında 30 dakika boyunca subkritik su geçirilmiştir (dinamik ekstraksiyon). Kolon çıkışında ekstrakt ve subkritik su numune kabına toplanmıştır. Alkali hidrolizi için subkritik su numuneden evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmış ve numune 5 ml metanol içerisinde çözülmüştür. Şekil 3.2'de subkritik su ekstraksiyon sisteminin şematik yapısı gösterilmiştir.

3.2.4. Alkali Hidrolizi

Toplam shikonin miktarını belirlemek için, süperkritik CO₂ ekstraksiyonunu içeren örnek çözeltileri 6 ml metanol içerisinde çözülmüştür. Subkritik su ekstraksiyonunu sonunda örneklerden subkritik su rotary evaporatör yardımıyla tamamen buharlaştırılmış ve ekstraktlar 5 ml metanolde çözülmüştür. Soxhlet ekstraksiyonunu içeren örnekler ise ml' sinde 2 mg konsantrasyonda ekstrakt olacak şekilde metanolde çözülmüştür. Bu örneklerden 1 ml alınarak 30 ml 1 M NaOH çözeltisiyle 6 saat boyunca alkali hidrolizi yapılmıştır. Hidroliz örnekleri 2 M H₂SO₄ ile asitlendirilmiştir. Daha sonra ekstraktlar renksizleşinceye kadar kloroform ile muamele edilmiştir. Kloroform fazı susuz Na₂SO₄ ile kurutulmuştur ve organik faz rotary evaporatör ile buharlaştırılmıştır. Buharlaştırılan örnekler HPLC analizi için 5 ml HPLC grade metanol ile çözülmüştür.



(a)

(b)

Şekil 3.3. (a) Örnek numunenin alkali hidrolizi sırasındaki görünümü, (b) Alkali hidrolizi sonrası örneğin asitle muamele edildikten sonraki görünümü

3.2.5. Toplam Fenolik Madde Tayini (Folin Yöntemi)

10 g gallik asit balon jode ultrasonik banyoda 10 ml metanol içinde çözülerek, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (stok çözelti). Stok çözeltiden değişik konsantrasyonlarda standartlar hazırlanarak Folin Ciocalteu yöntemi [87] uygulanmıştır. Her bir ekstrakt için üç tekrar yapılmıştır.

Ekstraktlar içindeki toplam fenol miktarları gallik asite eşdeğer olarak Folin Ciocalteu yöntemi [87] kullanılarak, kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Soxhlet ekstraksiyonu, süperkritik karbondioksit ve subkritik su ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktlardan 50 µl numune alınarak deney tüpüne konmuş, üzerine 450 µl distile su, 2.5 ml Folin Ciocalteu reaktifi eklenerek iyice karıştırılmıştır. 5 dakika bekletilerek üzerine 2 ml % 20'lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenip, tekrar karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 1.5 saat bekletildikten sonra çözeltilerin absorpsiyon değerleri, spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700) 765 nm'de okunmuştur. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer (mg gallik asit/g kuru bitki)

olacak şekilde hesaplanmıştır. Üç paralel deney yapılarak sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir.

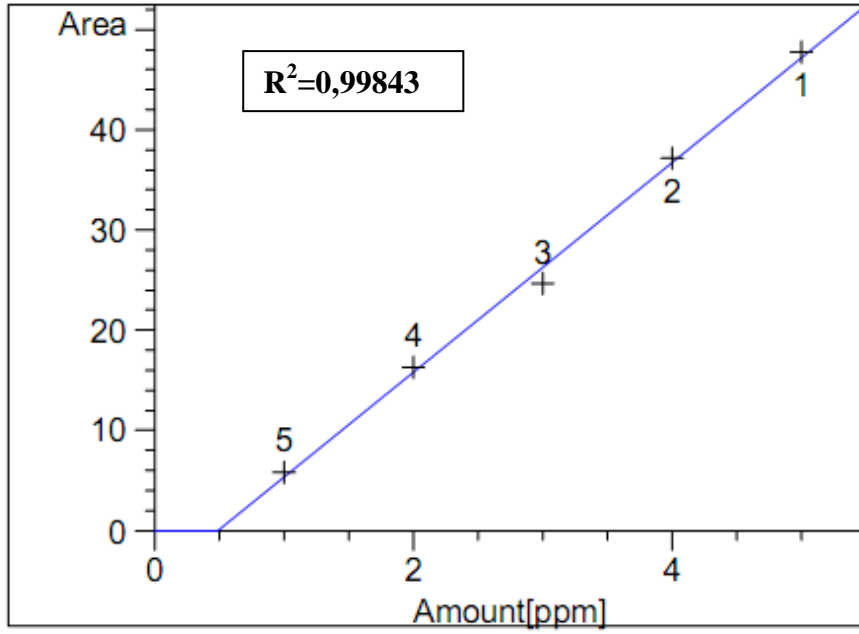
3.2.6. Ekstraksiyon Ürünlerinin Karakterizasyonu

O. halophila'nın yukarıda belirtilen metotlar ile ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesinden sonra elde edilen ekstraktların alkali hidrolizi yapılmış ve numuneler 5 ml metanol içinde çözülerek ters-faz sıvı kromatografisinde analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler için Agilent Technologies 1200 Series model bir yüksek performanslı akışkan kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Shikonin standardı metanolde çözünerek 1-5 mg/L ve 10-50 mg/L ve 50-200 mg/L aralığında standart çözeltileri hazırlanmış HPLC-DAD'de 250×4,6 mm çapında ve 5 µm boyutunda C18 HPLC kolonu kullanılarak, mobil faz; 65:35 metanol-su karışımı, mobil faz akış hızı: 1 ml/dk, dalga boyu: 520 nm'de DAD dedektörü ile analiz gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon deneyleri ve analizler 3 defa tekrarlanmıştır.

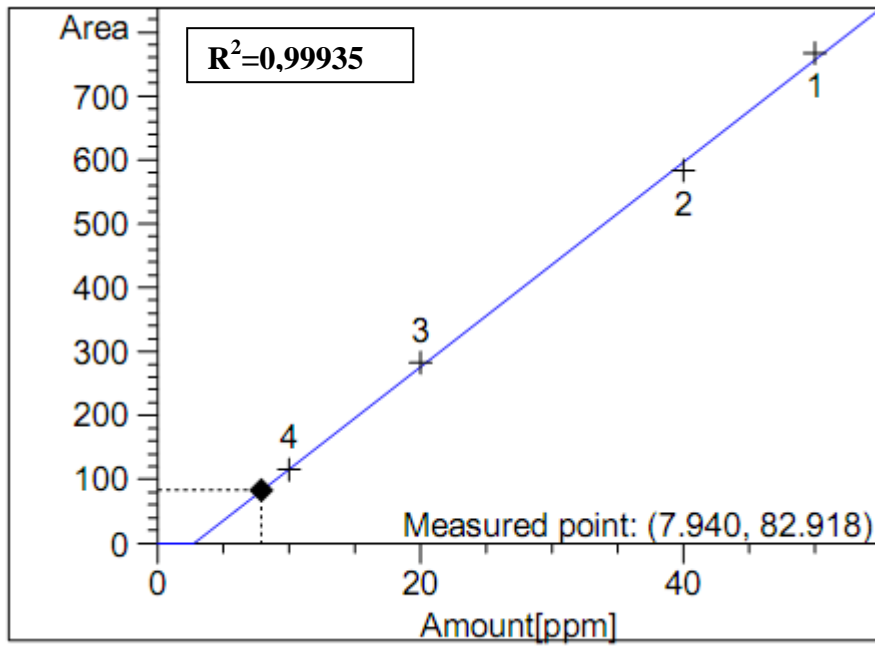
Shikonin HPLC analizi sonucu çizilen kalibrasyon grafikleri ve elde edilen doğru denklemleri kullanılarak yapılan madde miktarı tayini yapılmıştır. Shikonin HPLC analizi için çizilen kalibrasyon grafikleri aşağıda gösterilmiştir.

Süperkritik karbondioksit ve subkritik su ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen shikonin miktar analizi Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'deki kalibrasyon grafikleri yardımıyla belirlenmiştir.

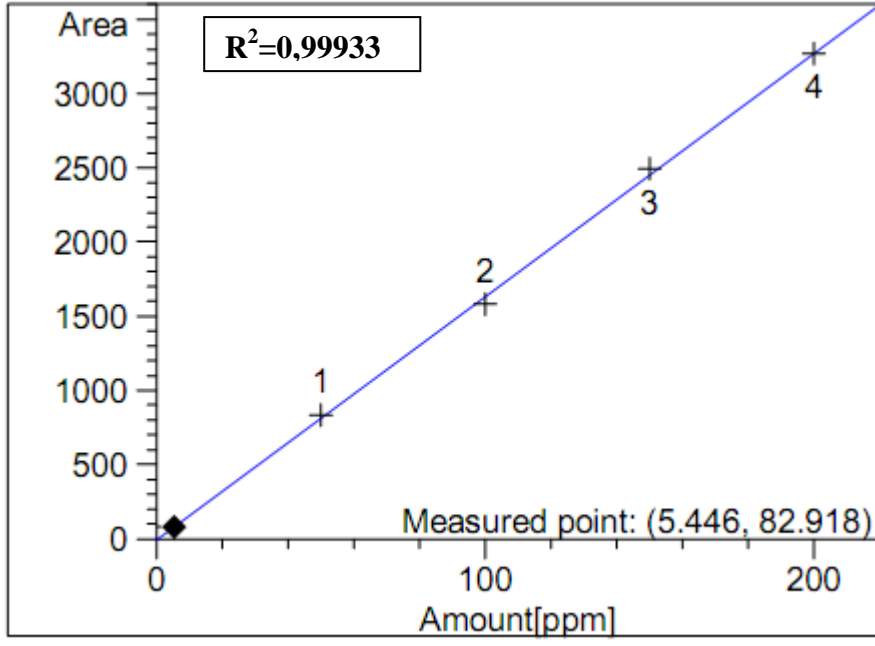
Soxlet ekstraksiyonu ile elde edilen shikonin miktar tayini Şekil 3.6'daki kalibrasyon grafiği ile belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Kalibrasyon grafiği (1,2,3,4,5 mg/L)



Şekil 3.5. Kalibrasyon grafiği (10,20,30,40,50 mg/L)



Şekil 3.6. Kalibrasyon grafiği (50, 100, 150, 200 mg/L)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 TEZİN AMACI

Bu çalışmada, süperkritik CO₂ ekstraksiyon, subkritik su ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyon metodları kullanılarak Türkiyede endemik olarak yetişen *O. halophila* bitkisinden shikonin ekstraksiyonu yapılarak, ekstraksiyon verimleri incelenmiştir. Ayrıca bu ekstraksiyon yöntemleri ile elden edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri Folin yöntemiyle belirlenmiştir.

4.2 SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT EKSTRAKSİYONU

O. halophila'nın kökleri süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon verimine sıcaklık ve basıncın etkisi araştırılmıştır.

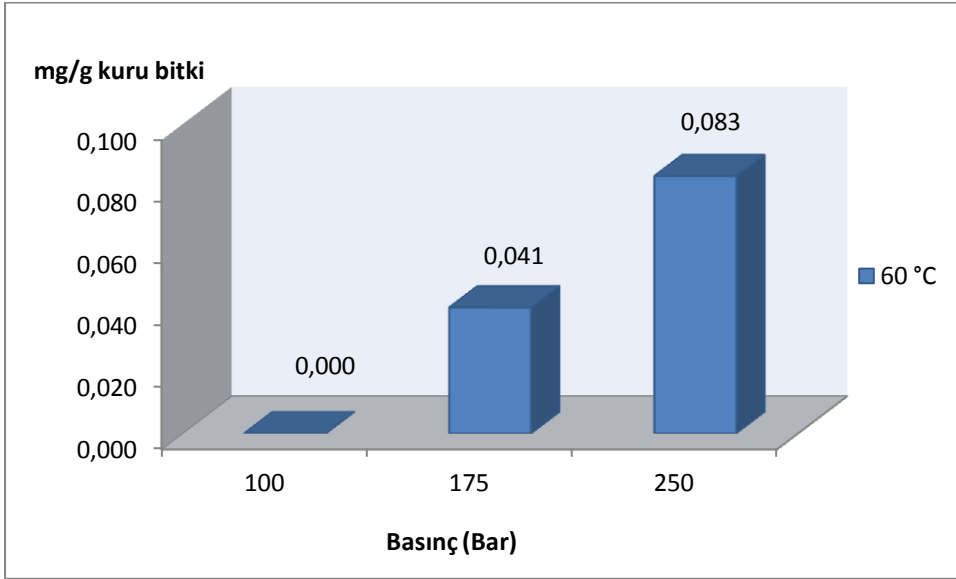
4.2.1 Sıcaklık ve Basıncın Etkisi

Sıcaklık ve basınç, süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon işleminde çözücünün çözme gücü üzerine önemli etkiler yapan değişkenlerdir [48,88]. Bu değişkenler, ekstraksiyon işlemini farklı yönlerden fakat aynı zamanda birbirleri ile iç etkileşimlerde bulunarak etkilemektedirler. Bu nedenle sıcaklık ve basıncın verim üzerine etkilerinin ayrı ayrı ve ardından birlikte incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Süperkritik bir akışkanın çözme gücü o akışkanın yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Akışkanın yoğunluğunun artması ile süperkritik akışkanların çözme güçleri artmakta ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedirler. Difüzyon katsayılarının artması ve viskozitelerinin azalması ile süperkritik akışkanlar, katı yapıdaki gözeneklerde gazlar gibi kolayca difüze olabilmekte ve çözme güçleri artmaktadır. Süperkritik bölgede yoğunluk, sabit sıcaklıkta basıncın düşmesiyle azalırken, sabit basınçta ise sıcaklığın azalmasıyla artış göstermektedir. Çizelge 4.1'de sıcaklık ve basınçla değişen karbondioksit yoğunluğunu göstermektedir [37,89].

Çizelge 4.1. Sıcaklık ve basınçla değişen karbondioksit yoğunluğu (g/cm³) [120].

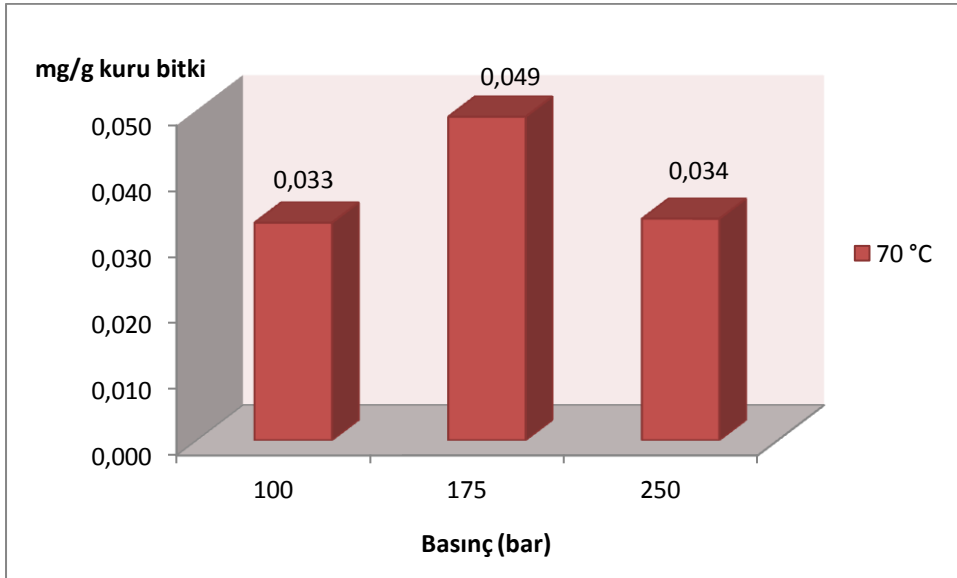
| Basınç (bar) | Sıcaklık (K) | Yoğunluk (kg/m ³) | Entalpi (J/mol) | Entropi(J.K/mol) |
|--------------|--------------|-------------------------------|-----------------|------------------|
| 100 | 308 | 655 | -9234 | -62.9 |
| 200 | 308 | 863 | -10751 | -69.7 |
| 300 | 308 | 953 | -11147 | -72.6 |
| 400 | 308 | 1013 | -11292 | -74.5 |
| 100 | 313 | 568 | -8175 | -59.5 |
| 200 | 313 | 831 | -10296 | -68.2 |
| 300 | 313 | 929 | -10770 | -71.3 |
| 400 | 313 | 993 | -10951 | -73.4 |
| 100 | 318 | 463 | -6841 | -55.3 |
| 200 | 318 | 798 | -9830 | -66.8 |
| 300 | 318 | 906 | -10391 | -70.1 |
| 400 | 318 | 974 | -10609 | -72.3 |
| 100 | 333 | 294 | -4147 | -47.0 |
| 200 | 333 | 696 | -8371 | -62.3 |
| 300 | 333 | 833 | -9237 | -66.6 |
| 400 | 333 | 914 | -9579 | -69.1 |

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile shikonin ekstrakte edilmesine basıncın etkisi 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda, sıcaklığın etkisi ise, 100, 175 ve 250 bar basınçlarda saf CO₂ kullanılarak araştırılmış ve veriler Şekil.4.1 Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

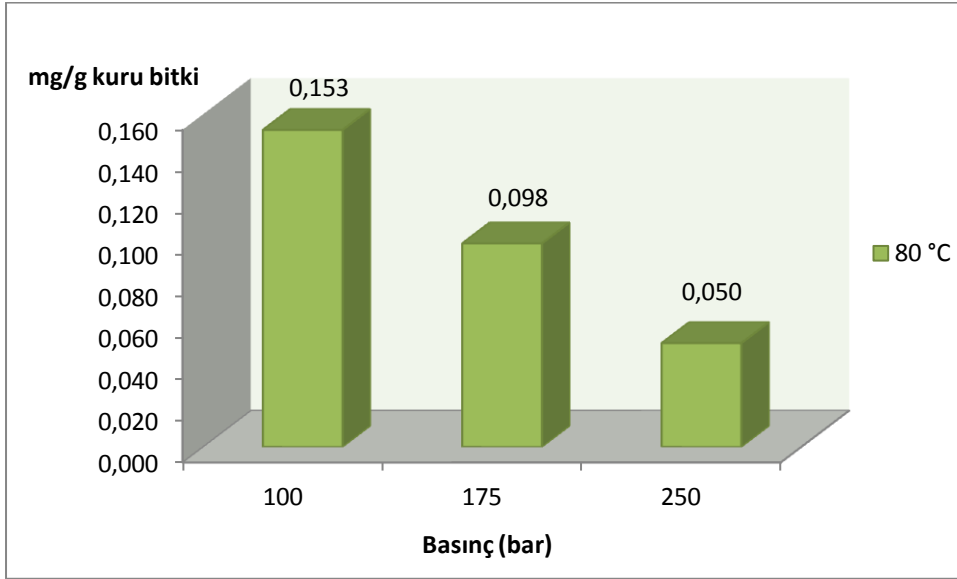


Şekil 4.1 60 °C sabit sıcaklıkta değişen ekstraksiyon basıncına bağlı olarak mg/g kuru bitki verimleri

Sabit sıcaklıkta, süperkritik bölgede yoğunluk, basıncın artmasıyla artış göstermekte ve akışkanın çözme gücünü arttırmaktadır [88]. Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi sıcaklığın sabit tutulup basıncın artması ile elde edilen shikonin miktarında artış söz konusu olmuştur.



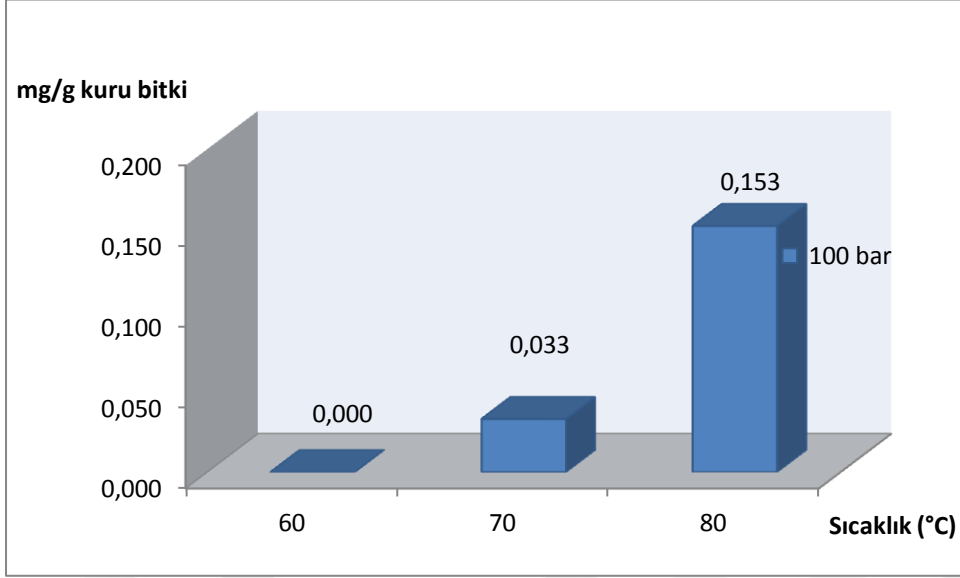
Şekil 4.2. 70 °C sabit sıcaklıkta değişen ekstraksiyon basıncına bağlı olarak mg/g kuru bitki verimleri



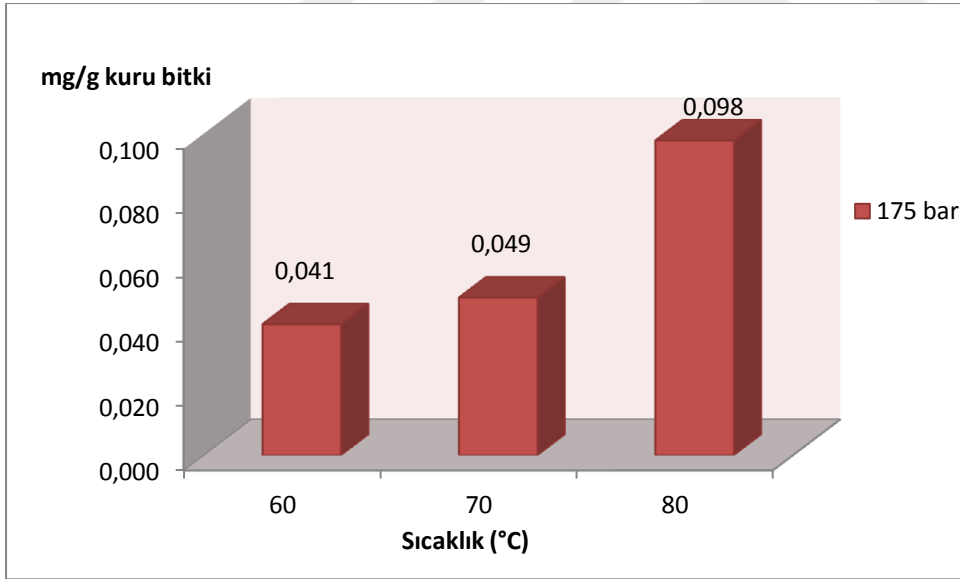
Şekil 4.3. 80 °C sabit sıcaklıkta değişen ekstraksiyon basıncına bağlı olarak mg/g kuru bitki verimleri

80 °C sabit sıcaklıkta basıncın artması karbondioksit yoğunluğunu arttırmakta, ancak yüksek yoğunluklarda difüzyon katsayısının azalması sonucu katı ile akışkan arasındaki iç etkileşimler azalmaktadır [88]. Bu sebeple 80 °C sabit sıcaklıkta basıncın artmasıyla ekstrakte edilen shikonin miktarı azalma göstermiştir.

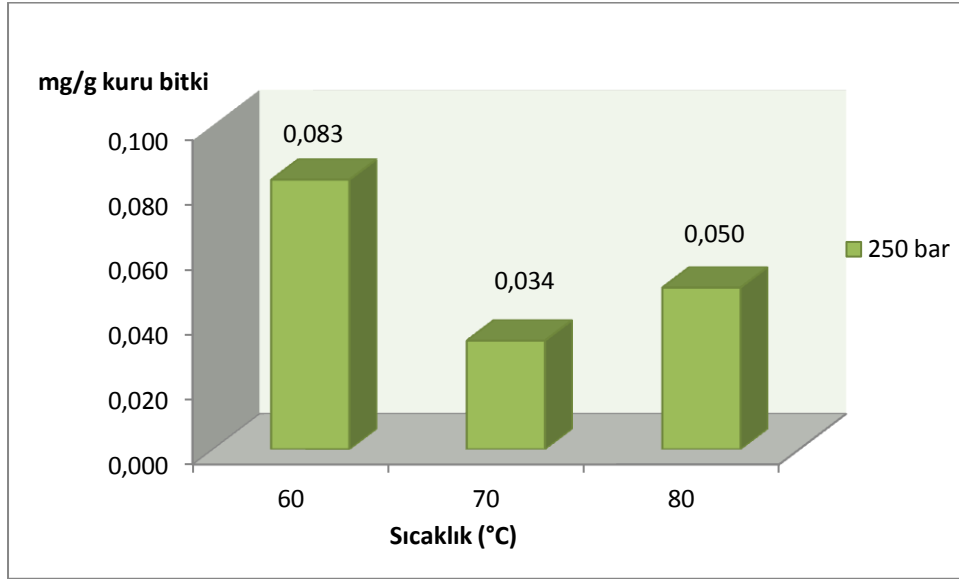
Genel olarak bakıldığı zaman sıcaklık ve basıncın artırılması ile süperkritik akışkanın yoğunluk, difüzyon katsayısı ve viskozite gibi fiziksel özelliklerinin değişmesi sonucu ekstraksiyon sonunda elde edilen ürün miktarı değişmektedir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en yüksek shikonin miktarının elde edildiği basınç değeri 100 bar olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. 100 bar sabit basınçta değişen ekstraksiyon sıcaklığına bağlı olarak mg shikonin/g kuru bitki verimleri



Şekil 4.5. 175 bar sabit basınçta değişen ekstraksiyon sıcaklığına bağlı olarak mg shikonin/g kuru bitki verimleri



Şekil 4.6. 250 bar sabit basınçta değişen ekstraksiyon sıcaklığına bağlı olarak mg shikonin/g kuru bitki verimleri

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de belirtildiği gibi sabit basınçta sıcaklığın artırılması ile ekstrakte edilen shikonin miktarında artış sözkonusu olmaktadır. Süperkritik akışkanlarda belirtilen şartlarda yoğunluk azalırken, diğer yandan difüzyon katsayısı da artış göstermektedir. Yüksek difüzyon katsayısı akışkanlarda hızlı kütle transferi sağlamakta ve bileşiklerin ekstraksiyonu ve kromatografik uygulamalarına olanak vermektedir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en yüksek shikonin miktarının elde edildiği sıcaklık değeri 80 °C olarak belirlenmiştir.

Basınç ve sıcaklığın ayrı ayrı incelenmesi amacıyla yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar şu şekilde tartışılabilir: Basıncın artması, süperkritik CO₂ yoğunluğunun artmasına neden olmakta, bu da ekstraksiyon işlemi iki şekilde etkilemektedir: (1) Süperkritik akışkanın çözme gücü artmaktadır. (2) Yüksek yoğunluklarda difüzyon katsayısının azalması sonucu katı ile akışkan arasındaki iç etkileşimler azalmaktadır [88]. Bu iki ters etki, basıncın verim üzerinde daha az etkili olmasına neden olmaktadır. Yüksek sıcaklık ise süperkritik CO₂ yoğunluğunu azaltmakta ancak çözünenin buhar basıncını artırdığından shikoninin çözünürlüğünü de artırmaktadır. Sıcaklık artışı ile çözünürlükteki bu artışın, basınç etkisiyle oluşan yoğunluk artışının etkisinden daha güçlü bir etki olup olmadığı, kullanılan katı maddenin yapısı ile ilgili olduğu belirtilmektedir [48,90].

Ayrıca yukarıda yapılan açıklamalara ek olarak, basınç ve sıcaklığın birlikte etkileri, şu şekilde de açıklanabilmektedir: Süperkritik akışkanın sıcaklığındaki bir artış, çözücü molekülleri arasındaki uzaklığı artırarak, bu moleküller arasındaki iç etkileşimleri azaltmaktadır. Bu azalma, çözücü ile çözünen madde arasındaki iç etkileşimler üzerinde kuvvetlendirici etkiler yapmakta ve ekstraksiyon hızı artmaktadır [48,91]. Basıncın ekstraksiyon üzerine etkisi ise ters orantılıdır. Basıncıdaki artış, akışkanın yoğunluğunu artırırken, çözücü moleküllerinin birbirleri ile iç etkileşimlerini de artırmaktadır. Bu olay çözücü ile çözünen madde arasındaki iç etkileşimleri azalttığından, ekstraksiyon hızı azalmaktadır.

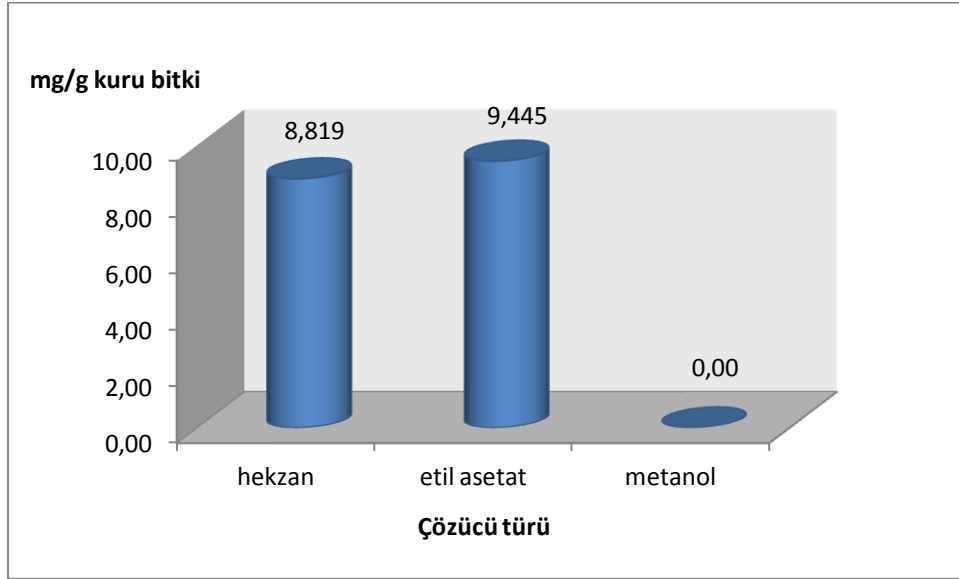
4.2. SOXHLET EKSTRAKSİYONU

Onosma halophila'nın kökleri Soxhlet cihazı kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak metanol, etanol ve n-hekzan kullanılmıştır. 6 saatlik ekstraksiyon süresi sonunda elde edilen shikonin miktarı Çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen shikonin miktarları (mg/g kuru bitki)

| Çözücü | (mg/g kuru bitki) |
|-------------|-------------------|
| Etil asetat | 9.445±0.76 |
| n-Hekzan | 8.819±2.0 |
| Metanol | 0.00±0.0 |

Şekil 4.7. incelendiği zaman, Soxhlet cihazı kullanılarak 6 saat süreyle gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyonu sonucunda, etil asetat çözücüsü, n-hekzan ve metanole çözücülerine kıyasla daha iyi çözücü özelliği göstermiştir. Gianni ve ark. *O. echioides* L.'nin köklerindeki alkannin/shikonin karışım miktarlarını araştırmışlar ve hekzan, petrol eteri, kloroform, etil asetat ve metanol çözücülerini kullanarak en etkili ekstraksiyon tekniğinin 6 saat boyunca etil asetat kullanarak yapılan Soxhlet ekstraksiyonu olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak etil asetat en iyi ekstraksiyon solventidir, çünkü etil asetatın hidrofilik/lipofilik yapısı shikonin/alkanin yapısına benzemektedir [95]. Literature göre etil asetatın sonra en iyi çözücü sırasıyla hekzan ve kloroformdur [102]. Yaptığımız çalışmaya göre de etil asetatın sonra en iyi ekstraksiyon solventi n-hekzan olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Soxhlet ekstraksiyon sonuçları

4.3. SUBKRİTİK SU EKSTRAKSİYONU

Subkritik su ekstraksiyonu ile 50 bar sabit basınç ve 110, 120 ve 130 °C sıcaklıklarda shikonin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak bu şartlarda subkritik su ekstraksiyon yöntemiyle shikonin ekstrakte edilememiştir. Yapılan çalışma ile bu şartlarda shikonin bozunduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 50 bar sabit basınçta değişen sıcaklıklarda subkritik su ekstraksiyonu sonucu

| Sıcaklık | 110 °C | 120 °C | 130 °C |
|-----------------|--------|--------|--------|
| Shikonin (mg/g) | --- | --- | --- |

I. H. Akkün ve ark. 50 bar basınç 30, 50 ve 80 °C sıcaklarda *A. tinctoria* bitkisinden subkritik koşullarda alkannin ekstrakte etmişler ve alkannin, türevlerinin ekstraksiyonunun bu şartlarda subkritik bölgede etkili olmadığını bu sebeple de ekstraksiyonun mümkün olmadığını belirtmişlerdir [96].

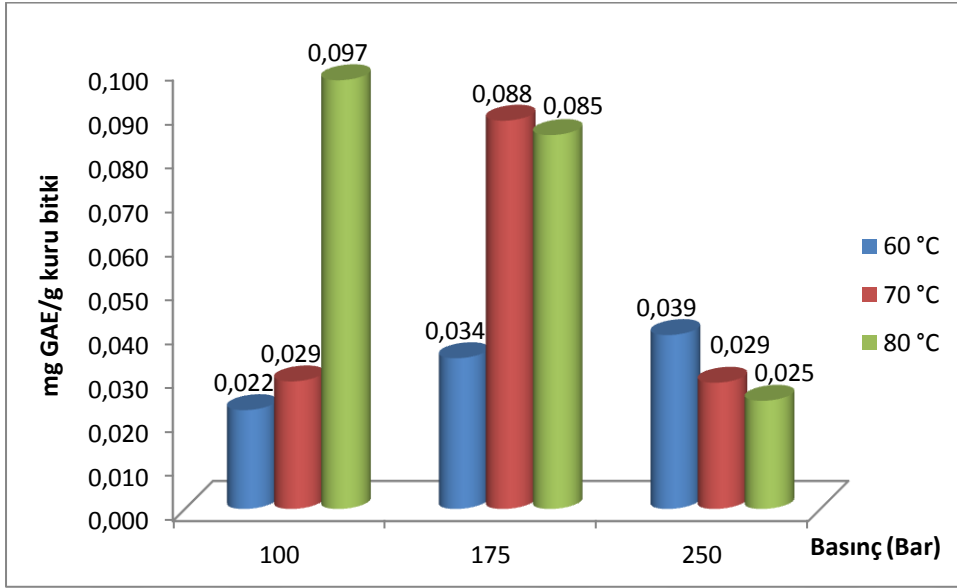
4.4 TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ (FOLİN YÖNTEMİ)

Bitkisel sekonder metabolitler içinde fenolik bileşikler büyük öneme sahiptir. Özellikle son zamanlarda fenolik bileşiklerin güçlü biyolojik etkileri bunlara olan ilgiyi daha da arttırmaktadır. Bitkilerin içerdikleri toplam fenolik maddeleri belirlemede en sık kullanılan yöntem Folin yöntemidir. Bu metodun sonuçları standart bir fenolik maddeye eş değer olarak verilmektedir. Çalışmamızda kullanılan ekstraktların toplam fenolik içerikleri gallik asite eş değer olarak hesaplanmıştır.

Gallik asit kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılan gallik asit konsantrasyon ve absorban değerleri çizelge 4.4'de verilmektedir. Gallik asit konsantrasyonuna karşı absorban değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile gallik asit için kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 4.8).

Çizelge 4.4. Gallik asit standartının konsantrasyon ve absorbanları

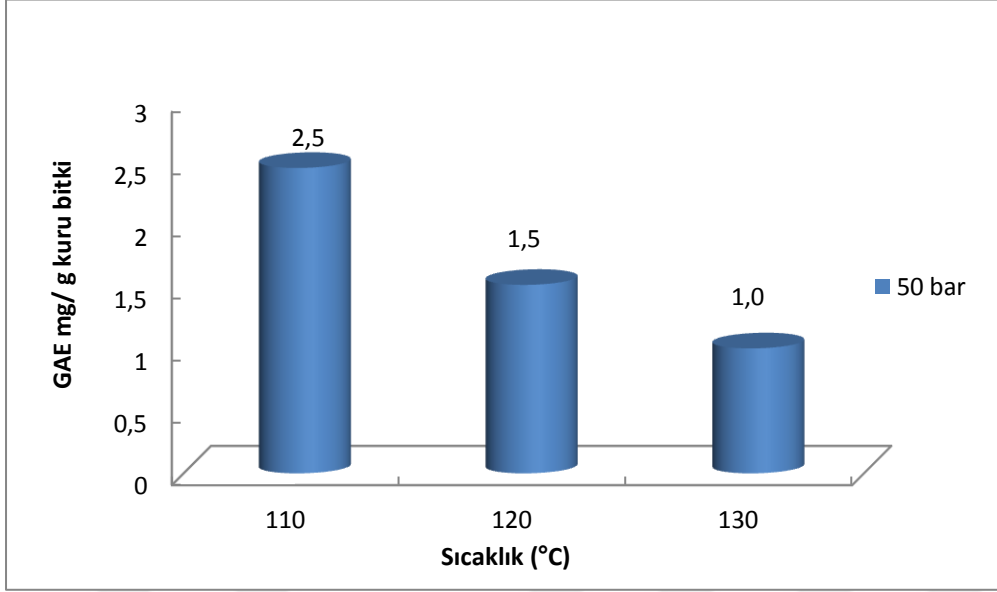
| ppm (mg/L) | Absorbans |
|------------|-----------|
| 0 | 0,0000 |
| 20 | 0,0024 |
| 100 | 0,0537 |
| 200 | 0,1220 |
| 400 | 0,2120 |
| 500 | 0,2727 |



Şekil 4.9. Değişen sıcaklık-basınçlar da süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları

4.4.2. Subkritik Su Ekstraksiyonuyla Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarları

Subkritik su ekstaksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik içerikleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. *O. halophila* 'nın köklerinden subkritik su ekstraksiyonuyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriği maksimum 50 bar basınç 110 °C'de (2.5 mg GAE/g kuru bitki) hesaplanmıştır.



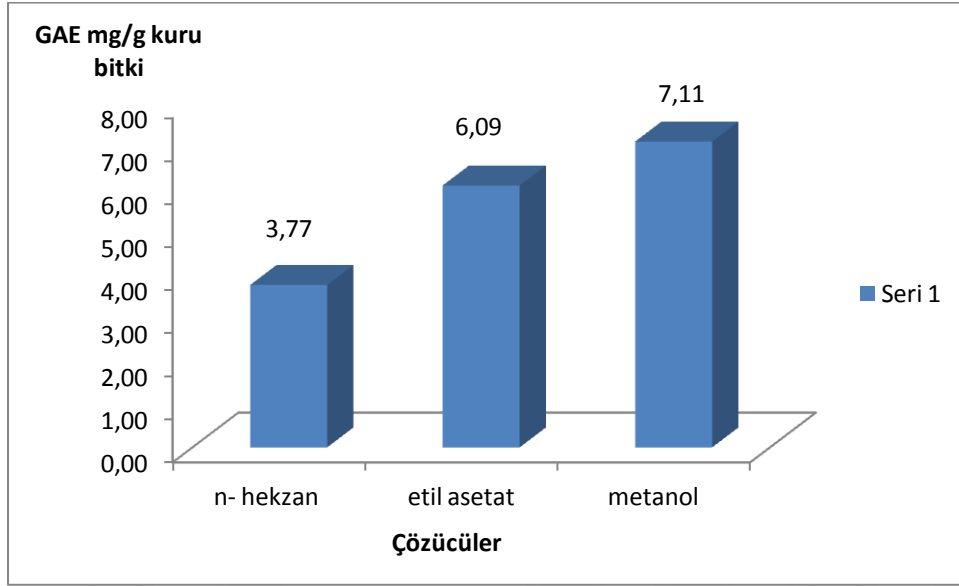
Şekil 4.10. 50 bar sabit basınçta değişen sıcaklıklarda süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları

Subkritik su ekstraksiyon metoduyla 50 bar sabit basınçta 110, 120 ve 130 °C de elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları incelendiğinde sıcaklık artışıyla fenolik madde miktarı azaldığı belirlenmiştir.

4.4.3. Soxhlet Ekstraksiyonu ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarları

Soxhlet ekstraksiyon metoduyla metanol, etil asetat ve n-hekzan ile çözücülerini kullanılarak *O. halophila*'nın kökleri ekstrakte edilmiş ve bu ekstraktların Folin yöntemiyle toplam fenol miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

<



Şekil 4.11. Soxhlet ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları.

Toplam fenolik madde miktarı tayininde, Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerin polaritelerine paralel olarak en yüksek fenolik içerik sırasıyla metanol, etil asetat ve hekzan olarak belirlenmiştir.

4.5. *ONOSMA HALOPHILA* L.'NİN EKSTRAKSİYONUNDA KULLANILAN EKSTRAKSİYON METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Onosma holpohila L.'nin köklerinden shikonin ekstrakte edilmesi için kullanılan ekstraksiyon metotları ve bu metotlar sonucu elde edilen maksimum shikonin miktarları Şekil 4.12 ve Şekil.4.13'de belirtilmiştir.

| Sıcaklık/Basınç | 100 bar | 175 bar | 250 bar |
|-----------------|------------|-------------|-------------|
| 60 °C | 0,0±0,0 | 0,041±0,006 | 0,083±0,05 |
| 70 °C | 0,033±0,02 | 0,049±0,01 | 0,034±0,01 |
| 80 °C | 0,153±0,07 | 0,098±0,02 | 0,05±0,0003 |

Şekil 4.12. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu metodu ile elde edilen shikonin miktarları

| Çözücü | (mg/g kuru bitki) |
|-------------|-------------------|
| Etil asetat | 9.445±0.76 |
| n-Hekzan | 8.819±2.0 |
| Metanol | 0.00±0.0 |

Şekil 4.13. Soxhlet ekstraksiyon metoduyla elde edilen shikonin miktarları

Shikonin elde edilmesinde Soxhlet ekstraksiyonunda etil asetatın çözücü olarak kullanıldığında 9.445 mg/g kuru bitki olarak, süperkritik ekstraksiyonunda ise 80 °C sıcaklıkta ve 100 bar basınç şartlarında 0.153 mg/g kuru bitki olarak en yüksek ekstraksiyon verimleri elde edilmiştir. *O. holpohila* türünden elde edilen shikonin miktarlarına göre ekstraksiyon metotları karşılaştırıldığı zaman sırasıyla Soxhlet ekstraksiyonu, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu şeklinde ekstraksiyon verimlerinin arttığı gözlenmiştir. Subkritik su ekstraksiyon metoduyla bu şartlarda altında shikonin bozduğundan bu ekstraksiyon tekniğiyle shikonin ekstrakte edilememiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuna kıyasla Soxhlet ekstraksiyonun süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuna kıyasla yüksek miktarda shikonin ekstrakte edilemesine karşın, Süperkritik ekstraksiyon tekniğinin ekstraksiyon süresinin kısa olması, toksik çözücü kullanılmamasından dolayı avantaj sağlamaktadır. Süperkritik akışkanların yoğunluğu dolayısıyla çözme gücü basınç ve sıcaklıkla ayarlanabilmektedir. Çözme gücünün ayarlanabilir olması nedeniyle farklı basınç ve sıcaklıklarda çalışıldığında ekstraksiyon verimleri süperkritik ekstraksiyonda değişebilmektedir.

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon, Soxhlet ekstraksiyon, subkritik su ekstraksiyon metodları kullanılarak elde edilen ekstraktların Folin yöntemiyle fenolik madde içerikleri belirlenmiştir. Folin yöntemine göre sırasıyla Soxhlet ekstraksiyon metoduyla 7,11 mg GAE/g kuru bitki metanolün çözücü olarak kullanıldığı, subkritik su ekstraksiyon metoduyla 2,5 mg GAE/g kuru bitki 50 bar basınç 110 °C sıcaklıkta ve süperkritik su ekstraksiyon metoduyla 100 bar basınç, 80 °C sıcaklıkta en yüksek fenolik içerikler belirlenmiştir. Folin yöntemiyle en yüksek fenolik içerik süperkritik karbondioksit ve subkritik su ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla, Soxhlet ekstraksiyon ekstraksiyon yöntemiyle belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Boraginaceae ailesine ait *O. halophila* türü Türkiyede yetişen endemik bir türdür. *O. halophila* bitkisiyle ilgili literatürde herhangi bir çalışma mevcut olmadığından, bu tez çalışmasında *O. halophila*'nın kökünden süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu, subkritik su ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyon metotları kullanılarak shikonin ekstrakte edilmiştir. Bu ekstraksiyon yöntemlerinin shikonin verimleri karşılaştırılmış ve Folin yöntemi kullanılarak da ekstraktların toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada kullanılan Soxhlet ekstraksiyonu ile gerçekleştirilen deneylerde maksimum shikonin verimi (9.445 mg/g kuru bitki) çözücü olarak etil asetatın kullanıldığı deneylerden elde edilmiştir. Çünkü etil asetatın hidrofilik/lipofilik yapısı shikonin yapısıyla benzemektedir. Literature verilerine paralel olarak shikonin ekstraksiyonu için en iyi çözücü etil asetatın sonra n-hekzan (8.819 mg/g kuru bitki) ile elde edilmiştir [103]. Shikoninin ve türevlerinin sıcaklığa karşı hassas oldukları rapor edilmiştir [12]. Yapılan çalışmalarla da yüksek sıcaklıkta shikoninin bozunduğu tespit edildiğinden Subkritik su ekstraksiyon metoduyla bu şartlarda (50 bar basınç, 110, 120, 130 °C sıcaklık) gerçekleştirilen deneylerde shikonin ekstrakte edilememiştir.

Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen deneylerde sıcaklık ve basıncın reaksiyon verimine önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık ve basınç, süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon işleminde çözücünün çözme gücü üzerine önemli etkiler yapmaktadır. Sıcaklık ve basıncın artırılması ile süperkritik akışkanın yoğunluk, difüzyon katsayısı ve viskozite gibi fiziksel özelliklerinin değişmesi nedeniyle, bu parametrelerin ekstraksiyon verimi üzerinde etkili oldukları gözlenmiştir. Süperkritik karbondioksit ortamında gerçekleştirilen deneylerde maksimum ekstraksiyon verimi 80 °C sıcaklık ve 100 bar basınçta 0.153 mg/g kuru bitki olarak elde edilmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı tayininde Folin yöntemi kullanılmış ve bu metodun sonuçları standart bir fenolik maddeye eş değer olarak verilmiştir. Çalışmamızda kullanılan ekstraktların toplam fenolik içerikleri gallik asite eş değer olarak hesaplanmıştır. Soxhlet ekstraksiyon yönteminde çözücü olarak metanol, etil asetat, n-hekzan çözücü olarak kullanılmıştır. Soxhlet ekstraksiyon yönteminde maksimum toplam fenolik madde miktarı 7.11 mg GAE/g olarak çözücü olarak metanolün kullanıldığı ekstraksiyonda elde edilmiştir. Subkritik su ekstraksiyon metoduyla maksimum fenolik madde 2.5 mg GAE/g kuru bitki

olarak 110 °C sıcaklık, 50 bar basınç şartlarında elde edilmiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunun da ise en yüksek fenolik içerik 0.097 mg GAE/g olarak 100 bar basınç, 80 °C sıcaklık şartlarında elde edilmiştir. Subkritik su ekstraksiyonunun da elde edilen toplam fenolik madde miktarı Soxhlet ekstraksiyonunun da elde edilen fenolik miktarının % 14.06'si olarak tespit edilmiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda elde edilen toplam fenolik madde miktarı ise Soxhlet ekstraksiyonunun da elde edilen fenolik madde miktarının % 1.36'si olarak bulunmuştur.

O. halophila L.'den ekstrakte edilen shikonin miktarlarına göre ekstraksiyon metodları incelendiğinde Soxhlet ekstraksiyonunda, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuna kıyasla daha yüksek verim tespit edilmiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda elde edilen shikonin miktarı Soxhlet ekstraksiyonunda elde edilen shikonin miktarının % 1.62'si olarak bulunmuştur.

O. halophila'dan shikonin ve fenolik madde elde edilmesine yönelik ilerki çalışmalarda, ekstrakte edilecek numunenin tanecik boyutununun küçültülmesinin shikonin verimi üzerine etkisi araştırılabilir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda ise karbondioksit akış hızının ekstraksiyon verimine etkileri incelenebilir. Bu ekstraksiyon teknikleri dışında Ultrasonik ekstraksiyon tekniği kullanılarak da *O. halophila*'nın köklerinden shikonin ekstrakte edilmesi önerilebilir.

Seto ve arkadaşları yaptıkları çalışmada shikonin ve bazı türevlerinin anti-inflamatuar etki içerdiklerini ve çeşitli yaraları iyileştirdiklerini kanıtlamışlardır [104]. *Onosma halophila*'dan elde edilen ekstraktların anti-enflamatuar ve yara iyileştirici etkileri araştırılarak ilaç sektörüne yönelik çalışmalar yapılabilir.

Naftokinon pigmentlerinin genellikle pH değişikliklerinin bir sonucu olarak renk değiştirdiği, aynı zamanda güçlü ve kararlı boyama özelliklerine sahip olduğu kanıtlanmıştır [10]. Bu nedenle *O. halophila*'dan ekstrakte edilen shikonininde bu özellikleri araştırılarak kozmetik sektöründe kullanılabilmesi önerilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Berkant, Kayan, “*Taxus Baccata* L'nin farklı Ekstraksiyon Yöntemleri İle Ekstraksiyonu Ve Ekstraksiyon Verimlerinin Karşılaştırılması”, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2009).
- [2] Tuba, Arkan, “*Daphne oleoides* subsp. *oleoides* ve *Daphne sericea*'nın Farklı Çözücülerle Antioksidan Özellikleri”, Selçuk Üniversitesi, (2011).
- [3] Baytop, T, “Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)”, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (1999).
- [4] Baser, K. H. C., “Aromatic plants as a source of botanicals, *Acta Horticulturae*”, 720, 27-33, (2006).
- [5] Davis, P.H., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, Edinburgh, Edinburgh University Press, 6:386387pp, (1978).
- [6] Yıldırım, Ş., “The chorology of the Turkish species of Boraginaceae family”, The Herb Journal of Systemic Botany, 7(2):257-272, (2000).
- [7] Binzet, R. and Orcan, N., “A new species of *Onosma* L. (Boraginaceae) Form Southern Turkey”, Novon, A Journal for Botanical Nomenclature, 17, 8-10, (2007).
- [8] Halil İbrahim Teke, “Türkiyenin Bazı Endemik *Onosma* L. (Boraginaceae) Taksonlarının morfolojik ve palinolojik yönden incelenmesi”, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, (2012).
- [9] U., Ozgen, M. İkbal, A., Hacimuftuoglu, P.J., Houghton, F., Gocer, H. Dogan, M. Coskun, “Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots”, Atatürk University, (2006).
- [10] J., Sep. Sci., “Alkannin/shikonin mixture from roots of *Onosma echioides* (L.) L. Extraction method study and quantification”, 31, 945 – 952, (2008).
- [11] Baytop, T., “Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları”, 578 s., Ankara (1994).
- [12] Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Couladouros, E.A., Hepworth, D. and Nicolaou, K.C., “The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin and Related Naphthazarin Natural Products”, 38th ed. Angewandte Chemie International, 270–300pp, (1999).

- [13] Hsu, H.-Y. and Preacher, W.G., “Chinese Herb Medicine and Therapy”, Oriental Healing Arts Institute of USA, Los Angeles, 147p, (1982).
- [14] Ohta, A., Sivalingham, P.M., Lin, S., Ikekawa, N., Yaginuma, N. and Inada, Y., “Toxicol”, 11:235-241pp, (1973).
- [15] Salmon-Chemin, L., Buisine, E., Yardley, V., Kohler, S., Debreu, M.-A., Landry, V., Sergheraert, C., Croft, S.L., Krauth-Siegel, R.L. and Davioud-Charvet, E., “Journal Medicinal Chemistry”, 44:548p, (2001).
- [16] Inbaraj, J.J. and Chignell, C.F., “Chemical Research in Toxicol”, 17:55p, (2004).
- [17] Huang, S.-T., Kuo, H.-S., Hsiao, C.-L. and Lin, Y.-L., “Bioorganic & Medicinal Chemistry”, 10:1947p, (2002).
- [18] Tandon, V.K., Chhor, R.B., Singh, R.V., Rai, S. and Yadav, D.B., “Bioorganic Medicinal Chemistry Letters”, 14:1079p, (2004).
- [19] Ting, C.-Y., Hsu, C.-T., Hsu, H.-T., Su, J.-S., Chen, T.-Y., Tarn, W.-Y., Kuo, Y.-H., Whang-Peng, J., Liu, L.F. and Hwang J., “Biochemical Pharmacology”, 66:1981p, (2003).
- [20] Huang, L.-J., Chang, F.-C., Lee, K.-H., Wang, J.-P., Teng, C.-M. and Kuo, S.C., “Bioorganic & Medicinal Chemistry”, 6:2261p, (1998).
- [21] Lien, J.-C., Huang, L.-J., Wang, J.-P., Teng, C.-M., Lee, K.-H. and Kuo, S.-C., “Chemical Pharmaceutical Bulletin”, 44:1181p, (1996).
- [22] Lien, J.-C., Huang, L.-J., Teng, C.-M., Wang, J.-P. and Kuo, S.-C., “Chemical Pharmaceutical Bulletin”, 50:672p, (2002).
- [23] Chae, G.-H., Song, G.-Y., Kim, Y., Cho, H., Sok, D.-E. and Ahn, B.-Z., “Archives Pharmacol Research”, 22:507p, (1999).
- [24] Song, G.Y., Kim, Y., You, Y.-J., Cho, H., Kim, S.-H., Sok, D.-E. and Ahn, B.Z., “Archives Pharmacol and Pharmaceutical Medicinal Chemistry”, 333:87p, (2000).
- [25] Kim, Y., You, Y.-J. and Ahn, B.-Z., “Archives Pharmacol and Pharmaceutical Medicinal Chemistry”, 334:318p, (2001).
- [26] Kumagai, Y., Tsurutani, Y., Shinyashiki, M., Homma-Takeda, S., Nakai, Y., Yoshikawa, T. and Shimojo, N., “Environmental Toxicology and Pharmacology”, 3:245p, (1997).
- [R] Rahimpour, S., Weiner, L., Fridkin, M., Shrestha-Dawadi, P.B. and Bittner, S., “Letters in Peptide Science”, 3:263p, (1996).
- [27] Rahimpour, S., Weiner, L., Fridkin, M., Shrestha-Dawadi, P.B. and Bittner, S., “Letters in Peptide Science”, 3:263p, (1996).

- [28] Rahimipour, S., Weiner, L., Shrestha-Dawadi, P.B., Bittner, S., Koch, Y. and Fridkin, M., "Letters in Peptide Science", 5:421p, (1998).
- [29] Verma, R.P. and Hansch, C., "Elucidation of structure–activity relationships for 2- or 6-substituted-5,8-dimethoxy-1,4naphthoquinones", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12:5997–6009pp, (2004).
- [30] Song, G.-Y., Zheng, X.-G., Kim, Y., You, Y.-J., Sok, D.-E. and Ahn, B.Z, "Bioorganic Meddinal Chemistry Letters", 9:2407p, (1999).
- [31] Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Eslami, B., and Asgarirad, H. " In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Leonurus cardiaca* subsp. *persicus*", *Grammosciadium platycarpum* and *Onosma demawendicum* Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran, (2010).
- [32] Erişim: <http://www.kimyaevi.org> [12 Nisan 2009]
- [33] Krukoniş, V., "In European Pharmaceutical Contractor, EPC", May, London, (1998).
- [34] Gizir A.M., PhD Thesis Submitted to the School of Chemistry, Leeds University, Leeds, 139 s. (1998)
- [35] Erişim: <http://www.kobelco.co.jp> [2 Mayıs 2009]
- [36] Kayan, B., Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen-bilimleri Enstitüsü, Temmuz, 89 s. (2004).
- [37] Mukhopadhyay, M., "Natural Extract Using Supercritical carbon dioxide", CRC Pres, LLC, Boca Raton, Florida, USA, (2000).
- [38] Castr,o M.D.L., Valcàrcel, M., Tena, M.T. " Analytical Supercritical Fluid Extraction" Springer-Verlag-Cordoba, (1994).
- [39] McHugh, M.A., Krukoniş, V.J., "Supercritical Fluid Extraction", Butterworths, Boston/USA, (1986).
- [40] Dinçer S., Akgün N., Akgün M., Akgerman A., "An Overview of Supercritical Fluid Extraction", Proc., World Conference and Exhibition on Oilseed and Edible Oils Processing: Emerging Technologies, Current Practices, Quality Control, Technology Transfer and Environmental Issues, 235-242, Illinois, USA, (1998).
- [41] Aktas, Z., Olcay, A., "Supercritical Toluene Extraction of a Reduced Turkish Lignite", *Fuel Processing Technology*, 48(1):61-72, (1996).
- [42] Sunol, A.K., Beyer, G.H., "Mechanism of Supercritical Extraction of Coal", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 29(5):842-849, (1990).

- [43] Lepilleur, C., Beckman, E.J., Schonemann, H., Krukoniş V.J., “Effect of Molecular Architecture on the Phase Behavior of Fluoroether-Functional Graft Copolymers in Supercritical CO₂”, *Fluid Phase Equilibria*, 134: 285305, (1997).
- [44] Cansel, F., Aymonier, C., Loppinet-Serani, A., “Review on Materials Science and Supercritical Fluids”, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7: 331–340, (2003).
- [45] Dinçer, S., Acaralı, N.B., Uzun, İ.N., Deniz, D. “ A Second Option in Special Separation Operations; Supercritical Fluid Processes, *Journal of Engineering and Natural Science*, Sigma, 25(2): 106-128, (2007).
- [46] Miller, D.J., Hawthorne, S.B., Gizir, A.M., Clifford, A.A. “Solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcritical water from 298 K to 498 K” *Jornal of Chemical and Engineering Data*, 43(6): 1043-1047,(1998).
- [47] Dean J.R., Khunder,S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15: 875, (1997).
- [48] Çalımlı,A., “Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi” BAP Sonuç Raporu, Ankara Üniversitesi, (2003).
- [49] Moyler, D.A., King, M.B., and Bott, T.R., Ed., “Extraction of flavours and fragrances, in extraction of Natural Products Using Near-Critical solvents”, Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman& Hall, Glasgow, (1993).
- [50] Rizvi, S. S. H., Yu, Z. R., Bhaskar, A. R., and Raj, C. B. C., “Fundamentals of processing with supercritical fluids, in *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*”, Blackie Academic Professional, an imprint of Chapman & Hall, Glasgow, (1994).
- [51] Wang, L., Weller, C.L., “Recent advanced in extraction of nutraceuticals from plants” *Trends in Food Science & Technology*, 17: 300-312, (2006).
- [52] Kılıç, A., “Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri” *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13): 37-45, (2008).
- [53] Erişim: <http://www.tr.wikipedia.org/soxhlet> [18 Mart 2009]
- [54] Wang,L., Weller, C.L., “Recent advanced in extraction of nutraceuticals from plants” *Trends in Food Science & Technology*, 17: 300-312, (2006).
- [55] Halliday,D., Resnick,R., *Fiziğin Temelleri-1 (Çeviren Prof.Dr. Cengiz Yalçın)* 3.Basım,368-369, (1992).

- [56] Erte E., “Siyah üzümde (*Vitis vinifera* L.) bulunan Resveratol’ün üretim veriminin arttırılmasına ses ötesi dalgaların etkisi.Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Ankara, (2007).
- [57] Kılıç, A., “Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri” Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 10(13): 37-45 (2008).
- [58] Kaufmann, B., Christen, P., “Recent Extraction Techniques For natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurized Solvent Extraction, Phytochemical Analysis, 13: 105-113, (2002).
- [59] Beejmohun,J., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek,L., Christen,P., Kovensky,J., Fliniaux,M., Mesnard,F., “Microwave-Assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed, Phytochemical Analysis,18: 275-282, (2007).
- [60] Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. “Accelerated solvent extraction: A technology for sample preparation.” Analytical Chemistry, 68: 1033-1039, (1996).
- [61] Galip, F., “Bögürtlen Meyvesinin Karbondioksit ile Süperkritik Ekstraksiyonundan Doğal Boyar Madde Eldesi ve Uygulanabilirliği” Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2007).
- [62] Koga,Y., Iwai, Y, Hata, Y., Yamamoto, M., Arai,Y. “Influence of Cosolvent on Solubilities of Fatty Acid and Higher Alcohols in Supercritical Carbon dioxide”, Fluid Phase Equilib, 125:115, (1996).
- [63] Walsh, J.M., Ikonomou,G.D., Donohue,M.D. “Supercritical Phase behavior: the entrainer effect, Fluid Phase Equilib, 33: 295, (1987).
- [64] Temelli, F., Üstündağ, G.Ö., “Solubility behavior of tenary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects” Journal of Supercritical Fluids, 36: 1-15, (2005).
- [65] Foster, N.R., Singh, H., Yun, Y.S.L., Tomasko, D.L., Macnaughton, S.J., “Polar and nonpolar cosolvent effects on the solubility of cholesterol in supercritical fluids” Ind. Eng. Chem.Res.32: 2849, (1993).
- [66] Singh, H., Yun, Y.S.L., Macnaughton, S.J., Tomasko, D.L., Foster, N.R., “Solubility of cholesterol in supercritical ethane and binary gas mixtures containing ethane”, Ind.Eng. Chem.Res.32: 2841, (1993).
- [67] Saquing, C.D., Lucien, F.P., Foster, N.R., “Steric effects and preferential interactions in supercritical carbon dioxide, Ind. Eng. Chem. Res, 37: 4190, (1998).

- [68] Reichardt, C., "Solvent and solvent effects in Organic Chemistry" VCH Publishers, New York, (1998).
- [69] Kamlet, M.J., Taft, R.W., "The solvatochromic comparison method. I. The β -scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities" J.Am.Chem.Soc. 98: 377,(1976).
- [70] Kamlet, M.J., Abboud, J.L., Taft, R.W., "The solvatochromic comparison method.6. The π^* scale of solvent polarities" J.Am.Chem.Soc, 99: 6027, (1977).
- [71] Jeffrey, G.A., "An Introduction to Hydrogen Bonding" Oxford University Pres, Inc., New York, (1997).
- [72] Hoffmann, M.M., Conradi, M.S., "Are there hydrogen bonds in supercritical methanol and ethanol?" J.Phys.Chem.B, 102: 263, (1998).
- [73] Lalanne, P., Tassaing,T., Danten,Y., Besnard,M., "Raman and infrared studies of hydrogen-bonding in supercritical ethanol" J.Mol.Liq, 98-99: 210, (2002).
- [74] Fulton, J.L., Yee, G.G., Smith, R.D., "Hydrogen Bonding of methyl alcohol-*d* in supercritical carbon dioxide and supercritical ethane solutions", J.Am.Chem.Soc.113: 8327, (1991).
- [75] Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., "The chemistry behind antioxidant capacity assays", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856, (2005).
- [76] Özyurt, D., "Toplam flavonoid miktarının geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile tayini" Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2005).
- [77] Karafakoğlu, Y.S., "Tütün çalışanlarında oksidant-antioksidan durum", The Medical Journal of Kocatepe, 5,7, (2004).
- [78] Naczki, M. and Shahidi, F. C., "Extraction and analysis of phenolics in food", Review, Journal of Chromatography A, 1054, 95-111, (2004).
- [79] Sertsever A. ve Gök, V., "Doğal antioksidanların biyoyararlılığı", 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2-4 Ekim, s. 83-98, (2003).
- [80] Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K., "Food Antioxidants Technological, Toxicological and Health Perspectives", Markel Dekker, Newyork, pp 41-50, (1996).
- [81] Cengiz Bakır, "Anason (*Pimpinella Anisum*) ve Rezene (*Foeniculum Vulgaris*) 'de Toplam Fenol/Flavonoid Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Metal İçeriği ile Değişiminin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, (2010).

- [82] Yang, R., Tsao, R., “Optimization of a new mobile to know the complex and real polyphenolic composition Towards a tool phenolic index using high performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1018, 29-40, (2003).
- [83] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., “Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids”, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956, (1996).
- [84] Halliwell, B., “How to characterise a biological antioxidant,”, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32, (1990).
- [85] Shahidi, F., Wanasundara, P., K., J., “Phenolic antioxidants”, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32, 67-103, (1992).
- [86] Cadenas, E., Packer, L., “Handbook of Antioxidants”, Marcel Dekker, Second Edition, New York, 0-8247-0547-5, (2002).
- [87] Slinkard, K., Singleton, V. L., “Total phenols analysis: Automation and comparison with manual methods”, *Am. J. Enol. and Viticult.*, 28: 49-55, (1977).
- [88] Careri M., Furlattini L., Mangia A., Musci M., Anklam E., Theobald A., Von Holst C., “Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in spirulina pacifica algae: a chemometric approach”, *J. Chromatography A.*, 912 (1): 61-71, (2001).
- [89] Erişim: <http://www.criticalprocesses.com> [22 Nisan 2009].
- [90] Vega P. J., Balaban M. O., Sims C. A., O'keefe S. F. and Cornell J. A., “Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM.”, *J. Food Science*, 61 (4): 757-765, (1996).
- [91] Barth, M.M., Zhou, C., Kute, K.M. and Rosenthal, G.A., “Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue”, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 28762878, (1995).
- [92] Kemal Cellat, “Bazı Endemik Bitkilerin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Ekstrakte Edilmesi ve İçeriklerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, (2011)
- [93] Erişim: <http://www.nottingham.ac.uk> [19 Mart 2009]
- [94] Erdal Yabalak, Subkritik ve Süperkritik Akışkanlarla Kum ve Arıtma Çamurundan Ağır Metal Ekstraksiyonu, Mersin Üniversitesi. (2010).
- [95] Ganni, S., Gloria, C, Dario G., Giorgio, G., Filippo, M., Massimo, R., Sauro, V., “Alkannin/shikonin mixture from roots of *Onosma echioides* (L.) L.: Extraction method study and quantification”, *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 945-952, (2008).

- [96] I.H., Akgun, A. Erkucuk, M. Pilavtepe, O. Yesil-Celiktas, “Optimization of total alkannin yields of *Alkanna tinctoria* by using sub- and supercritical carbon dioxide extraction”, J. of Supercritical Fluids 57 31–37, (2011).
- [97] Muge, Pilavtepe, Ismail, H. Akgun, Aysen, Erkucuk, Ozlem, Yesil-Celiktas, “Supercritical CO₂ extraction of *Alkanna* species and investigating functional characteristics of alkannin-enriched yoghurt during storage”, Eur. Food Res. Technol. 234:807–812 (2012).
- [98] Khaled Tawaha, Feras Q. Alali, Mohammad Gharaibeh, Mohammad Mohammad Tamam El-Elimat, “Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species” Food Chemistry 104 1372–1378, (2007).
- [99] Slawomir, Dresler, Tomasz, Kubrak, Anna, Bogucka-Kocka, Grazyna Szymczak, “Determination of Shikonin and Rosmarinic Acid in *Echium vulgare* L. and *Echium russicum* J.F. Gmel. by Capillary Electrophoresis”, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 38:6, 698-701, (2015).
- [100] Yani, Hu, Zhihong, Jiang, Kelvin, Sze-Yin, Leung, Zhongzhen, Zhao, “Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high-performance liquid chromatography”, Analytica. Chimica. Acta. 577 26–31, (2006).
- [101] Cengiz Sarıkürkcü, “Yaygın olarak yetişen bazı orman bitkilerinin (*Alkanna tinctoria* (L.) Tausch subsp. *tinctoria*, *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis* ve *Phlomis bourgaei* Boiss.) kimyasal içerik bazında total karakterizasyonu”, Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, (2010).
- [102] Papageorgiu, V. P., Assimopoulou, A. N., Samanidou, V. F., Papadoyannis, I. N., “Current Organic Chemistry”, 10, 583-622, (2006).
- [103] Riedl, H., “Boraginaceae. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, (Ed.):P.H. Davis, 6: 237-437. Edinburgh:Edinburg University press, Edinburgh, (1978).
- [104] Y., Seto, S., Motoyoshi, H. Nakamura, J., Imuta, T., Ishitoku, S., Isayama, Yakugaku, Zasshi, “Chemical Abstracts”, 117, 124 158, (1992).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Aslı Demir

Doğum Tarihi: 18/01/1987

Öğrenim Durumu: Lisans

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|---------------|---------------|---------------------|-----------|
| Lise | Fen Bilimleri | 19 Mayıs Lisesi | 2001-2004 |
| Lisans | Kimya | Mersin Üniversitesi | 2006-2011 |
| Yüksek Lisans | Kimya | Mersin Üniversitesi | 2011-2015 |

(Varsa) Görevler:

| Görev Unvanı | Görev Yeri | Yıl |
|--------------|------------|-----------|
| | | XXXX-XXXX |

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1.
- 2.
- 3.